

UNIVERSITÉ PARIS-DIDEROT



THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS-DIDEROT

Spécialité : physique

École Doctorale Physique de la Région Parisienne (ED 107) Laboratoire Matière et Systèmes Complexes

Modulation de la locomotion de *Caenorhabditis elegans* induite par l'environnement mécanique

présentée par

Félix LEBOIS

Thèse effectuée sous la direction de Charlotte Py, Pascal HERSEN et Jean-Marc DI MEGLIO

Soutenue le 9 décembre 2011 devant le Jury composé de :

Jean-Louis BESSEREAU Didier CHATENAY Jean-Marc DI MEGLIO Jean-Christophe GÉMINARD Raymond GOLDSTEIN Michel LABOUESSE Directeur de Recherche, INSERMRaDirecteur de Recherche, CRNSExProfesseur, Université Paris-DiderotDiDirecteur de Recherche, CRNSRaProfesseur, Université de CambridgeExDirecteur de Recherche, CRNSProfesseur, Université de CambridgeDirecteur de Recherche, CRNSProfesseur, Université de Cambridge

Rapporteur Examinateur Directeur de thèse Rapporteur Examinateur Président

Remerciements

L'usage veut que la thèse soit une aventure individuelle, ou du moins soit perçue comme telle. Je suis heureux de constater, avant de présenter ici les travaux qui m'ont occupé ces trois dernières années, que ce n'est pas le cas. De nombreuses personnes m'ont conseillé, aidé, sauvé parfois ; n'eût été leur présence, cette thèse serait bien différente, peut-être même n'existerait-elle pas.

Je tiens en premier lieu à remercier mes trois directeurs de thèse : Charlotte Py, Pascal Hersen et Jean-Marc Di Meglio, qui m'ont proposé ce sujet ; puis suivi, souvent de près, et parfois de loin (au sens géographique), comment il évoluait entre mes mains. Leur regard scientifique, leur rigueur, leurs conseils et leur bienveillance m'ont guidé dans les eaux troubles et de viscosité variable où je me retrouvais parfois. Grâce à eux, m'en voilà sorti.

Je me dois aussi d'exprimer ma profonde reconnaissance aux membres du jury, Michel Labouesse, Didier Chatenay, Ray Goldstein et plus particulièrement à Jean-Christophe Géminard et à Jean-Louis Bessereau, qui ont eu la gentillesse d'accepter d'être rapporteurs d'un manuscrit qui compte 390 occurences du mot *locomotion*.

Je ne peux que louer l'excellent environnement que constitue le laboratoire Matière et Système Complexes. Certains membres du laboratoire, que je veux remercier ici, m'ont aidé de manière décisive. Olivier Cardoso a répondu à de nombreuses questions concernant l'informatique au sens large et m'a laissé entrevoir les beautés administratives du SCRIPT; il a surtout écrit les précieuses premières lignes d'un programme d'analyse d'image que j'ai sans cesse utilisé par la suite. Arnaud Grados, Mathieu Receveur et Laurent Réa m'ont aidé à de multiples occasions. Sans eux, l'expérience d'électrotaxie n'aurait pas pu voir le jour – j'ai aussi pu bénéficier des conseils de David Charalampous pour la partie programmation.

J'ai eu la chance de travailler avec Xavier Manière, alors doctorant au laboratoire d'Ivan Matic, à l'Hôpital Necker. Je lui dois, à lui aussi, beaucoup à propos des expériences d'électrotaxie. C'était un réel plaisir de discuter avec un autre doctorant de nos sujets de thèse respectifs, et je suis heureux que cette collaboration ait porté ses fruits. De même, j'ai été ravi de partager les quelques connaissances accumulées durant les premiers temps de cette thèse avec les stagiaires successivement passés au laboratoire, et parmi eux je voudrais remercier Chenlu Yu et Thomas Chartier, qui ont éclairé de leur candeur nématologique mes derniers mois au laboratoire.

Je tiens à remercier Alexandre Kabla qui m'a très gentiment accueilli à Cambridge, et

m'a prêté son vélo.

Je voudrais aussi remercier les enseignants que j'ai rencontrés et qui m'ont guidé lors du monitorat, particulièrement Étienne Couturier et Caroline Derec.

J'ai beaucoup de plaisir à saluer ici mes compagnons de route, thésards et post-docs : Pierre et Jimmy, camarades hérités de la physique de liquides, et qui contribuent, avec Lénaïc, Agnès, Kelly et Clément à faire de la salle 756A un lieu mystique et légendaire ; Jannis, Claire et Léa, que j'étais toujours heureux de croiser au laboratoire ; Éric, Jonathan, Hugo et Amsha, aux quatre points cardinaux de cette belle qualité qu'est l'intransigeance ; Guillaume et Damien, les vieux sages. Sans Sébastien Léonard, ce manuscrit n'aurait pas tout à fait le même aspect ; et je ne l'aurais sans doute pas terminé dans les temps sans la saine émulation calabraise de Giuseppe Pucci. Enfin Vincent, mon colocataire, a joué de la trompette durant les heures les plus dures de la rédaction de cette thèse. Il en a ensuite relu, avec diligence et rapidité, quelques chapitres. Je l'en remercie.

Pour conclure, je ne peux pas imaginer à quoi auraient ressemblé ces trois années sans Juliette, qui, à sa manière toute littéraire, anapestes et amphibraques, mesure aussi des vers. Source d'expériences hautement non reproductibles, sa présence intermittente et joyeuse réussissait à me faire oublier à peu près toute forme de certitude scientifique lorsque je ne travaillais pas à cette thèse – une fois de plus, je n'aurais pu espérer mieux.

Table des matières

Avant-propos				1
No	otatio	ons		3
1	Intro	oduction		5
	1.1	Introduction à la locomotion ondula	toire	6
		1.1.1 Exemples de locomotion ar	imale	6
		1.1.2 Locomotion à bas nombre of	le Reynolds	6
		1.1.3 Autres milieux dominés par	la friction	10
		1.1.4 Intérêt de la locomotion onc	ulatoire pour la robotique et la biomimé-	
		tique		11
	1.2	Présentation de Caenorhabditis ele	gans	13
		1.2.1 Un système modèle en biol	ogie	13
		1.2.2 Cycle de développement .		15
		1.2.3 Système nerveux		16
	1.3	Description de la locomotion de <i>C</i> .	elegans	17
		1.3.1 Habitat naturel de C. elegan	<i>as</i>	17
		1.3.2 Modes de locomotion obser	vés en laboratoire	17
	1.4	Système locomoteur	, 	21
		1.4.1 Description mécanique du s	quelette hydrostatique	21
		1.4.2 Muscles de la locomotion	, 	24
		1.4.3 Neurones impliqués dans la	locomotion	25
		1.4.4 Origine des oscillations et p	propagation de l'onde	30
	1.5	Interactions avec l'environnement r	nécanique	33
		1.5.1 Effets de la friction sur la v	itesse de progression	34
		1.5.2 Modulation par l'environne	ment mécanique	41
	1.6	Conclusion	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	43
2	Trar	nsition nage-reptation	4	45
	2.1	Position du problème		46
		2.1.1 Définition d'une allure : ex	emple de la sangsue	46
		2.1.2 Allure(s) de <i>C. elegans</i>	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	47
	2.2	Dispositif expérimental et analyse of	les images	49
		2.2.1 Dispositif expérimental	- · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	50

		2.2.2	Analyse des images	50
		2.2.3	Définition du paramètre de confinement	54
		2.2.4	Procédure	54
	2.3	Approc	che dynamique	55
		2.3.1	Libération soudaine d'un ver initialement confiné	55
		2.3.2	Libération progressive d'un ver initialement confiné	57
	2.4	Approc	che quasi-statique : variation graduelle du confinement	58
		2.4.1	Continuité des paramètres de la locomotion	58
		2.4.2	Continuité dans l'espace des formes	60
		2.4.3	Évolution de la vitesse de progression	65
		2.4.4	Évolution du rapport des coefficients de friction	69
	2.5	Étude o	du mutant <i>unc-79(e1068)</i>	70
		2.5.1	unc-79 et unc-80, nécessaires à l'établissement des canaux NCA .	70
		2.5.2	Confinement dynamique et quasi-statique des mutants <i>unc-79</i>	72
	2.6	Conclu	sion et discussion	75
3	Méc	anoser	nsation et régulation de la locomotion	79
	3.1	Mécan	osensation chez C. elegans	80
		3.1.1	Neurones mécanosensoriels	80
		3.1.2	Mécanismes moléculaires de la mécanotransduction	82
	3.2	Effets o	de la suppression du toucher léger	82
		3.2.1	Le complexe mécanotransducteur MEC-4/MEC-10	82
		3.2.2	Confinement des mutants $mec-4(e1611)$	84
	3.3	<i>trp-4</i> :	le rôle potentiel du contrôle de la courbure	88
		3.3.1	TRP-4 est nécessaire pour la sensibilité à la texture et au contrôle	
			de la courbure	89
		3.3.2	Confinement de <i>trp-4(sy695)</i> : résultats et discussion	90
	3.4	Le cho	ix du couple (T, V_w) dépend des neurones ciliés	92
	3.5	Conclu	sion	93
4	Séle	ection s	ous contrainte du mode de locomotion	95
	4.1	Une rel	lation entre période et vitesse des ondes	96
		4.1.1	Contrôle de la courbure maximale	96
		4.1.2	Existence d'une « relation de dispersion » pour la propagation des	
			ondes	96
		4.1.3	Comportement des mutants	98
		4.1.4	Discussion	99
	4.2	Sélection	on du mode de locomotion	100
		4.2.1	Angle d'attaque	100
		4.2.2	Puissance musculaire	100
	4.3	Conclu	sion	103

5	Électrotaxie				
	5.1	Électrotaxie chez C. elegans	110		
		5.1.1 Description et mécanismes du comportement électrotactique	110		
		5.1.2 Utilisations de l'électrotaxie	111		
	5.2	Système expérimental	114		
	5.3	Allers-retours dans un champ alterné	117		
		5.3.1 Procédure et résultats	117		
		5.3.2 Discussion	119		
	5.4	Conclusion	122		
6	Con	clusion	123		
Bi	Bibliographie 127				

Annexes

ΑΙ	Nomenclature	137
A.1	Neurones	137
A.2	Génétique	137
в	Méthodes et protocoles	139
B .1	Maintenance et synchronisation des souches	139
B.2	Expériences de plaquage	139
B.3	Électrotaxie	145
СІ	Modélisation	149
C .1	Modèle de Gray et Alexander	149
C.2	Équivalence des descriptions par $(x(s,t), y(s,t) \text{ et } \kappa(s,t) \dots \dots \dots \dots$	153
D	Articles	155

Avant-propos

Cette thèse a pour objet l'influence de l'environnement mécanique sur la locomotion ondulatoire de *Caenorhabditis elegans*, un nématode non parasitaire d'un millimètre de long, vivant essentiellement dans la matière organique en décomposition.

L'étude de la locomotion des animaux appelle une démarche interdisciplinaire. Il s'agit d'abord de comprendre les mécanismes biologiques de production des motifs d'excitation des muscles, et la manière dont la prise en compte des données mécaniques du milieu environnant les affecte ; de montrer, ensuite, comment les propriétés mécaniques du corps et de l'environnement filtrent ces motifs pour aboutir aux rythmes et aux formes de la locomotion ; de décrire, enfin, les forces hydrodynamiques ou de friction qui agissent sur le corps au cours de la séquence de ses déformations, et dont la résultante propulse l'organisme dans la direction souhaitée. L'intérêt ancien pour ces problématiques¹ s'est trouvé récemment renouvelé par le développement de la biomimétique, dont le but est de reproduire dans des dispositifs artificiels des mécanismes observés dans la nature.

Notre approche de la locomotion de *C. elegans* s'inscrit dans le contexte de travaux menés au laboratoire Matière et Systèmes Complexes, qui cherchent à quantifier la manière dont l'interaction mécanique avec le milieu modifie le comportement de cellules ou de microorganismes. *C. elegans* est un système modèle en biologie et à ce titre il présente de nombreux avantages, au premier rang desquels le dynamisme de la communauté scientifique qui s'est développée autour de son étude. De notre point de vue, nous retiendrons qu'il est aisé à manipuler et que sa locomotion, qui se décline au laboratoire en deux modes, nage et reptation, est simplement quantifiable par un nombre réduit de paramètres. Nous avons ici tenté de caractériser la manière dont les propriétés mécaniques du milieu où se déplace le ver modifient ces paramètres de la locomotion. Les résultats que nous présentons s'appuient sur l'observation d'animaux en mouvement, et sur la décomposition temporelle des mouvements en séquences de formes, procédé déjà mis à profit au XIXe siècle par Étienne-Jules Marey et Eadweard Muybridge, initiateurs des études modernes sur la locomotion animale.

Après une synthèse des connaissances disponibles sur la locomotion de *C. elegans*, exposées dans le cadre plus large d'une introduction à la locomotion ondulatoire, nous présentons dans le chapitre 2 un dispositif de confinement du ver grâce auquel nous contrôlons

^{1.} Voir par exemple Aristote, La Marche des Animaux.

l'environnement mécanique et décrivons la gamme des modes de locomotion utilisés par le ver, afin de proposer une réponse au problème de l'existence de deux allures distinctes (nage et reptation). Le chapitre 3 évoque l'intégration et le traitement des informations mécaniques externes et internes au corps du ver, à travers l'exemple de quelques mutants dont la mécanosensation est déficiente, soumis aux mêmes conditions mécaniques que le type sauvage. À partir des données collectées pour le type sauvage et pour les mutants, nous proposons dans le chapitre 4 une relation de dispersion pour la propagation des ondes de courbure le long du corps du ver, que nous considérons ensuite comme une contrainte pouvant expliquer la sélection du mode de locomotion dans un environnement donné. Le chapitre 5 s'écarte des problématiques liées à la locomotion pour aborder la navigation de *C. elegans* dans un champ électrique, après avoir décrit le dispositif expérimental mis en place pour étudier le comportement électrotactique.

Notations

 10^3 Kg m^{-3} 10^{-3} Pa s

 $70 \ 10^{-3} \text{ N m}^{-1}$ 10 m s^{-2}

10⁵ Pa

On trouvera ci-dessous les principales notations utilisées dans le texte, et les valeurs utilisées des quantités désignées lorsque celles-ci sont fixes.

Environnement mécanique

- ρ masse volumique de l'eau
- η viscosité de l'eau
- P_0 pression atmoshpérique
- γ tension superficielle de l'eau
- g gravité
- *p* pression dans le liquide
- C_n coefficient de friction normal
- C_l coefficient de friction longitudinal
- ε paramètre de confinement

Mécanique et géométrie du ver

L	longueur du ver	1 mm
R	rayon du ver	0,04 mm
D	diamètre du ver	0,08 mm
е	épaisseur de la cuticule	$0,5 \ 10^{-3} \ \mathrm{mm}$
Ε	module d'Young du ver	
k	raideur du ver	

Paramètres de la locomotion

- f fréquence de l'onde
- *T* période de l'onde
- ω pulsation de l'onde
- *A* amplitude de l'onde
- λ période spatiale de l'onde
- λ_C longueur d'onde de l'onde de courbure
- V_w vitesse de propagation de l'onde de courbure
- κ_{max} courbure maximale
- V_x, V vitesse de progression
- V_g vitesse de glissement
- V_n vitesse transverse (ou normale)
- V_l vitesse longitudinale

CHAPITRE **1** Introduction

Sommaire

1.1	Introd	luction à la locomotion ondulatoire	6
	1.1.1	Exemples de locomotion animale	6
	1.1.2	Locomotion à bas nombre de Reynolds	6
	1.1.3	Autres milieux dominés par la friction	10
	1.1.4	Intérêt de la locomotion ondulatoire pour la robotique et la biomimé	-
		tique	11
1.2	Prése	entation de <i>Caenorhabditis elegans</i>	13
	1.2.1	Un système modèle en biologie	13
	1.2.2	Cycle de développement	15
	1.2.3	Système nerveux	16
1.3	Descr	ription de la locomotion de <i>C. elegans</i>	17
	1.3.1	Habitat naturel de C. elegans	17
	1.3.2	Modes de locomotion observés en laboratoire	17
1.4	Systè	me locomoteur	21
	1.4.1	Description mécanique du squelette hydrostatique	21
	1.4.2	Muscles de la locomotion	24
	1.4.3	Neurones impliqués dans la locomotion	25
	1.4.4	Origine des oscillations et propagation de l'onde	30
1.5	Intera	ctions avec l'environnement mécanique	33
	1.5.1	Effets de la friction sur la vitesse de progression	34
	1.5.2	Modulation par l'environnement mécanique	41
1.6	Conc	lusion	43

1.1 Introduction à la locomotion ondulatoire

1.1.1 Exemples de locomotion animale

Les animaux se déplacent pour trouver de la nourriture ou un partenaire sexuel, pour explorer de nouveaux habitats, ou encore pour échapper aux prédateurs. La locomotion est la faculté de se déplacer par auto-propulsion, ce qui demande de l'énergie. Le travail est fourni par les muscles¹; ceux-ci exercent leur force de traction sur des structures rigides afin de déformer le corps de l'animal : squelette des vertébrés, exosquelette des arthropodes, squelette hydrostatique des vers plats et des nématodes. De manière très générale, l'ensemble des déformations que peut subir le corps de l'animal est limité, et celui-ci progresse grâce à un cycle périodique de déformations.

Par ses mouvements, l'animal exerce des forces sur son environnement : en vertu de la troisième loi de Newton, celui-ci exerce en retour des forces entraînant la propulsion dans la direction souhaitée. Les forces s'opposant au mouvement dépendent de la taille de l'animal et de la nature du milieu où il évolue : le poids², pour les animaux de grande taille se déplaçant sur la surface terrestre, auquel s'ajoute la résistance de l'air dans le cas des oiseaux ; la friction pour les animaux au contact avec le sol, ou se déplaçant sous la terre, dans des environnements granulaires tels que le sable. En milieu liquide, l'animal est freiné par la traînée, dont la nature et l'intensité dépendent de ses dimensions, de sa vitesse et de la viscosité du liquide.

Quelques exemples de locomotion animale sont donnés Figure 1.1. L'homme avance grâce à la réaction du sol sur lequel il appuie avec ses jambes. Les oiseaux, les insectes volants et les chauves-souris, battent des ailes pour s'élever et pour accélérer lors de leur vol. Dans l'eau, la plupart des poissons avancent en ondulant leur corps. La raie (Fig. 1.1) progresse par l'ondulation verticale de ses nageoires pectorales. D'autres espèces de poissons, comme le thon, exercent des forces sur le liquide environnant par les déplacements latéraux du corps et de la nageoire caudale, dont la résultante normale à la direction de propagation s'annule alors que la résultante longitudinale propulse l'animal par conservation de la quantité de mouvement. D'autres animaux propulsent des jets d'eau dans le sens opposé au déplacement, comme le poulpe ou la méduse [1].

1.1.2 Locomotion à bas nombre de Reynolds

Les caractéristiques de la locomotion d'un organisme donné résultent de l'évolution de son espèce et dépendent de l'environnement où il vit, et de la nature de ses interactions avec cet environnement. Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié le déplacement d'un petit nématode (ver rond), *C. elegans*. Cet animal vit exclusivement dans des milieux liquides ou humides et l'individu adulte mesure environ 1 mm de long. Les lois physiques

^{1.} Pour certains organismes (vers plats ou mollusques de petite taille), la locomotion est parfois assurée par des cils. C'est aussi le cas, en dehors du règne animal, de certaines bactéries. Les bactéries utilisent aussi des flagelles ou des pilis, suivant les espèces.

^{2.} Par exemple, la marche humaine suppose une oscillation verticale du centre de masse.



FIGURE 1.1 – **Exemples de locomotion animale, tirés de [2].** A Marche humaine. La jambe gauche est masquée afin de suivre le mouvement de la jambe droite. **B** Vol du goéland. L'oiseau se maintient en vol et avance par le battement de ses ailes. **C** Nage de la raie, par l'ondulation verticale des nageoires. Sens de lecture : de bas en haut (l'onde se propage vers l'arrière de l'animal).

qui règnent dans de telles conditions sont très différentes de celles dont nous avons l'expérience [3].

En milieu liquide, la nature de l'écoulement autour de l'animal dépend de la valeur du nombre de Reynolds, qui compare la valeur de l'inertie à celle des forces visqueuses [4]. Le champ de vitesse v et de pression p du fluide (de viscosité η et de masse volumique ρ) est décrit par l'équation de Navier-Stokes (en négligeant les forces en volume telles que la gravité),

$$\rho \left[\frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + (\mathbf{v}.\mathbf{grad})\mathbf{v} \right] = -\mathbf{grad}p + \eta \Delta \mathbf{v}.$$
(1.1)

Soit, dans ces conditions, un animal de longueur *L*, qui se déplaçe par une déformation périodique de fréquence *f* et d'amplitude *A*. La vitesse du fluide sera de l'ordre de *Af*. Ses variations auront lieu sur des distances de l'ordre de *L* et des temps de l'ordre de f^{-1} [5]. En posant $\mathbf{v} = Af\mathbf{v}'$, t = t'/f et $\mathbf{x} = L\mathbf{x}'$ et $p = P_0p'$, nous obtenons l'équation de Navier-Stokes adimensionnée,

$$\rho \left[A f^2 \frac{\partial \mathbf{v}'}{\partial t'} + \frac{A^2 f^2}{L} (\mathbf{v}'.\mathbf{grad}') \mathbf{v}' \right] = -\frac{P_0}{L} \mathbf{grad}' p' + \eta \frac{A f}{L^2} \Delta' \mathbf{v}'.$$
(1.2)

Les effets de l'inertie disparaissent si les deux termes inertiels du membre de gauche sont négligeables devant le terme dû aux contraintes visqueuses. Nous pouvons définir deux nombres de Reynolds Re_{ns} et Re_c selon que l'on compare les forces visqueuses au terme non-stationnaire ou au terme de convection de l'équation de Navier-Stokes,

$$Re_{ns} = \frac{\rho f L^2}{\eta} \tag{1.3}$$

$$Re_c = \frac{\rho A f L}{\eta}. \tag{1.4}$$

L'inertie est donc négligeable si $Re_{ns} \ll 1$ et $Re_c \ll 1$. Pour la plupart des organismes dont la taille est inférieure au mm, ces quantités sont effectivement inférieures à 1. Leur locomotion doit donc tenir compte de la nature particulière des écoulements à bas nombre de Reynolds.

Deux caractéristiques de ces milieux imposent des contraintes sur la locomotion. L'absence d'inertie signifie que l'animal doit exercer constamment des forces s'il veut avancer. Si son corps cesse de se déformer, il s'immobilise aussitôt. Par ailleurs, si nous négligeons la gravité, l'équation de Navier-Stokes décrivant l'écoulement se simplifie en l'équation de Stokes,

$$\operatorname{grad} p = \eta \Delta \mathbf{v}. \tag{1.5}$$

Cette équation est linéaire et indépendante du temps. Un mouvement *réciproque*, qui se décompose en une séquence de formes qu'il n'est pas possible de distinguer de la même séquence inversée dans le temps, ne permet pas de modifier la position du centre de masse, puisque le liquide déplacé durant l'aller retrouve sa place initiale au retour. La déformation de l'animal doit donc de ne pas être invariante par inversement du temps pour qu'il puisse avancer à bas nombre de Reynolds : c'est le *scallop theorem* (« théorème de la coquille Saint-Jacques ») énoncé par Edward M. Purcell dans l'article *Life at low Reynolds number* [3] (Fig. 1.2A).

Purcell imagine une coquille Saint-Jacques de dimensions microscopiques³, dont le seul mouvement possible consiste à ouvrir et à fermer sa coquille. L'ensemble des déformations est donc décrit par un unique paramètre, la donnée de l'angle d'ouverture, $\theta(t)$. Lorsque l'animal ouvre et referme sa coquille, il emprunte nécessairement le même chemin à l'aller et au retour dans l'espace des formes, puisque celui-ci est unidimensionnel : il ne peut pas progresser. L'évolution temporelle de la vitesse de déformation $d\theta/dt$ n'a pas d'importance.

Un animal ne possédant qu'un seul degré de liberté ne peut donc pas avancer à bas nombre de Reynolds : il doit posséder au minimum deux degrés de liberté. Pour le démontrer, Purcell propose un animal minimal, hypothétique (le nageur de Purcell, Fig. 1.2**B**) composé de trois segments liés par deux articulations. Purcell avance qu'un tel animal peut se déplacer à bas nombre de Reynolds en suivant une certaine séquence non réciproque

^{3.} Les dimensions de la coquille Saint-Jacques sont en réalité trop importantes pour considérer qu'elle se déplace à bas nombre de Reynolds. Cet animal se propulse en utilisant des jets d'eau produits par le claquement de la coquille.



FIGURE 1.2 – Locomotion à bas nombre de Reynolds. A Illustration du *scallop theorem* de Purcell. Une hypothétique coquille Saint-Jacques de taille microscopique ouvre et referme sa coquille à bas nombre de Reynolds. Le mouvement suit la même séquence de déformations dans un sens ou dans l'autre, et ne lui permet pas d'avancer. B Le nageur de Purcell possède deux bras articulés autour d'un segment central. La séquence de battements des bras proposée en C (de haut en bas), n'est pas invariante par renversement du temps et lui permet d'avancer. D La même séquence, illustrant l'analogie possible avec la propagation d'une onde de courbure le long d'un filament élastique (courbe grise), de nombre d'onde k = 1/a et de même période que le nageur de Purcell (voir texte). [6]. E Réalisation expérimentale du nageur de Purcell, déplacement dans un liquide visqueux (tiré de [7]). F Vibrio cholerae (bacille virgule) se propulse grâce à son flagelle (photographie de Leodotia Pope, Département de Microbiologie, Université d'Austin, Texas). Barre d'échelle : 1 micron. G Trois photographies successives (200 ms environ entre chaque prise) en surimpression d'un spermatozoïde d'ascidie intestinale (*Ciona intestinalis*). Barre d'échelle : 10 microns ; tiré de [8].

de déformations. Des études théoriques [9, 10] et expérimentales [7] ont confirmé que ce nageur progresse dans un liquide visqueux. De nombreux organismes élancés (dont la longueur est nettement supérieure au diamètre) peuvent être assimilés à un filament élastique le long duquel se propage une onde de courbure. Pour de petites amplitudes, il est possible de faire l'analogie avec un nageur de Purcell composé de trois segments de même longueur *a*, oscillant à la fréquence *f* avec une amplitude correspondant à un angle θ_{max} (Fig. 1.2**D**), en définissant une amplitude $A = a\theta_{max}$, un nombre d'onde k = 1/a et une vitesse de propagation $V_w = af$ [6].

Outre certains nématodes de petite taille, d'autres organismes se déplaçant à bas nombre de Reynolds ont recours à la locomotion ondulatoire : larves d'insectes ou d'ascidies, bactéries, spermatozoïdes... La propagation d'une onde de courbure le long d'un filament élastique (corps ou flagelle) permet de surmonter les difficultés spécifiques à la locomotion à bas nombre de Reynolds : la déformation cyclique compense l'absence d'inertie en fournissant une poussée constante ; la brisure de la symétrie par renversement du temps – si l'on inverse la flèche du temps, l'onde qui voyage vers la queue semble se propager vers la tête, en produisant un mouvement non réciproque, satisfait le théorème de Purcell. Nous verrons dans la section 1.5 comment ce cycle de déformations entraîne la propulsion en milieu visqueux.

Il existe d'autres stratégies que la déformation non réciproque pour se déplacer à bas nombre de Reynolds. Le théorème de Purcell est en effet valable sous certaines conditions [5] : le nageur est seul ; le fluide environnant est newtonien et infini ; les deux nombres de Reynolds définis plus haut sont effectivement très inférieurs à 1. Un mode de locomotion utilisant des mouvements réciproques peut donc permettre d'avancer à bas nombre de Reynolds, par exemple le long d'une paroi ou produisant des accélérations transitoires suffisamment importantes pour introduire un effet des termes inertiels dans l'équation de Navier-Stokes [5].

1.1.3 Autres milieux dominés par la friction

La locomotion à bas nombre de Reynolds est un cas extrême où, de toutes les forces susceptibles de s'opposer au mouvement, seule la friction due à la viscosité subsiste. La locomotion ondulatoire est aussi utilisée par des animaux de taille plus importante, qui évoluent dans des environnements où la friction domine, sans que celle-ci ne soit nécessairement de nature visqueuse. Les deux exemples présentés ci-dessous, les serpents et le poisson de sable, ont en commun une géométrie élancée, soit un corps dont la longueur est grande devant le diamètre. Il sera montré (section 1.5) que dans ces conditions, il est nécessaire que la friction normale, qui s'oppose au glissement latéral d'un tronçon du corps, excède la friction longitudinale, qui s'oppose au glissement tangentiel, afin qu'il y ait déplacement vers l'avant.

Les serpents utilisent différents modes de locomotion suivant leurs besoins, leur taille et suivant le milieu [11]. Le plus répandu reste cependant l'ondulation latérale, durant laque-



FIGURE 1.3 – **Exemples de locomotion ondulatoire. A** Reptation de la couleuvre, par Étienne-Jules Marey [13] (chronophotographie). **B** Poisson de sable (lézard) se déplaçant sans l'aide de ses membres dans un milieu granulaire, sous la surface (observation par rayons X) [14].

lle le corps du serpent se courbe alternativement vers la gauche et vers la droite, dans un plan parallèle à la surface sur laquelle il se déplace. Ces oscillations se propagent le long du corps de la tête vers l'extrémité postérieure (Fig. 1.3A). Grâce à ce mode de locomotion, le serpent avance sur des surfaces irrégulières où il peut s'appuyer sur les cailloux ou les branches. Sur des surfaces lisses, telles que du sable ou de la roche nue, il a été montré [12] que l'arrangement des écailles sur la peau explique l'anisotropie de la friction nécessaire à la progression du serpent : la peau du serpent est lisse dans la direction longitudinale et rugueuse dans la direction latérale.

Un autre exemple est celui du lézard *Scincus scincus*, ou poisson de sable, qui vit au Sahara occidental [14] (Fig. 1.3**B**). Il se déplace la plupart du temps à la surface du sable, en ondulant et en utilisant ses courtes pattes pour avancer. Lorsqu'il se sent en danger, il s'enfouit et cesse d'utiliser ses pattes : il « nage » dans le sable au moyen d'ondulations latérales qui voyagent le long du corps. En effet, l'animal ne creuse pas un tunnel sur les parois duquel il pourrait s'appuyer ; ses mouvements ont plutôt tendance à fluidifier le milieu granulaire et il se déplace dans un « liquide », dans lequel la résistance au mouvement provient de la friction entre les grains de sable qui s'écoulent [14].

1.1.4 Intérêt de la locomotion ondulatoire pour la robotique et la biomimétique

La locomotion ondulatoire est donc largement répandue dans la nature. La diversité des milieux et des échelles auxquels elle se révèle adaptée a encouragé le développement de robots inspirés de ce mode de locomotion. Un robot capable de se déplacer à la manière d'un serpent, par exemple, peut évoluer sur des terrains accidentés, dans des crevasses ou à l'intérieur de tuyaux, et passer sans difficulté d'une surface solide à un milieu liquide (Fig. 1.4A). Les applications sont nombreuses : exploration spatiale, recherche et sauvetage de victimes dans des décombres [15], détection et désactivation d'explosifs, maintenance de canalisations, etc.



FIGURE 1.4 – **Biomimétique : robotique et micro-nageurs. A** Exemple de robot amphibie inspiré par la locomotion des serpents [23]. Chaque élément mesure 7 cm; les roues créent l'anisotropie de la friction sur des substrats solides. **B** Robot inspiré de la locomotion de *C. elegans*, formé de 12 segments [24]. Les muscles sont remplacés par des actionneurs constitués d'un alliage à mémoire de forme. **C** Micro-nageur magnétique utilisant une hélice rotative [25] (barre d'échelle : 4 microns). **D** Autre micro-nageur : une chaîne de particules magnétiques est attachée à un globule rouge et se déforme par l'action d'un champ magnétique (séquence de battements de gauche à droite et de haut en bas) [22]. Le filament a une longueur de 24 microns.

Si la plupart des prototypes prennent pour modèle des animaux vertébrés, le développement de la *soft robotics*, ou « robotique molle », laisse entrevoir de nouvelles applications, en particulier dans le champ de la médecine. Ces robots, inspirés par des invertébrés tels que l'escargot [16] ou la chenille [17], sont composés de matériaux mous et élastiques, ce qui leur autorise une plus grande variété de déformations possibles, un contact plus doux avec l'environnement ou les objets manipulés [18], et une résistance accrue aux chocs.

La médecine pourrait aussi profiter de la tendance à la miniaturisation des robots, à des fins thérapeutiques (vectorisation de médicaments) ou chirurgicales. Il est aujourd'hui possible, par exemple, de réaliser une endoscopie à l'aide d'une gélule minature avalée par le patient, dans laquelle se trouve une caméra [19]. La capsule mesure 3 cm de long mais il est envisagé de d'atteindre à l'avenir des échelles plus petites.

Les conditions dans lesquelles se déplaceraient ces micro-nageurs (milieux humides, dominés par la viscosité) les rapprochent des organismes vivant à bas nombre de Reynolds. La stratégie la plus adoptée pour les faire se déplacer consiste à utiliser une hélice dont la rotation, semblable à celle du flagelle de certaines bactéries [20] est assurée par un champ magnétique (Fig. 1.4**B**). L'utilisation d'un filament élastique qui ondulerait latéralement n'a été que rarement concrétisée aux petites échelles [21]. Cependant Dreyfus *et al.* ont mis au point un micro-nageur de ce type en attachant une chaîne de particules magnétiques à un globule rouge [22] (Fig. 1.4**C**).

De nombreux animaux utilisent la locomotion ondulatoire dans des environnements où la friction domine le poids : friction d'origine visqueuse à bas nombre de Reynolds ; friction due au contact des grains de sable mis en mouvement par le poisson de sable ; ou frottements statiques et dynamiques entre la peau des serpents et les obstacles ou irrégularités de la surface terrestre. Des modes de locomotion analogues sont observés à haut nombre de Reynolds, par exemple chez les anguilles [26] ou les serpents marins.

La locomotion ondulatoire est utilisée par de nombreux animaux, parfois très éloignés les uns des autres du point de vue de l'évolution. Elle présente un cas de convergence évolutive : alors que leur mode de locomotion est semblable à celui des vers et de la sangsue, les serpents descendent de lézards terrestres qui ont évolué vers la reptation et ont perdu leurs pattes [27]. La polyvalence et la robustesse de ce mode de locomotion inspirent aujourd'hui la recherche en robotique et en micro-robotique. C'est dans ce cadre que s'inscrit la recherche sur la locomotion de *C. elegans*, un inverterbré de petite taille vivant en milieu humide, par ailleurs système modèle en biologie depuis quelques dizaines d'années.

1.2 Présentation de Caenorhabditis elegans

1.2.1 Un système modèle en biologie

Nous avons étudié la locomotion ondulatoire et sa modulation dans le cas particulier de *C. elegans.* Il s'agit d'un nématode (ver rond) de petite taille – approximativement 1 mm de long – non parasitaire, que l'on peut trouver dans le sol ou dans certaines matières organiques en décomposition. La plupart des individus récoltés dans la nature sont hermaphrodites autofécondants, mais l'on rencontre aussi des mâles, à des occurences très basses⁴.

De même que les autres nématodes, *C. elegans* a la forme d'un cylindre aminci aux deux extrémités, dont le diamètre mesure autour de 0,05 mm pour le jeune adulte. Le plan d'organisation est semblable à celui des autres nématodes : un tube externe, la paroi du corps, comprenant la cuticule (enveloppe externe, rigide) et les muscles, entoure un tube interne constitué des appareils digestif et reproductif (gonades). L'espace intermédiaire, le pseudocoelome ou cavité corporelle, est empli d'un liquide dont la pression est contrôlée par le système osmorégulateur.

C. elegans est un organisme modèle en biologie, au même titre, par exemple, que la levure *Saccharomyces cerevisiae* ou que la souris *Mus musculus*. *C. elegans* a été proposé comme modèle en 1974 par Sydney Brenner [30] afin de comprendre les bases génétiques du développement des organismes pluricellulaires et le fonctionnement du système nerveux [31]. L'intérêt de ce choix réside dans le fait que le nombre de cellules de *C. elegans* est fixe

^{4.} Au laboratoire, des mâles apparaissent spontanément parmi des populations d'hermaphrodites à une fréquence d'environ 0,1 %, ce qui correspond aux rares observations de populations naturelles [28].



FIGURE 1.5 – **Vue d'ensemble du nématode** *Caenorhabditis elegans*. A Photographie d'un hermaphrodite adulte et de deux œufs obtenue par microscopie à contraste interférentiel. Barre d'échelle : 0,1 mm. B Schéma anatomique du ver. Figures tirées de [29].

et reste pratiquement constant tout au long du développement de l'animal. De plus, malgré le faible nombre de cellules (celui-ci est fixe : 959 pour l'hermaphrodite adulte), il s'agit d'un organisme différencié dont on connaît désormais l'intégralité des lignages cellulaires. Ceux-ci ont été reconstruits en suivant chacune des cellules au cours du développement [32] : le ver reste en effet transparent durant toute sa vie. En complément de l'approche génétique, Brenner débuta l'observation par microscopie électronique de coupes sériées du ver, ce qui déboucha sur la détermination de la structure complète du sytème nerveux [33].

Le développement des outils génétiques et l'identification progressive de l'ensemble des gènes de *C. elegans* a entraîné le recours à ce modèle au-delà de l'étude du développement, et le ver a été le premier organisme multicellulaire à voir son génome entièrement séquencé, en 1998. Le nombre de laboratoires utilisant *C. elegans* comme modèle n'a cessé de croître, et il est aujourd'hui étudié dans des domaines aussi différents que les neurosciences, le vieillissement, l'apoptose (mort cellulaire) ou les maladies dégénératives.

De très nombreuses souches sont disponibles sur simple demande au *Caenorhabditis Genetics Center* de l'Université du Minnesota⁵. Le site *Wormbase* [34] propose une base de données sur le génome de *C. elegans* et diverses ressources en ligne (*WormBook, WormAtlas*) témoignent du dynamisme de la communauté *C. elegans*.

Le succès de ce modèle tient à ses atouts dans le cadre d'études génétiques. Il est aisé à cultiver en boîtes de Pétri, sur des gels d'agar recouverts d'un tapis de bactéries *E. coli* dont

^{5.} http://www.cbs.umn.edu/CGC/.



FIGURE 1.6 – **Cycle de développement de** *C. elegans* à 16 °C. Après l'éclosion de l'œuf, les différentes mues délimitent les stades larvaires L1, L2, L3, L4 et le stade adulte. Le stade *dauer* apparaît en l'absence de nourriture ou en cas de surpopulation et peut durer plusieurs mois. La croissance de l'animal dépend de la température de culture [35]. La ponte de l'œuf, l'éclosion et les différentes mues sont indiquées par des tirets; sont également indiqués le temps écoulé depuis la ponte de l'œuf et la taille de l'animal aux différentes mues (à 16°C). D'après [29] et [35].

il se nourrit. La coexistence de deux modes de reproduction (fécondation par un mâle et auto-fécondation) et la possibilité d'obtenir de grandes quantités d'individus en un temps limité facilitent les études génétiques. Le temps de génération est en effet de trois à quatre jours et chaque individu hermaphrodite peut donner naissance par autofertilisation à 300 descendants qui sont des clones de leur unique parent. Si de grandes quantités d'individus sont nécessaires, il est possible de cultiver le ver en milieu liquide. Il existe des protocoles de congélation grâce auxquels les différentes souches peuvent être conservées indéfiniment à -80 °C. Contrairement à d'autres nématodes comme *Ascaris lumbricoides*, ce n'est pas un parasite, ce qui rend son utilisation au laboratoire sans danger.

1.2.2 Cycle de développement

Un individu vit environ deux semaines. Lors de la ponte, l'œuf contient déjà une trentaine de cellules. Depuis l'éclosion de l'œuf jusqu'au stade adulte, la croissance a lieu par mues successives qui délimitent différents stades larvaires (Fig. 1.6), de L1 à L4. La dernière mue aboutit au stade adulte : au bout de quelques heures, la ponte des oeufs commence.

Le cycle de développement peut connaître des bifurcations : ainsi, en l'absence de nourriture, les larves L1 arrêtent leur croissance et peuvent rester 6 à 10 jours dans cet état, avant de reprendre normalement leur développement en présence de nourriture. Par ailleurs, divers facteurs environnementaux (manque de nourriture, température élevée, ou encore une population trop dense) déclenchent la transition du stade L2 vers un stade dit



FIGURE 1.7 – **Système nerveux de** *C. elegans.* Le système nerveux est marqué par la protéine fluorescente GFP. On distingue le ganglion de la tête et l'anneau nerveux (1), la corde nerveuse ventrale (2) et les commissures (3) qui s'étendent jusqu'à la corde dorsale le long de la circonférence du ver, et le ganglion de la queue (4). L'image provient du site de l'équipe de Jean-Louis Bessereau à l'ENS.

dauer durant lequel l'animal cesse de se nourrir et réduit ses déplacements. Le retour à un environnement favorable entraîne la mue vers le stade L4, puis une reprise normale du cycle de développement. *C. elegans* peut ainsi survivre plusieurs mois en attendant des conditions meilleures.

1.2.3 Système nerveux

L'un des attraits de *C. elegans* tient à la relative simplicité de son système nerveux. Un peu moins d'un tiers des cellules (302 chez l'hermaphrodite) sont des neurones. La position de chaque cellule ainsi que les schémas de connectivité entre cellules ont été reconstruits par John White *et al.* [33] à partir des données de microscopie électronique et complétés depuis [36], ce qui a permis de déterminer 118 classes de neurones. L'essentiel des corps cellulaires se trouve dans les ganglions de la tête et, dans une moindre mesure, de la queue. Un faisceau de neurites issus des neurones des ganglions de la tête forme l'anneau nerveux.

Un autre faisceau dense d'extensions dendritiques court tout le long du corps du côté ventral et forme la corde nerveuse ventrale (Fig. 1.7), qui contient aussi les corps de motoneurones qui commandent les muscles de la paroi du corps. Ils y forment des synapses avec les axones des interneurones de commande dont les corps cellulaires se trouvent dans la tête ou dans la queue. Certains motoneurones envoient des extensions le long de la circonférence, les commissures, qui rejoignent la corde nerveuse dorsale, moins importante, qui contient aussi des axones de neurones situés dans la tête ou dans la queue. Les noms des neurones suivent une nomenclature détaillée dans l'annexe A.

Les neurones sont reliés entre eux par environ 7000 synapses, parmi lesquelles on compte des jonctions neuromusculaires et des synapses électriques, (jonctions communiquantes). Il est probable que, dans la plupart des cas, la propagation d'un signal nerveux repose sur des potentiels gradués plutôt que sur des potentiels d'action [37]. En effet, *C. elegans* ne possède pas de canaux sodiques connus dépendants du voltage, et des mesures électrophysiologiques du potentiel des neurones ASA et ASE ont montré qu'effectivement ces neurones ne généraient pas de potentiels d'action. Des potentiels d'action ont cependant pu être enregistrés dans le système nerveux du pharynx [38]. En revanche, il a été montré que la transmission synaptique aux jonctions neuromusculaires se faisait de manière graduée [37]. Les deux systèmes de codage neuronal, digital (potentiels d'action) et analogique (potentiels gradués) coexistent donc chez *C. elegans* avec une prédominance du second.

1.3 Description de la locomotion de *C. elegans*

1.3.1 Habitat naturel de C. elegans

Les premiers specimens de *C. elegans* ont été observés en Algérie à la fin du XIXe siècle [39]. Depuis, des individus ont été isolés en Europe et aux États-Unis, mais aussi à Hawaï ou en Australie [28] [40], ce qui laisse penser que *C. elegans* est présent en de nombreux endroits du monde [41]. Dans la majorité des cas, les milieux où ont été collectés les vers sont d'origine humaine ou modifiés par l'homme : compost, jardins ou terres cultivées [28], champ d'ananas, etc. La souche sauvage N2 qui sert de référence à la communauté *C. elegans*, avec laquelle a été menée une partie des expériences présentées dans cette thèse, provient de champignons en décomposition [42]. L'habitat naturel de *C. elegans* reste donc très peu connu, bien que ces dernières années, des vers aient été recueillis dans la nature, présents dans des plantes en décomposition (fruits, racines, fleurs...) [43]. Tous ces milieux sont des environnements riches en nutriments et en bactéries, qui représentent pour le ver une source de nourriture.

Lors de la récolte d'individus sauvages, *C. elegans* se trouve le plus souvent au stade *dauer* [28], et rarement au stade adulte. Le stade *dauer* pourrait permettre la dispersion sur de grandes distances au moyen d'autres espèces : on trouve ainsi des individus associés à des escargots, des limaces ou encore des isopodes [28], [41].

Les quelques connaissances disponibles sur l'habitat naturel de *C. elegans* suggèrent donc une grande diversité des environnements mécaniques potentiellement explorés, qui contraste avec les conditions de laboratoire.

1.3.2 Modes de locomotion observés en laboratoire

Avant même que *C. elegans* ne s'impose comme un système privilégié d'étude en biologie, Gray et Lissman réunissaient dans un article [44] quelques observations sur la locomotion de cinq nématodes (*Panagrellus*, *Haemonchus*, *Rhabditis*, *Strongylus*, *Turbatrix*) évoluant dans des milieux liquides, sur des gels aqueux, sur des surfaces humides, ou dans des suspensions de particules. Ils notaient la modification des paramètres du mouvement tels que la période ou la longueur d'onde lorsque le milieu change.

Dix ans plus tard Sydney Brenner [30] introduisait *C. elegans* comme modèle en génétique et fixait les conditions de culture au laboratoire. Depuis, la description de la locomotion s'est restreinte au contexte du laboratoire et aux deux situations les plus couramment rencontrées : la reptation sur gel d'agar et la nage en milieu liquide. Cependant ces dernières années ont vu la publication d'analyses de la locomotion dans des environnements plus complexes, tels que des suspensions de particules, des dispositifs microfluidiques, ou des liquides visco-élastiques.



FIGURE 1.8 – **Reptation sur gel d'agar. A** Au laboratoire, *C. elegans* est cultivé dans des boîtes de Pétri (ici, vue du dessus, à gauche), sur un gel d'agar sur lequel on a déposé un tapis de bactéries (tâche claire au centre). À droite, agrandissement du tapis de bactéries : les vers y laissent une trace caractéristique de la reptation. **B** Décomposition de la reptation du ver sur une période du mouvement. Le ver rampe sur le côté : les lettres V et D indiquent respectivement le ventre et le dos de l'animal. Intervalle entre deux photographies : 0,5 s. **C** Visualisation en « volutes » : les formes du ver au cours du mouvement sont réduites à des courbes de différentes couleurs qui sont superposées (le ver progresse vers la droite). Le dérapage latéral sur le substrat est visible (flèches noires). **D** Vue transversale du ver en train de ramper. La réaction élastique du gel, \vec{F}_{gel} , contrebalance la résultante des forces capillaires dues à la présence d'un film d'eau à la surface du gel aqueux.

Reptation

C. elegans est habituellement cultivé dans des boîtes de Pétri, sur gel d'agar peu concentré (1,7 %). À la surface du gel est déposé un tapis de bactéries *Escherichia coli* dont le ver se nourrit (Fig. 1.8A). Dans ces conditions, *C. elegans* se déplace en rampant, c'est-àdire en se déformant périodiquement de manière à propager une onde de courbure depuis la tête vers son extrémité postérieure, à la manière d'autres animaux utilisant la locomotion ondulatoire (Fig. 1.8B). Ces déformations sont limitées au plan dorso-ventral, c'est pourquoi le ver rampe sur le côté. Le sens de propagation peut être inversé, les ondes voyageant depuis la queue vers la tête, afin de se déplacer vers l'arrière. L'intérêt d'un tel mode de locomotion est de tirer parti de l'asymétrie des coefficients de friction visqueuse normal et longitudinal, comme nous le verrons plus loin.

L'enregistrement du mouvement du ver lorsqu'il se déplace sur un gel permet de mesurer les principales caractéristiques physiques de la reptation. Elles sont présentées, ainsi que

	Nage	Reptation
Fréquence (Hz)	2	0,4
Longueur d'onde (mm)	1	0,5
Vitesse de propagation (mm s $^{-1}$)	2	0,2
Amplitude (mm)	0,1	0,05
Vitesse de progression (mm s $^{-1}$)	0,1	0,15

TABLE 1.1 - Grandeurs typiques pour la nage et la reptation. Nage en milieu liquide (M9) et reptation sur gel d'agar (1,7%), en l'absence de bactéries.

pour la nage, dans la Table 1.1, dans le cas d'un jeune adulte hermaphrodite. Lorsqu'il rampe, l'animal adopte une forme caractéristique en S, et oscille à une fréquence de l'ordre de 0,5 Hz. Dans sa thèse [45], Pascal Sauvage propose une visualisation du mouvement au cours du temps en « volutes », qui permet d'illustrer la propagation de l'onde, la diminution de l'amplitude à mesure qu'elle progresse vers la queue, et le dérapage latéral (Fig. 1.8C).

Comme le gel est principalement constitué d'eau, le ver trouve à sa surface un mince film de liquide qui le maintient contre le gel par l'action des forces capillaires (Fig. 1.8**D**). L'effet de la gravité est négligeable par rapport à la tension de surface. En effet le rapport de la force capillaire et du poids donne

$$\frac{2\gamma_{eau}L}{\pi R^2 L\rho_{ver}g} \simeq 700. \tag{1.6}$$

Sous l'action des forces capillaires, le ver déforme le gel, qui peut être considéré comme élastique (Fig. 1.8**B**). Le module d'Young du gel vaut approximativement 100 kPa [46], alors que celui du ver, malgré des mesures très disparates, peut être estimé à au moins 10 MPa [47]. La déformation du ver est donc négligeable devant celle du gel.

Plaqué par la capillarité, le corps du ver déforme la surface du gel. Il se forme un canal sur les parois duquel *C. elegans* peut s'appuyer pour avancer. Sauf lorsque la nourriture vient à manquer, ce dernier ne pénètre pas dans le gel et préfère rester à la surface. Son mouvement sur gel d'agar est donc restreint à deux dimensions, à l'interface entre le gel humide et l'air. Le gel n'est pas parfaitement élastique, et la déformation induite par la capillarité n'est pas réversible : le ver laisse derrière lui un sillon visible caractéristique.

Nage

En milieu liquide, le ver nage : on peut ainsi observer le passage de la reptation à la nage lorsqu'une goutte de liquide est déposée sur le gel où rampent des vers. Le liquide utilisé est du M9 : il s'agit d'une solution assurant un pH et une osmolarité adaptés. Sa viscosité est celle de l'eau. Qualitativement, la nage ressemble à la reptation. Cependant les paramètres du mouvement (Table 1.1) diffèrent de ceux de la reptation et donnent l'impression d'un



FIGURE 1.9 – Nage en milieu liquide. A Décomposition de la nage du ver sur une période du mouvement. B Volutes pour la nage, sur une période du mouvement.

mouvement frénétique et désordonné⁶. La fréquence est plus élevée, autour de 2 Hz, et la forme adoptée, celle d'un arc de cercle.

En absence de tout mouvement, le ver sédimente, mais lorsqu'il se déplace, les forces extérieures sont, comme pour la reptation, d'origine visqueuses. Le nombre de Reynolds formé à partir de la vitesse transverse, $V_{perp} = Af \simeq 0.2 \text{ mm s}^{-1}$, de la longueur *L* du ver, de la masse volumique de l'eau et de la viscosité η s'écrit

$$Re = \frac{\rho_{eau} V_{\perp} L}{\eta} = 0, 2. \tag{1.7}$$

L'inertie peut donc être négligée en première approximation, et le mouvement considéré comme s'effectuant à bas nombre de Reynolds, ce qui est confirmé expérimentalement [48]. L'absence de forces capillaires rend l'analyse hydrodynamique de la nage plus aisée que pour la reptation : plusieurs études décrivent l'écoulement autour du ver en train de nager [44] [48].

Pourtant, même s'il est mal connu, l'habitat naturel de *C. elegans* est certainement plus riche du point de vue mécanique, plus complexe et changeant que celui du laboratoire : liquides et films liquides, poreux humides, suspensions de particules de taille hétérogène, etc.

Lors d'analyses génétiques, l'identification de nouveaux mutants repose souvent sur la détection de défauts dans la locomotion de *C. elegans*. Pour cela, deux méthodes quantitatives couramment utilisées consistent à compter le nombre de fois où le ver se courbe, soit dans une goutte de liquide (*thrashing assay*), soit lorsqu'il se déplace sur le gel [49] : nous avons vu que ces deux environnements sont la plupart du temps les seuls qu'a connu un ver lors de son passage au laboratoire.

^{6.} Les termes swimming et thrashing sont indifféremment utilisés en anglais.

Depuis quelques années, des tentatives de replacer *C. elegans* dans des environnements autres que ceux habituellement décrits ont permis d'observer des modifications dans la locomotion qui suggèrent la nécessité de dépasser l'opposition entre nage et reptation (section 1.5).

Dans tous les cas, la progression résulte de la propagation d'une onde de courbure dans la direction opposée à celle du mouvement dans le référentiel du laboratoire. Les nombreuses recherches dont *C. elegans* fait l'objet au titre de système modèle ont permis d'établir une description précise des différents éléments de son système locomoteur, et de dégager quelques principes sur son fonctionnement global.

1.4 Système locomoteur

La naissance et la propagation de l'onde de courbure ainsi que sa modulation par l'environnement résultent de l'interaction de la structure mécanique (squelette hydrostatique), de l'appareil moteur (muscles), et du système de commande constitué par les neurones impliqués dans la locomotion.

1.4.1 Description mécanique du squelette hydrostatique

Cuticule et pression interne participent inégalement au squelette hydrostatique

D'un point de vue mécanique, le ver adulte se présente comme un cylindre d'1 mm de long, aminci aux extrémités, d'un diamètre au centre de 0,05 à 0,08 mm. Son enveloppe extérieure, la paroi du corps, comprend la cuticule, à laquelle sont attachés les muscles et l'hypoderme (Fig.1.11A). L'espace entre les gonades, le pharynx et l'intestin d'une part et la paroi du corps d'autre part, le pseudocoelome, est rempli d'un liquide sous pression.

La valeur de la surpression qui règne à l'intérieur du ver n'a pas été mesurée, mais des mesures effectuées chez *Ascaris lumbricoides*, un autre nématode de dimensions plus importantes (30 cm de long), donnent un intervalle compris entre 2 et 30 kPa [50], soit une fraction de la pression extérieure.

En l'absence d'activité musculaire, le corps prend la forme d'un bâtonnet rigide [45]. Cette forme n'est pas perturbée par une ponction dans la cuticule afin d'égaliser pression extérieure et intérieure ; de même, la rigidité du corps ne s'en trouve pas significativement modifiée [46] : celle-ci est donc essentiellement due à la rigidité de la cuticule.

Cette dernière est formée de plusieurs couches de protéines de collagène [51]. Son épaisseur, de 0,5 microns pour le jeune adulte, augmente avec l'âge.

Modélisations mécaniques

Une modélisation mécanique simple du ver passif consiste à le considérer comme un filament élastique [52]. En l'absence d'activité musculaire, le moment interne passif M^p



FIGURE 1.10 – **Modélisation mécanique du ver. A** Le ver est modélisé comme un filament élastique de module de flexion *b*, courbé dans le plan dorso-ventral, dont les déformations sont décrites par la donnée de la courbure κ en tout point. **B** Modélisation de la cuticule comme un cylindre plein, de rayon *R* (haut) ou comme un cylindre creux, de rayon *R* et d'épaisseur *e* (bas).

en un point d'abscisse curviligne s est réduit à sa composante passive qui s'oppose à la courbure $\kappa(s)$ du bâton,

$$M^p(s) = EI\kappa(s) \tag{1.8}$$

où E est le module d'Young de la cuticule et I le second moment d'inertie. L'expression de I dépend de la géométrie du modèle utilisé. Dans le cas simplifié où le ver est approché par un cylindre plein,

$$I = \frac{\pi R^4}{4}.\tag{1.9}$$

Pour un modèle plus réaliste où l'on considère un cylindre creux, d'épaisseur e,

$$I = \pi R^3 e. \tag{1.10}$$

Le produit *EI* mesure donc la résistance du ver passif à être courbé. Il est aussi possible d'obtenir à partir du module d'Young la raideur *k* du ver pour des petites déformations [45] : si l'on écarte transversalement une extrémité du ver de Δx par rapport à sa position d'origine quand l'autre extrémité est fixée, la force de rappel vaut

$$F = \frac{3}{4}\pi E \frac{R^4}{L^3} = k\Delta x.$$
 (1.11)

Valeurs expérimentales

Les tentatives pour mesurer la rigidité ou la raideur du ver donnent des résultats disparates qui dépendent des méthodes et des modèles utilisées.

Park *et al.* [46] ont mesuré directement l'élasticité de la cuticule en observant les relations force-déplacement obtenues par indentation de la couche externe du ver par une bille de verre de 10 microns. Ils montrent que la rigidité locale ainsi mesurée ne dépend pas de l'endroit du corps qui est sondé. En modélisant la cuticule comme une coquille cylindrique homogène d'épaisseur constante, ils déduisent une valeur du module d'Young effectif de 380 MPa.

Une autre approche, due à Pascal Sauvage [45] et reprise par Fang-Yen *et al.* [47], consiste à fixer une extrémité du ver à l'aide d'un peu de colle ou d'une micro-pipette, à courber ensuite le corps en déplaçant l'extrémité libre, puis à observer la relaxation lorsqu'on la relâche dans un liquide de viscosité déterminée. La rigidité est obtenue soit par comparaison avec un cylindre de PDMS (Polydiméthylsiloxane) de rigidité connue [45] soumis aux mêmes conditions, soit en utilisant le modèle de filament élastique présenté ci-dessus [47]. La première méthode conduit à une estimation du module d'Young de 7 MPa, la seconde à un module d'Young de 13 MPa⁷.

La différence avec la valeur obtenue par Park *et al.* [46] est peut-être due à une asymétrie dans la rigidité de la cuticule : en effet celle-ci est déformée dans le plan de la circonférence par les expériences d'indentation, alors que la courbure a lieu dans un plan contenant l'axe longitudinal du ver dans les expériences de relaxation. La cuticule serait donc plus déformable dans le deuxième cas. Cette hypothèse est cohérente avec l'observation que les vers soumis à un choc hyperosmotique ont tendance à diminuer leur longueur plus que leur diamètre (22% de diminution pour la longueur contre 2% pour le diamètre, [46]). La structure de la cuticule, qui alterne anneaux et sillons dans le plan de la circonférence, pourrait expliquer cette asymétrie en permettant la compression des sillons lors de la courbure du corps.

Une dernière mesure plus indirecte, due à Sznitman *et al.* [53], repose sur l'ajustement de données expérimentales par un modèle biomécanique du ver lorsqu'il nage. Cette méthode fournit un module d'Young de 3 kPa seulement. Comme il est noté dans [47], cette faible valeur peut s'expliquer par la sensibilité du modèle utilisé à des suppositions sur le schéma d'excitation musculaire à l'origine des déformations de la cuticule.

Bien que les propriétés mécaniques de la cuticule changent avec le stade de développement, les modules d'Young proposés, comparables à celui du collagène, montrent que la cuticule est un tissu relativement rigide si on le compare à d'autres tissus⁸. La cuticule élastique et la pression hydrostatique contribuent inégalement à la rigidité du ver et fournissent une structure déformable sur laquelle les muscles s'appuient pour courber localement le corps lors de la locomotion. On parle pour cela de squelette externe ou squelette hydrostatique, par analogie avec le squelette des vertébrés.

^{7.} Les valeurs obtenues sont certes proches, mais dans le premier cas le ver est modélisé par un cylindre plein ; dans le second cas, par un cylindre creux d'épaisseur 0,5 micron. Le produit *EI*, qui mesure la résistance effective à la courbure, vaut dans le premier cas 10^{-12} N m² et dans le second cas, environ 10^{-13} N m².

^{8.} À titre de comparaison, la rigidité d'une cellule de mammifère vaut environ 10 kPa [54].



FIGURE 1.11 – Appareil locomoteur. A Squelette hydrostatique. Section transverse du corps du ver. À la cuticule rigide sont attachés l'hypoderme, la lame basale (orange) et les muscles. La surface extérieure de la cuticule présente une alternance d'anneaux et de sillons qui entourent le corps dans le sens de la circonférence, et des stries longitudinales (alae). D'après [29]. B Muscles de la locomotion. Il est possible de distinguer les muscles servant à la locomotion suivant leur innervation entre muscles de la tête, muscles du cou et muscles du tronc (haut). Une coupe transversale du ver (bas) montre l'organisation des muscles en quadrants comprenant chacun deux rangs de cellules. Les cellules musculaires projettent des extensions, les bras musculaires, vers les motoneurones qui les innervent. Les axones des motoneurones se trouvent dans les cordes nerveuses ventrale (VNC) et dorsale (DNC). D'après [55].

1.4.2 Muscles de la locomotion

C. elegans possède 95 cellules musculaires disposées tout le long du corps afin d'autoriser la courbure en tout point. Les cellules musculaires sont très proches les unes des autres et les cellules adjacentes sont couplées par des synapses électriques [55]. Elles sont attachées à l'hypoderme et à la cuticule, mais aussi entre elles. Leur direction de contraction est parallèle à l'axe du ver. Les cellules musculaires sont organisées en quatre faisceaux qui correspondent aux quatre quadrants dorsal droit, dorsal gauche, ventral droit, ventral gauche (Fig. 1.11**B**). Le dernier quadrant ne contient que 23 cellules, alors que les trois premiers en contiennent 24.

Les cellules musculaires disposent d'extensions non contractiles, les bras musculaires, qui rejoignent les neurones moteurs qui les innervent. Les bras musculaires des deux quadrants ventraux s'étendent vers la corde nerveuse ventrale alors que ceux des quadrants dorsaux viennent au contact des axones de la corde dorsale. L'information est transmise depuis les motoneurones vers les muscles par les jonctions neuromusculaires. Ce sont des synapses chimiques comparables à celles qui existent entre neurones, qui peuvent être excitatrices (la dépolarisation du motoneurone entraîne la contraction musculaire) ou inhibitrices (la dépolarisation entraîne la relaxation du muscle).

Les muscles de la paroi du corps se rangent en trois catégories selon leur innervation, qui dépend de leur position [33] (Fig. 1.11 **B**). Les muscles de la tête, qui comprennent les quatre cellules antérieures de chaque quadrant (16 cellules au total), sont innervés par les motoneurones de la tête. Chaque rang de cellules est innervé séparément, ce qui autorise

des mouvements complexes de la tête, dans toutes les directions. Les quatre cellules suivantes de chaque quadrant, les muscles du cou, sont innervées à la fois par des neurones de la tête mais aussi par ceux de la corde nerveuse ventrale. Les cellules restantes forment les muscles du corps et établissent des jonctions neuromusculaires uniquement avec les motoneurones de la corde nerveuse ventrale. Ceux-ci innervent systématiquement soit les deux quadrants ventraux, soit les deux quadrants dorsaux, ce qui entraîne la contraction, soit des deux quadrants ventraux, soit des deux quadrants dorsaux. Les déformations du corps lors de la locomotion sont donc restreintes au seul plan dorso-ventral.

1.4.3 Neurones impliqués dans la locomotion

Le squelette hydrostatique et les muscles du corps, dont le rôle est non seulement de vaincre la résistance due à l'élasticité de la cuticule et à la pression hydrostatique maintenue à l'intérieur du ver, mais aussi la résistance éventuelle du milieu extérieur, forment l'appareil locomoteur de *C. elegans*. La commande appropriée de cet appareil se fait par le système nerveux, en particulier par le sous-système dédié à la locomotion. L'excitation et l'inhibition coordonnées des cellules musculaires permet la propagation de l'onde de contraction musculaire le long du corps, qui se traduit par la propagation de la déformation dans le sens nécessaire à la progression du ver.

Les neurones impliqués dans le circuit moteur ainsi que le câblage neuronal sont connus grâce à la reconstruction du système nerveux obtenue par observation de coupes au microscope électronique [33, 36]. Il manque cependant un modèle qui expliquerait la génération de l'onde musculaire et les mécanismes par lesquels elle se propage.

Les neurones du circuit moteur sont hiérarchisés en trois groupes, qui correspondent à des connections synaptiques et à des fonctions distinctes. Les neurones sensoriels détectent les stimuli extérieurs (mécaniques, chimiques...) et envoient des signaux aux interneurones ou neurones de commande. Ceux-ci activent ou inhibent les motoneurones, qui forment des jonctions neuromusculaires avec les muscles. Leur fonction est donc de provoquer la contraction ou la relaxation de ces derniers.

Après une revue des rôles de chaque type de neurone dans la locomotion, nous présenterons un exemple connu, le réflexe entraînant une marche avant ou une marche arrière après une légère stimulation mécanique (« toucher léger »), qui montre comment l'organisation du système nerveux permet à *C. elegans* de choisir sa direction en fonction d'un stimulus mécanique.

Motoneurones

Sur les 302 neurones que possède l'hermaphrodite adulte, 113 sont des motoneurones [55]. Parmi ceux-ci, 75 innervent les muscles du cou et du reste du corps. Les corps cellulaires de la plupart des ces neurones sont disposés soit le long de la corde nerveuse ventrale, soit dans un des deux ganglions de la tête ou de la queue. Les neurones commandant la con-



FIGURE 1.12 – Motoneurones et interneurones. A Emplacement des motoneurones et interneurones. Les corps cellulaires des interneurones se trouvent dans les ganglions de la tête et de la queue; leurs axones se prolongent le long de la corde nerveuse ventrale (VNC) ou dorsale (DNC). Les corps cellulaires des motoneurones sont disposés tout au long de la corde nerveuse ventrale. Les motoneurones qui innervent les muscles des deux quadrants dorsaux projettent des extensions dendritiques (commissures) le long de la circonférence pour rejoindre et former la corde nerveuse dorsale. Les couleurs dénotent l'appartenance au circuit de la marche avant (rouge) ou arrière (bleu). B Interneurones. Le marquage par fluorescence de quelques interneurones impliqués dans la locomotion (AVA, AVD, AVE et PVC) montre les corps cellulaires dans les ganglions de la tête et de la queue et les axones formant la corde nerveuse ventrale. Figures tirées de [55].

	A	GABA	
Ventraux	VB (12)	VA (12)	VD (13)
Dorsaux	DB (7)	DA (9)	DD (6)

TABLE 1.2 – **Classes de motoneurones.** Entre parenthèses, à côté de chaque classe, est indiqué le nombre de cellules dans la classe. Les neurones utilisant l'acétylcholine comme neurotransmetteur dans les jonctions neuromusculaires appartiennent soit au circuit contrôlant le déplacement vers l'avant (type B), soit au circuit contrôlant le déplacement vers l'arrière (type A). Les neurones de type D, GABAergiques, servent à coordonner la contraction et la relaxation musculaire des muscles ventraux et dorsaux.

traction ou l'inhibition des muscles des deux quadrants dorsaux projettent leurs axones le long de la circonférence du ver pour former un faisceau dorsal que viennent rejoindre les bras musculaires des muscles dorsaux.

Les motoneurones se rangent en différentes classes, suivant la nature des synapses qu'ils forment avec les cellules musculaires, la position dorsale ou ventrale des cellules innervées, et suivant leur appartenance au sous-circuit commandant la marche avant ou la marche arrière (Table 1.2). Les neurones de **type B** : VB et DB, cholinergiques, provoquent la contraction des muscles du ventre et du dos respectivement, lors de la marche avant ; de même, les neurones de **type A** : VA et DA, eux aussi cholinergiques, excitent les muscles lors de la marche arrière ; les neurones de **type D**, (VD et DD) sont GABA-ergiques : les jonctions neuromusculaires sont donc inhibitrices. Ils sont post-synaptiques aux motoneurones de type A et B.

Répartis tout au long du corps, les neurones de chaque classe permettent la contrac-



FIGURE 1.13 – Innervation des muscles et inhibition contralatérale. A L'activation des motoneurones VA, VB, DA et DB, cholinergiques, provoque la contraction des muscles. Au contraire, les neurones DD et VD sont GABAergiques et les jonctions neuromusculaires sont inhibitrices et entraînent la relaxation des muscles. Reproduit depuis [29]. B L'organisation des motoneurones permet l'inhibition contralatérale : l'excitation des muscles ventraux coïncide avec la relaxation des muscles dorsaux et réciproquement. Cette organisation se répète tout au long du corps. Adapté de [56].

tion et la relaxation coordonnée des muscles ventraux et dorsaux afin de courber le corps localement, grâce au jeu des synapses excitatrices et inhibitrices [56]. Le mécanisme de l'inhibition contra-latérale est détaillé en Figure 1.13.

Interneurones

L'activité des motoneurones dépend de l'information transmise par les interneurones ou neurones de commande impliqués dans la locomotion. Les corps cellulaires de ces derniers se trouvent dans le ganglion de la tête (AVA, AVB, AVD, AVE) ou dans la queue (PVC) mais tous projettent leurs axones le long de la corde nerveuse où ont lieu les synapses avec les motoneurones (Fig. 1.12**B**).

Les motoneurones de type A sont post-synaptiques à AVA, AVD, AVE, ceux de type B à PVC et AVB 1.14. Les contacts entre interneurones et motoneurones, ainsi que les contacts entre interneurones, sont de type synapses électriques et synapses chimiques.

Neurones sensoriels

Divers stimuli affectent la locomotion de *C. elegans*. Exposé à certaines substances chimiques, le ver se dirige vers les fortes concentrations ou bien s'en éloigne, suivant qu'elles sont attractives ou répulsives [57]. *C. elegans* a tendance à se déplacer suivant les isothermes [58]; à éviter la lumière [59]; à ramper en descendant le potentiel dans
un champ électrique [60]. Enfin, toute une gamme de stimuli mécaniques provoquent des réactions d'évitement ou la modulation de la locomotion.

Les données extérieures sont perçues par l'intermédiaire des neurones sensoriels dont la plupart se trouvent dans la tête. Nous nous restreindrons ici aux neurones mécanosensoriels. La variété des stimuli mécaniques rencontrés dans la nature est sans doute très importante. Dans le cadre du laboratoire, ceux-ci se restreignent à quelques catégories [61] :

- toucher léger : toucher doucement le ver avec l'extrémité d'un cil provoque un mouvement de fuite vers l'avant si l'on a touché la moitié postérieure du corps, vers l'arrière sinon. Six neurones ont été identifiés qui permettent de ressentir cette stimulation légère. Les mêmes neurones sont impliqués dans la marche arrière qui suit habituellement des tapotements sur le bord de la boîte de culture;
- toucher appuyé : lorsqu'on appuie sur le ver avec un fil de platine, plus rigide, cela entraîne aussi un mouvement de fuite. Les neurones mécanosensoriels sollicités (PVD gauche et droit) sont différents du cas précédent;
- sensibilité du nez : un ensemble de neurones (ASH, OLQ et FLP) situés autour de la bouche détectent les obstacles rencontrés par la tête : les animaux font immédiatement demi-tour;
- sensibilité à la texture : on observe une diminution de la vitesse lorsque le ver rencontre un tapis de bactéries ou de billes de taille comparable à celle des bactéries [62]. Ce ralentissement est dû à l'activité de trois neurones, CEP, ADE et PDE, grâce auxquels est perçue la texture du milieu exploré.

Par ailleurs, *C. elegans* est sensible au degré de courbure de son propre corps (proprioception), par l'intermédiaire d'au moins un neurone, DVA. Des canaux ioniques dont l'ouverture est contrôlée par l'étirement de la membrane entraînent la dépolarisation de DVA lorsque la courbure augmente [63]. Il a été proposé de plus que les motoneurones de type A et de type B de la corde nerveuse ventrale puisse être porteurs de tels capteurs de l'étirement [55].

Circuit marche avant/arrière

La décision de se déplacer vers l'avant ou vers l'arrière en fonction des stimuli mécaniques perçus est le résultat de l'interaction des trois types de neurones décrits ici : neurones sensoriels, interneurones, neurones moteurs (Fig. 1.14). La reconstruction du circuit neuronal (neurones impliqués, connections entre ces neurones, nature des synapses, rôle de chaque cellule au sein du réseau) est le fruit de la combinaison de plusieurs techniques habituellement utilisées en neurobiologie de *C. elegans*.

La localisation des corps cellulaires des neurones et les liens existant entre eux, ainsi que l'isolement d'un sous-circuit dévolu à la locomotion, est rendue possible par des coupes du ver observées par microscopie électronique [64]. À partir de ce premier schéma,



FIGURE 1.14 – Circuits simplifiés de la marche avant et de la marche arrière – réponse au toucher léger. En haut : emplacement des neurones mécanosensoriels du toucher léger (voir chapitre 3). Un léger toucher sur la partie antérieure du ver est détecté par les neurones mécanosensoriels ALM et AVM, ce qui entraîne la dépolarisation de AVD en même temps que l'inhibition de AVB et PVC, avec pour conséquence l'activation du circuit de la marche arrière. Un toucher sur la moitié postérieure est ressenti par l'intermédiaire de PLM et déclenche la marche avant en excitant PVC et en inhibant AVB et PVC. Le neurone PVM ne semble pas intervenir dans la réponse locomotrice au toucher léger. La réponse au toucher appuyé est médiée par PVD et emprunte les mêmes voies. Adapté de [29].

la fonction de chaque neurone est identifiée grâce à la suppression sélective de cellules individuelles par ablation laser [65]. On peut ainsi vérifier que l'absence des motoneurones DA empêche le déplacement vers l'arrière, alors que celle des neurones DB empêche le mouvement vers l'avant. De même il est possible de classer les neurones de commande parmi ceux dont l'ablation perturbe le déplacement avant (AVB et PVC) ou arrière (AVA et AVD) [55]. Un retour au schéma de câblage initial confirme que les deux premiers interneurones sont reliés aux motoneurones de classe B, quand les deux suivants le sont aux motoneurones de classe A.

L'organisation du système locomoteur de *C. elegans* laisse apparaître une hiérarchie entre les différents niveaux constitués par les neurones sensoriels, interneurones, motoneurones, muscles, cuticule élastique qui correspond au sens du flux d'information, depuis la détection d'éventuels stimuli mécaniques, chimiques, thermiques... jusqu'à la déformation locale et coordonnée du squelette hydrostatique afin d'assurer la propulsion vers l'avant ou vers l'arrière dans la direction adaptée.

Cette structure est complétée par la présence, à de multiples niveaux, de couplages latéraux. Neurones sensoriels, interneurones et motoneurones d'une même classe forment entre eux des synapses électriques; de même, les muscles adjacents d'un même quadrant sont couplés électriquement par des jonctions communiquantes [66]. Enfin, la gamme de déformations possibles du corps est limitée par l'élasticité de la cuticule.

Le câblage des motoneurones entre eux est tel que l'excitation des muscles ventraux entraîne la relaxation des muscles dorsaux, et récriproquement. L'inhibition contra-latérale existe même en l'absence des interneurones. L'ablation de ces derniers n'empêche pas non plus la propagation de l'onde de courbure le long du corps, du moins en l'absence de stimulus mécanique, ce qui suggère la relative indépendance des motoneurones par rapport aux interneurones, ainsi que leur importance lors de la propagation de la contraction musculaire.

1.4.4 Origine des oscillations et propagation de l'onde

Comment les éléments du système locomoteur (squelette hydrostatique, muscles, neurones) se coordonnent-ils pour pour produire la déformation du corps et sa propagation ? En particulier, d'où viennent les rythmes de la locomotion, et comment l'onde se propaget-elle le long du corps ? Les modèles présentés ci-dessous cherchent à expliquer au niveau neuronal la production de l'onde de contraction musculaire.

L'hypothèse des récepteurs à l'étirement

Les modèles proposés pour expliquer l'origine des oscillations dans l'activité musculaire et leur coordination à l'échelle du ver pour propager l'onde de courbure ont en commun de postuler l'existence de canaux ioniques sensibles à l'étirement de la membrane. Il a en effet été suggéré [33] que les prolongations dendritiques des motoneurones de type A et B puissent porter sur leur membrane de tels canaux. Ces prolongations s'étendent en effet bien au-delà de la zone d'innervation des cellules musculaires, sur un cinquième environ de la longueur du corps, et ne présentent ni synapses, ni jonctions neuromusculaires. L'activation de ces canaux mécanosensibles, due à la déformation d'une région distante du corps cellulaire, entraînerait ainsi la contraction musculaire dans la zone active (Fig. 1.15A).

L'argument principal en faveur d'un rôle de ces prolongations dans la propagation de l'onde est lié à leur direction : les neurones de type A, qui contrôlent la locomotion vers l'arrière, étendent leurs dendrites antérieurement au corps cellulaire ; ceux des neurones de type B, contrôlant la locomotion avant, postérieurement au corps cellulaire. Cette disposition est cohérente avec un modèle qualitatif de la propagation des ondes (Fig. 1.15**B**).

Ces canaux ioniques récepteurs à l'étirement n'ont toutefois pas pu être observés, ni la dépolarisation des motoneurones suite à l'étirement de leur membrane. Tavernarakis [67] a proposé que le gène *unc-8* code pour une sous-unité d'un tel canal ionique. Il a été montré par ailleurs que *trp-4* code pour un canal sensible à l'étirement [63]. Cependant le neurone DVA, où agit cette protéine, n'est pas un motoneurone, et semble impliqué dans le contrôle global de la courbure maximale du corps plutôt que dans la génération et la propagation des ondes (voir chapitre 3).

Existence éventuelle d'un générateur central de rythme

L'étude des rythmes de la locomotion animale et des mécanismes neuronaux qui les produisent ont conduit à la découverte des générateurs centraux de rythmes ⁹ [68]. Il s'agit de sous-ensembles du système nerveux, capables de produire des rythmes en l'absence d'excitation oscillante, autonomes par rapport aux informations sensorielles afférentes ¹⁰. Les schémas d'excitation musculaire ainsi produits sont périodiques et assurent la contraction et la relaxation coordonnée des muscles afin, par exemple, de déformer une partie du corps ou de bouger un membre. L'autonomie de ces circuits permet de les détacher physiquement du système nerveux et de les étudier *in vitro* afin de reproduire des schémas fictifs d'excitation.

De tels générateurs ont pu être isolés dans le cas d'animaux utilisant la locomotion ondulatoire : la sangsue [69], la lamproie [70], ou encore le têtard [71]. Dans tous ces cas la propagation de l'onde de déformation repose sur la coordination d'oscillateurs disposés

^{9.} Les mêmes générateurs centraux sont à l'origine d'autres activités rythmiques telles que la mastication ou la respiration.

^{10.} En cela ils se distinguent des mécanismes de réflexe.



FIGURE 1.15 - Rôle potentiel des récepteurs à l'étirement. A Les motoneurones de type A et B possèdent de longues extensions qui pourraient être porteuses de récepteurs à l'étirement. L'état du motoneurone dépend dans cette hypothèse de l'étirement de la portion de la membrane portant les récepteurs, son étirement entraînant l'ouverture de ces derniers. B Un modèle qualitatif de propagation de l'onde de courbure par l'intermédiaire de ces récepteurs montre comment la courbure du corps en une région distante du corps cellulaire d'un motoneurone entraîne la contraction des muscles innervés par ce dernier. Adapté de [67].

tout le long du corps.

Dans le cas de *C. elegans*, il n'existe pas de preuve de l'existence d'un ou de plusieurs générateurs centraux à l'origine des déformations périodiques observées. Cependant, le modèle numérique proposé par Karbowski [72] suppose la présence d'un générateur central situé dans le ganglion de la tête du nématode. Dans ce modèle, les oscillations naissent dans ce circuit avant d'être communiquées au reste du corps par l'intermédiaire des muscles du cou, puis d'être propagées grâce aux récepteurs à l'étirement des motoneurones.

À l'inverse du modèle précédent, Bryden *et al.* [73] ont montré, toujours à l'aide de simulations, que les rythmes de la locomotion peuvent être produits par réflexe en tout point du corps par un circuit minimal constitué des seuls neurones moteurs VB et DB couplés à l'interneurone AVB. Ce modèle nécessite une mesure de la courbure par des récepteurs à l'étirement par les motoneurones, à la fois locale (pour produire les oscillations) et non-locale (pour synchroniser entre eux les oscillateurs et propager l'onde de contraction). Dans cette hypothèse, la génération des oscillations repose fortement sur un retour sensoriel : il n'y a donc pas de générateur central.

Rôle des interneurones

Les interneurones ne sont pas requis pour avancer. Les animaux ayant subi une ablation de tous les interneurones de commande sont toujours capables de propager l'onde de courbure [74]. Les interneurones semblent avoir un rôle de modulation : par exemple dans le modèle de Bryden [73] la dépolarisation de AVB entraîne une augmentation de la fréquence globale des oscillations. Les interneurones contrôlent donc l'ensemble du système produisant et propageant les oscillations, comme l'illustre le basculement de la marche avant vers la marche arrière. En revanche, ils ne semblent pas jouer de rôle dans la génération des rythmes.

Les modèles des mécanismes neuronaux expliquant la naissance et la propagation des ondes de courbure sont des modèles numériques. Ils révèlent l'importance du retour mécanosensoriel et le rôle joué par les récepteurs à l'étirement, même lorsqu'est supposée l'existence d'un générateur central de rythme. Ils ne prennent cependant en compte ni les forces extérieures ou internes qui perturbent ce retour, ni le couplage mécanique dû à l'élasticité de la cuticule, qui impose des contraintes sur la forme des ondes générées [75]. À l'opposé, les modèles biomécaniques tels que celui présenté par Fang-Yen *et al.* [47] (discuté chapitre 4) ne proposent pas de mécanisme neuronal pour la génération du moment musculaire.

Ceci rend difficile la confrontation des modèles avec les données expérimentales. En particulier, les modèles évoqués n'ont pas permis de trancher sur l'existence, comme chez d'autres espèces possédant des systèmes nerveux plus complexes, de générateurs centraux des rythmes de la locomotion. De plus, ils reposent sur l'hypothèse de la présence de récepteurs à l'étirement dans les motoneurones, qui n'a pas pu être prouvée expérimentalement. Un modèle intégrant les aspects neuronaux et biomécaniques et sa validation par l'observation de l'activité des neurones et des muscles restent à élaborer.

1.5 Interactions avec l'environnement mécanique

Le système locomoteur produit et propage une onde de courbure le long du corps. La géométrie élancée du ver ainsi que les forces de friction exercées par le milieu où il se déplace expliquent comment les déformations engendrées par cette onde se traduisent en propulsion vers l'avant. Des expériences dans divers environnements mécaniques montrent que l'influence de ces derniers sur la locomotion ne se limite pas à expliquer la vitesse de progression : *C. elegans* semble modifier les caractéristiques de l'onde en fonction du milieu. Pour un milieu mécanique donné, la vitesse de progression réelle est donc fonction



FIGURE 1.16 – Chute d'un cylindre dans un liquide newtonien. Les vitesses sont tracées en traits pleins et les forces en pointillés. La vitesse de chute dépend de l'orientation du cylindre, verticale (gauche), horizontale (centre), ou d'inclinaison quelconque (à droite, 45°). Dans ce dernier cas, la vitesse forme un angle α avec l'axe principal du cylindre. Ceci est dû à la différence des coefficients de friction normal et longitudinal. Sur ce dernier schéma, les composantes normale et longitudinale de la vitesse sont tracées en tirets.

de la vitesse de l'onde, cette dernière étant elle-même modulée par le ver en fonction du milieu.

1.5.1 Effets de la friction sur la vitesse de progression

Le modèle présenté ci-dessous est dû à James Gray [76]. Élaboré pour expliquer la propulsion des spermatozoides de l'oursin, il s'applique à de nombreux autres animaux qui ont en commun de se déplacer dans des environnements dominés par la friction. Il relie la vitesse effective de progression de l'animal aux caractéristiques de l'onde de déformation et à la nature de la friction entre le corps et le milieu environnant. Le modèle a été appliqué au cas de la locomotion de *C. elegans* par R. Alexander [1].

La progression du ver par propagation d'une onde de courbure peut sembler paradoxale. Les forces de friction visqueuse qui s'exercent sur le ver en mouvement s'opposent aux déplacements locaux du corps : il est difficile de voir d'où vient la composante positive des forces de friction qui équilibre la traînée. Nous allons voir que la locomotion de *C. elegans* tire parti de l'asymétrie des coefficients de friction due à la géométrie élancée de son corps.

Coefficients de friction visqueuse pour un cylindre

Pour comprendre quel rôle joue l'anisotropie de friction lors de la locomotion, considérons un cylindre de longueur L en train de tomber à travers un liquide visqueux, de viscosité η , sous l'influence de la gravité (Fig. 1.16).

Si l'axe principal du cylindre est aligné avec la verticale, la force visqueuse qui s'oppose à l'action de la gravité est proportionnelle à la vitesse de chute V,

$$\mathbf{F}_{\mathbf{l}} = -C_l L \mathbf{V} \tag{1.12}$$

où C_l est le coefficient de friction longitudinal par unité de longueur, proportionnel à la viscosité et fonction du rayon et de la longueur du cylindre. Celui-ci tombe donc avec une vitesse constante, de norme

$$V = \frac{mg}{C_l L}.$$
(1.13)

Si l'axe principal est aligné avec l'horizontale, la force de traînée visqueuse diffère du cas précédent, puisque

$$\mathbf{F}_{\mathbf{n}} = -C_n L \mathbf{V},\tag{1.14}$$

où C_n caractérise la force de frottement perpendiculairement à l'axe. La norme de la vitesse de chute vaut donc

$$V = \frac{mg}{C_n L}.$$
(1.15)

Dans la limite d'un cylindre dont la longueur est très grande devant le diamètre, il est possible de calculer la valeur des coefficients de friction en fonction de la viscosité et des dimensions du cylindre. Ainsi, pour un cylindre de longueur L et de diamètre D [77],

$$C_l = \frac{2\pi\eta}{\ln(L/D) - 0.2}$$
(1.16)

$$C_n = \frac{4\pi\eta}{\ln(L/D) - 0.2}.$$
 (1.17)

Pour un ellipsoïde de révolution de longueur L et de rayon maximal R [78],

$$C_n = \frac{4\pi\eta}{\ln(L/R) + 0.5}$$
(1.18)

$$C_l = \frac{2\pi\eta}{\ln(L/R) - 0.5}.$$
 (1.19)

Dans les deux cas, le rapport des coefficients de friction C_n/C_l vaut 2. La vitesse de chute lorsque le cylindre tombe à la verticale est donc deux fois plus grande que dans lorsqu'il tombe à l'horizontale : ceci traduit une plus grande résistance du milieu lorsque le cylindre se déplace perpendiculairement à son axe principal.

Dans le cas général où le cylindre forme un angle θ avec la verticale, celui-ci tombe de telle sorte que la vitesse forme un angle α avec l'axe principal du cylindre. Les forces de friction longitudinale et normale valent alors

$$F_l = -C_l L V_l \tag{1.20}$$

$$= -C_l L V \cos \alpha \tag{1.21}$$

$$F_n = -C_n L V_n \tag{1.22}$$

$$= -C_n LV \sin \alpha. \tag{1.23}$$

La projection du principe fondamental de la dynamique sur les directions longitudinale et normale,

$$mg\cos\theta - C_l LV\cos\alpha = 0 \tag{1.24}$$

$$mg\sin\theta - C_n LV\sin\alpha = 0 \tag{1.25}$$



FIGURE 1.17 – Description cinématique du ver progressant à deux dimensions. A Un point du ver est repéré par son abscisse curviligne *s*, variant entre 0 (tête) et 1 (queue). Sa position dans le référentiel du laboratoire est donnée par (x, y). On lui associe un segment élémentaire de longueur δs . B Décomposition de la vitesse d'un segment élémentaire (centre) et de la résultante de la force de friction (droite) sur le repère local (**l**, **n**) (gauche).

permet de déterminer la valeur de V et la valeur de α .

Progression du ver par dérapage

Nous avons ici considéré un cylindre dans un liquide visqueux, mais la linéarité entre composantes normale et longitudinale de la force de friction d'une part, et les composantes correspondantes de la vitesse d'autre part, reste vraie dans d'autres situations dominées par la friction. En revanche, le rapport entre les coefficients de friction normal et longitudinal peut ne pas valoir 2 comme ci-dessus – même s'il reste en règle générale supérieur à 1.

Ainsi, un petit élément δs du ver se déplaçant à deux dimensions possède une vitesse V(s,t), dépendant de sa position *s* sur le ver et de l'instant *t* du cycle d'ondulation auquel on le considère (Fig. 1.17). D'après ce qui précède, l'environnement exerce sur le segment δs une force qui s'oppose à son mouvement, que l'on peut décomposer dans le repère local (l,n),

$$\delta \mathbf{F} = \delta F_l \mathbf{l} + \delta F_n \mathbf{n} \tag{1.26}$$

avec

$$\delta F_l = -C_l V_l \delta s \tag{1.27}$$

$$\delta F_n = -C_n V_n \delta s \tag{1.28}$$

où les coefficients C_l et C_n caractérisent la friction dans les directions longitudinale et normale par unité de longueur¹¹.

Si l'on note θ l'angle formé par le segment avec la direction des *x* croissants, la composante horizontale de la force de traînée visqueuse s'écrit

$$\delta F_x = \delta F_l \cos \theta - \delta F_n \sin \theta. \tag{1.29}$$

Le premier terme, $\delta F_l \cos \theta$, est toujours négatif; en revanche, le deuxième terme, $-\delta F_n \sin \theta$, est positif (Fig. 1.17). Dans ce cas, la propulsion vers l'avant provient donc de la contribution de la composante normale de la force de frottement.

L'action du segment élémentaire sur son support est alors comparable à celle d'un patin à glace sur la surface de la patinoire : la friction est plus forte perpendiculairement à la lame du patin que parallèlement à celle-ci, grâce à la géométrie de la lame. En déplaçant le patin perpendiculairement à la direction de la lame, il est ainsi possible de progresser vers l'avant. L'alternance des appuis entre droite et gauche annule la contribution δF_y perpendiculaire à la direction de permet l'avancée selon l'axe des x.

Lors de la locomotion, les contributions des forces exercées par le milieu sur chaque segment s'ajoutent, et la résultante

$$F_x = \int_{s=0}^{s=L} \delta F_x \tag{1.30}$$

est la seule force s'exerçant sur le ver lors de son déplacement. Si le ver se déplace à vitesse constante,

$$\int_{s=0}^{s=L} \delta F_x = 0. \tag{1.31}$$

Si l'on suppose que la forme du ver peut être décrite par une onde se propageant de la tête vers la queue,

$$y(s,t) = A \sin\left[\frac{2\pi}{\lambda}\left(x + V_w t\right)\right]$$
(1.32)

alors Alexander a montré (annexe C) que la force qui s'exerce sur une portion du ver correspondant à une longueur d'onde, dans la limite des petites amplitudes, s'écrit

$$F_{x} = \frac{2A^{2}\pi^{2}}{\lambda} \left[(C_{n} - C_{l})V_{w} - C_{n}V_{x} \right] - C_{l}\lambda V_{x}.$$
(1.33)

^{11.} Il s'agit d'une approximation : on fait l'hypothèse que la force de friction qui s'exerce sur un segment élémentaire est égale à celle qui s'exercerait sur la même longueur d'un cylindre infiniment long de même diamètre, animé de la même vitesse. De plus, on considère que les écoulements engendrés par le déplacement d'un segment n'ont pas d'influence sur les forces s'exerçant sur un autre segment.



FIGURE 1.18 – Segments de contribution maximale. A Une décomposition alternative de la vitesse locale fait apparaître vitesse de l'onde et vitesse de glissement. B Les segments de contribution maximale (indiqués en rouge) correspondent aux inclinaisons extrémales, ceux dont l'inclinaison est nulle (en vert) ne participent pas à la propulsion vers l'avant.

D'après (1.31), si la longueur du ver est infinie ou si sa forme correspond à un nombre entier de longueurs d'onde,

$$\frac{V_x}{V_w} = \frac{1 - (C_l/C_n)}{1 + (C_l/C_n)\frac{\lambda^2}{2A^2\pi^2}}.$$
(1.34)

La vitesse de progression réelle, V_x , dépend donc non seulement de la forme et de la fréquence de l'onde de courbure, mais aussi de la friction entre le ver et le substrat. C_n étant généralement supérieur à C_l , elle est nécessairement inférieure à la vitesse de propagation des ondes, V_w : ceci traduit le glissement du ver sur le substrat. Dans le cas où les coefficients de friction normal et longitudinal sont égaux, $V_x = 0$ quelque soit la vitesse de l'onde et le ver n'avance pas. Si la friction normale est très grande devant la friction longitudinale, il y a égalité entre la vitesse de progression et la vitesse de l'onde.

On peut définir une vitesse de glissement,

$$V_g = V_w - V_x, \tag{1.35}$$

que l'on interprète de la manière suivante : il existe un référentiel où le ver rampe sans dérapage latéral, à la vitesse V_w ; ce référentiel est lui-même en translation par rapport au référentiel du laboratoire et animé d'une vitesse $-V_x \mathbf{e}_x$.

Segments de contribution maximale

Quelles sont les parties du corps qui participent significativement à la propulsion vers l'avant, à un instant donné ? Autrement dit, quelle est la contribution $\delta F_x(\theta)$ d'un segment élémentaire à la force de poussée, et pour quelles valeurs de θ est-elle maximale ?

Du point de vue adopté au paragraphe précédent, la vitesse du segment élémentaire se décompose comme (Fig. 1.18)

$$\mathbf{V} = \frac{V_w}{\cos\theta} \mathbf{l} - V_g \mathbf{e}_{\mathbf{x}}.$$
 (1.36)

Les composantes de la force de friction s'écrivent

$$\delta F_l = -C_l \left[\frac{V_w}{\cos \theta} - V_g \cos \theta \right] \delta s \qquad (1.37)$$

$$\delta F_n = -C_n V_g \sin \theta \, \delta s \tag{1.38}$$

et la projection sur l'axe de direction vaut (équation 1.33)

$$\delta F_x = -C_l V_w + V_g \left[C_l \cos^2 \theta + C_n \sin^2 \theta \right] \delta s.$$
(1.39)

Cette quantité atteint son minimum pour $\theta = \pi$ (si $C_l < C_n$), et sa valeur est maximale lorsque l'inclinaison du segment par rapport à la direction de propagation est extrémale.

Validité pour la nage et la reptation

Les paramètres du mouvement fixés, la vitesse de progression dépend donc uniquement du rapport des coefficients de friction. Nous utilisons pour déterminer ceux-ci les formules pour un ellipsoïde (équation 1.18), dont la forme est plus proche de celle du ver. Pour des valeurs typiques pour la longueur et le diamètre, on trouve un rapport C_n/C_l proche de 1,5 dans le cas d'un individu adulte [79].

La confrontation avec les données de la nage de *C. elegans* permet d'éprouver le modèle de Gray-Alexander [80]. En utilisant des valeurs typiques de la nage telles que $A/\lambda = 0, 2$, on trouve un rapport V_x/V_w proche de 0, 2. En pratique, ce rapport est compris entre 0, 1 et 0, 2 (voir chapitre 2).

En réalité, l'approximation des ondes de petite amplitude est discutable ; par ailleurs, lors de la nage, la longueur d'onde est largement supérieure à la longueur de l'animal, ce qui n'est pas envisagé par le calcul. Par conséquent l'aternance des appuis de part et d'autre de la direction de progression ne permet pas d'équilibrer à tout instant la composante perpendiculaire de la résultante des forces de friction : la trajectoire du centre de masse oscille plutôt que de suivre une droite (Fig. 1.19), ce qui peut aussi expliquer l'écart au modèle.

Expérimentalement, il est possible de faire varier le rapport des coefficients de friction en sortant du cadre d'un fluide newtonien. La situation la plus couramment décrite est bien évidemment la reptation sur gel. Dans cette situation, le rapport des coefficients de friction est difficile à estimer, car il faut prendre en compte l'effet de la capillarité, de l'élasticité du gel et de la dynamique du film de lubrification qui s'établit entre le ver et la surface du gel. Sauvage *et al.* proposent un modèle intégrant ces éléments, qui ne permet toutefois pas d'obtenir un rapport C_n/C_l supérieur à 2, ce qui est le cas en pratique [81]. Le rôle joué par la structure de la surface du ver (en particulier l'alae, qui pourrait agir comme un rail, voir Fig. 1.11A) et la plasticité du gel, ainsi que l'existence potentielle d'un seuil de friction statique pour un cylindre en contact avec la surface du gel d'agar [45] ne sont pas pris en compte par ce modèle.

Le rapport V_x/V_w s'établit autour de 0,8 pour la reptation sur un gel d'agar à 2 % [82], ce qui suppose des valeurs de C_n/C_l largement supérieures à 2. La déformation du substrat



FIGURE 1.19 – **Trajectoires du centre de masse.** A Nage, et **B** reptation sur gel d'agar. Le ver se dirige vers la droite. Les trajectoires du centre de masse (courbes rouges) correspondent à un déplacement de 5 s pour la nage 10 s pour la reptation. Les niveaux de gris représentent le temps (intervalle entre chaque forme : 0,05 s).

semble jouer un rôle primordial : lorsque la concentration en agar – et donc la rigidité du substrat – augmente, l'efficacité de la locomotion, traduite par le rapport V_x/V_w , diminue alors que les caractéristiques de l'onde ne changent pas [82]. Lorsque le ver est placé sur une membrane poreuse rigide humide, le substrat ne se déforme plus et la vitesse du nématode est pratiquement nulle [83].

Application aux environnements complexes

Au-delà des situations les plus courantes de la nage et de la reptation, il est possible d'observer comment la nature du milieu améliore ou pénalise l'efficacité de la locomotion en plaçant le ver dans des environnements complexes, tels que des suspensions de particules ou encore des substrats microfabriqués.

Afin d'approcher en laboratoire les conditions mécaniques naturelles de la locomotion tout en maintenant un environnement contrôlable, plusieurs études suivent le ver dans des suspensions de particules à deux dimensions. Lorsque la suspension est suffisamment dense, la tête se fraie un chemin en écartant les particules qui se présentent, et creuse un canal le long duquel le reste du corps glisse sans presque aucun dérapage latéral, ce qui fournit la poussée nécessaire au mouvement [44] [84]. Dans ces conditions, le rapport des coefficients de friction est considérablement augmenté, du même que la vitesse du ver, alors que celui-ci maintient sa forme et la fréquence du mouvement [79] ¹².

Le recours à la microfabrication permet d'obtenir des environnements complexes, proches des suspensions décrites ci-dessus, et de surcroît contrôlables, en remplaçant les particules par des micro-plots d'arrangement, de diamètre et d'espacement variables [85]. Dans un réseau carré de plots larges (0,3 mm de diamètre), la vitesse des vers de la souche

^{12.} Jung [79] propose de décrire une suspension de particules par un milieu poreux, et montre dans cette hypothèse que le rapport C_n/C_l augmente avec la fraction volumique des particules, ce qui correspond effectivement à une augmentation de la vitesse de progression.



FIGURE 1.20 – Locomotion dans des environnements complexes. A Dans une suspension à deux dimensions de particules (tiré de [79]); B dans des plots d'agar [85]; C dans un canal en PDMS [86].

sauvage dépend de l'espacement entre les plots et atteint un maximum de 1,2 mm s⁻¹ (soit dix fois la vitesse dans du liquide) lorsque la distance entre plots vaut autour de 0,47 mm. L'augmentation de la fréquence de 1,5 à 1,8 Hz ne suffit pas à expliquer le fait que la vitesse est plus que décuplée par rapport au milieu liquide. En réalité, le pic correspond à un accord entre l'espacement des plots, dont le rayon (0,15 mm) est approximativement le rayon de courbure du ver, et la forme du ver. Celui-ci s'appuie ponctuellement sur les piliers, ce qui équivaut à des coefficients de friction normale infinis.

Une dernière possibilité consiste à forcer le ver à ramper dans un canal étroit, ce qui impose les valeurs de l'amplitude et de la longueur d'onde [45, 86, 87]. Dans certaines gammes d'amplitude et de longueur d'onde, le ver peut se déplacer en s'appuyant sur les parois du canal. La géométrie du canal fixe donc la valeur du coefficient de friction normal à l'infini : la vitesse de progression est exactement celle de l'onde qui parcourt le corps du ver.

1.5.2 Modulation par l'environnement mécanique

Nous avons vu qu'étant fixés les paramètres de la locomotion tels que la période, la longueur d'onde et l'amplitude, la vitesse réelle de progression du ver dépend des propriétés mécaniques du milieu à travers lequel il se déplace, en particulier du rapport des coefficients de friction transverse et longitudinal. Or à deux environnements distincts – la surface d'un gel ou un milieu liquide – correspondent deux modes de locomotion, la reptation et la nage, eux-mêmes caractérisés par des valeurs distinctes des paramètres de la locomotion. La modification de l'environnement mécanique provoque donc en retour des changements dans la locomotion de *C. elegans*.

Au-delà des deux situations les plus courantes évoquées jusqu'ici, plusieurs études ont tenté de quantifier ces changements en examinant le déplacement du ver dans des environnements dont les propriétés mécaniques sont finement contrôlées.

Wallace [88] observe le mouvement d'un autre nématode, *Heterodora*, dans des films d'eau d'épaisseur variable et dans des suspensions de particules de diamètre variable. À sa suite, Gray propose de ne retenir les termes de nage et de reptation pour décrire la locomotion des nématodes que par commodité, tout en soulignant qu'il n'est pas possible



FIGURE 1.21 – Modulation des paramètres de la locomotion par l'environnement mécanique. A Dans différentes concentrations de méthylcellulose correspondant à une large gamme de viscosités (de 0,001 à 28 Pa s) [47], la fréquence et la longueur d'onde du mouvement décroissent. B On observe le même phénomène dans différentes concentrations de gélatine, alors que le rapport des coefficients de friction normal et longitudinal, *K*, augmente [83]. L'amplitude diminue aussi.

d'établir de frontière entre les deux modes de locomotion.

Dans une série de travaux plus récents [89, 47], le mouvement du ver dans des liquides de viscosité ou de visco-élasticité variable est enregistré et analysé. Dans des solutions de concentration grandissante de méthylcellulose correspondant à des viscosités de 0,001 à 28 Pa s, tous les paramètres (période, longueur d'onde, courbure maximale moyenne) évoluent de manière continue depuis la nage jusqu'à présenter les caractéristiques de la reptation sur gel, alors que le rapport des coefficients de friction est maintenu égal à 2 (Fig. 1.21A). Ces résultats sont confirmés par des expériences semblables [90].

Berri *et al.* [83] utilisent de la gélatine à la place de la méthylcellulose (Fig. 1.21**B**). Le liquide n'est plus newtonien. Il est caractérisé par le rapport *K* des coefficients de friction normal et longitudinal d'un segment du ver ; cette quantité est déduite numériquement à partir des caractéristiques de l'onde et de la vitesse de progression du ver. L'élasticité du milieu augmente avec la concentration en gélatine et le rapport des coefficients de friction varie de 1 environ (liquide newtonien) à 100. Ici aussi, l'augmentation de la résistance du milieu entraîne une évolution continue des paramètres de la locomotion (fréquence, longueur d'onde, amplitude). Ainsi, la fréquence passe de 2 Hz pour K = 1, valeur typique de la nage, à 0,2 Hz pour K = 100, qui est une valeur inférieure à celles observées pour la reptation sur gel.

Ces exemples montrent que la mécanique du milieu, en plus de conditionner la vitesse de progression comme l'ont montré Gray et Alexander, influe sur les caractéristiques de la locomotion. Une modification de la viscosité ou de l'élasticité du milieu, de la concentration en particules d'une suspension, ou encore des forces capillaires dues à la présence d'un film d'eau entraîne une modulation de la fréquence, de l'amplitude et de la longueur d'onde du mouvement. Ces paramètres, données du problème posé par Gray, sont donc eux-mêmes, pour partie, déterminés par les caractéristiques mécaniques du milieu où se déplace le ver.

1.6 Conclusion

La *locomotion ondulatoire* désigne une manière de se déplacer utilisée par certains organismes élancés qui avancent grâce à la propagation d'une onde de flexion depuis la tête vers la queue. Ce mode de locomotion se rencontre à des échelles de taille très variées et se révèle adapté à une grande diversité de milieux mécaniques, en particulier les milieux dominés par les forces de friction. Pour cette raison, il existe des implémentations robotiques de la locomotion ondulatoire, permettant par exemple à des dispositifs de petite taille de se déplacer à bas nombre de Reynolds.

Le nématode *C. elegans* constitue un modèle remarquablement adapté à l'étude de la locomotion ondulatoire et de la manière dont l'appareil locomoteur et le système nerveux interagissent pour produire les ondes de contraction musculaire et les déformations du corps. Cet invertébré, possédant relativement peu de neurones, est en effet au centre de découvertes dans des champs très variés de la biologie depuis son introduction comme organisme modèle dans les années soixante-dix, en particulier en neurobiologie. Une revue des connaissances disponibles sur le système locomoteur de *C. elegans* montre le rôle essentiel joué par la mécanosensation en amont du circuit moteur, par exemple pour décider du sens de propagation des ondes, mais aussi l'importance du retour mécanosensoriel (proprioception) lors de la génération et de la propagation des ondes.

La forme du ver et la fréquence du mouvement dépendent non seulement de la commande musculaire, mais aussi du « filtre » imposé par la mécanique du squelette hydrostatique, en particulier l'élasticité de la cuticule, et par la résistance du milieu, qui contraignent par exemple la vitesse de contraction des muscles, ou limitent la gamme des déformations accessibles et des formes qui en résultent. Il a ainsi été montré numériquement [75] qu'une commande musculaire de type créneau se traduit par une forme sinusoïdale de la déformation de la cuticule lorsque cette dernière est supposée élastique.

Finalement, la vitesse de progression du ver est fonction de la valeur des coefficients de friction normal et longitudinal, fixée par la nature du milieu (liquide, visco-élastique, suspension de particules...), d'éventuels seuils de friction statique, et de la présence de parois ou d'objets sur lesquels le ver prendrait appui.

Pour comprendre la locomotion de *C. elegans* dans son environnement mécanique, il est donc nécessaire, d'une part de prendre en compte les processus actifs qui permettent au ver de détecter l'extérieur, puis de générer et de stabiliser une onde de courbure ; d'autre part

d'expliquer comment la physique du milieu influence le choix des paramètres de la locomotion, contraint les rythmes et les formes adoptés par le ver, et limite *in fine* l'efficacité de la locomotion. Lors des travaux présentés ici, nous avons repris l'approche adoptée par Pascal Sauvage dans sa thèse, effectuée au laboratoire Matière et Systèmes Complexes [45]. Cette approche consiste à perturber le système constitué par le ver et son environnement, de manière à caractériser sa réponse et à dégager des principes sur son fonctionnement.

Dans le chapitre 2, nous décrivons les effets d'une perturbation mécanique du mouvement, à l'aide d'un dispositif de confinement du ver. Ces expériences sont l'occasion de répondre à la question de l'existence de deux modes de locomotion distincts chez *C. elegans*, préalable à une recherche des mécanismes de régulation de la locomotion. Nous montrons ainsi l'évolution conjointe des paramètres de la locomotion et du rapport des coefficients de friction en fonction du confinement. Ces données servent ensuite de point de comparaison pour l'étude de mutants présentant soit des défauts lors de la transition de la reptation vers la nage (*unc-79*), soit déficients pour certaines formes de mécanosensation (*mec-4*, *trp-4*, *che-3*), dans le chapitre 3. Le chapitre 4 s'appuie sur les résultats des deux chapitres précédents pour décrire l'espace des modes de locomotion et proposer un modèle pour la sélection du mode de locomotion en fonction de l'environnement mécanique.

Le chapitre 5 décrit la mise en place et le fonctionnement d'un système expérimental pour l'étude de la réponse de *C. elegans* à la présence d'un champ électrique, phénomène connu sous le nom d'électrotaxie. Nous y exposons les travaux menés en collaboration avec Xavier Manière, doctorant (équipe « Génétique Moléculaire Evolutive et Médicale » de l'INSERM, à l'Hôpital Necker, sous la direction d'Ivan Matic), sur la séparation de populations sur le critère de leurs aptitudes locomotrices par électrotaxie, et nos premiers résultats, qui montrent l'intérêt de l'électrotaxie pour explorer les liens existant entre locomotion et navigation chez *C. elegans*.

CHAPITRE 2 Transition nage-reptation

Sommaire

2.1	Position du problème		
	2.1.1	Définition d'une allure : exemple de la sangsue	46
	2.1.2	Allure(s) de <i>C. elegans</i>	47
2.2	Dispo	sitif expérimental et analyse des images	49
	2.2.1	Dispositif expérimental	50
	2.2.2	Analyse des images	50
	2.2.3	Définition du paramètre de confinement	54
	2.2.4	Procédure	54
2.3	Approche dynamique		55
	2.3.1	Libération soudaine d'un ver initialement confiné	55
	2.3.2	Libération progressive d'un ver initialement confiné	57
2.4	Approche quasi-statique : variation graduelle du confinement		58
	2.4.1	Continuité des paramètres de la locomotion	58
	2.4.2	Continuité dans l'espace des formes	60
	2.4.3	Évolution de la vitesse de progression	65
	2.4.4	Évolution du rapport des coefficients de friction	69
2.5	Étude	e du mutant <i>unc-79(e1068)</i>	70
	2.5.1	unc-79 et unc-80, nécessaires à l'établissement des canaux NCA	70
	2.5.2	Confinement dynamique et quasi-statique des mutants unc-79 .	72
2.6	Conc	lusion et discussion	75

2.1 Position du problème

La première question soulevée par l'étude de la locomotion de *C. elegans* et de sa modulation par l'environnement concerne l'existence de deux modes de locomotion apparemment distincts : la nage en milieu liquide et la reptation sur gel d'agar. L'opposition commune entre nage et reptation trouve certainement son origine dans le fait que ces deux modes de locomotion correspondent aux deux seules situations rencontrées dans les laboratoires. Ces termes ont été retenus par habitude et par commodité pour décrire la locomotion dans des conditions de culture et d'observation standardisées, tant que le ver n'est pas amené à explorer d'autres environnements, plus proches de la variété de son habitat naturel. Comme le remarque J. Gray [76] à propos des expériences de Wallace [88] dans des films de liquide d'épaisseur variable :

Wallace's observations and those described in the present paper suggest that there is no sharp line of demarcation between creeping and swimming but, in view of the well-marked contrast in the form of an animal when burrowing through a dense suspension of particles and when swimming in water, it is convenient to retain these two well established terms.

Les différences évidentes dans la cinématique des deux types de mouvement et l'analogie possible avec d'autres animaux tels que la sangsue médicinale, qui dispose de deux modes de locomotion en fonction du substrat où elle se déplace, appelle cependant une réponse claire sur la différence entre nage et reptation : s'agit-il de deux allures distinctes, correspondant à différents schémas d'excitation musculaire, ou bien de deux exemples d'un seul mode de locomotion, continûment modulable ?

2.1.1 Définition d'une allure : exemple de la sangsue

De nombreuses espèces possèdent plusieurs *allures* pour se déplacer. Une allure est une combinaison caractéristique de mouvements, correspondant à un certain schéma spatiotemporel d'activation des muscles, permettant de se déplacer dans une certaine gamme de vitesses. Si l'on assigne à une allure donnée un ensemble de quantités qui la décrivent, une au moins de ces quantités présentera une discontinuité lors de la transition vers une autre allure, provoquée par exemple par le besoin de se déplacer plus vite ou dans des conditions différentes [1].

Ainsi, chez l'homme, la marche et la course sont deux allures distinctes. Ces allures peuvent être quantifiées par divers paramètres : parmi eux la durée durant laquelle le pied est en contact avec le sol présente une nette discontinuité lorsque la vitesse de déplacement augmente [1]. Alexander [91] a montré que le choix de l'allure peut s'expliquer, dans le cas de l'homme, par une optimisation du coût métabolique de la locomotion : à mesure que la vitesse augmente, il devient plus avantageux, du point de vue energétique, de se mettre à courir. Le cheval possède aussi plusieurs allures (pas, trot, galop). Dans ces exemples, l'environnement ne change pas : c'est l'augmentation de la vitesse de déplacement qui dicte le changement d'allure. Le changement des propriétés mécaniques du milieu où progresse

l'animal peut aussi entraîner la transition vers une autre allure : un serpent se déplaçant par ondulations latérales parmi des branches opte pour le mouvement en accordéon lorsqu'il est confiné, et utilise le déroulement latéral sur le sable [11].

Au niveau neuronal, deux allures différentes résultent de motifs distincs d'excitation musculaire produits par des générateurs centraux de rythme. L'exemple de la sansgue médicinale *Hirudo medicinalis* illustre la transition entre deux formes distinctes de locomotion, induite par le passage d'un environnement à l'autre. Cet animal se déplace dans du liquide à la manière d'autres vers, dont *C. elegans*, en propageant le long de son corps des ondes de courbures (Fig. 2.1A). La fréquence du mouvement est alors de l'ordre d'une demi-seconde [92]. En revanche, sur une surface solide ou lorsque le film d'eau dans lequel l'animal avance n'est pas suffisamment profond, le mode de déplacement est très différent (Fig. 2.1B). Son extrémité postérieure ancrée sur la surface, la sangsue étire son corps dans la direction de progression, ancre l'extrémité antérieure, puis ramène le reste du corps en le contractant [93]. Le cycle dure quelques secondes. Les deux modes de locomotion font appel à des schémas distincts d'excitation musculaire : lors de la nage, les muscles ventraux et dorsaux, situés de part et d'autre du corps, se contractent en opposition de phase afin de propager l'onde de courbure, alors que la reptation sur une surface solide requiert la contraction simultanée des muscles opposés.

La taille suffisamment importante des neurones et la mise au point de préparations *in vitro* afin d'étudier les motifs nerveux à l'origine de la locomotion ont permis d'établir qu'il s'agissait bien de deux schémas distincts d'excitation musculaire produits par deux sous-unités séparées du système nerveux. Il existe donc un générateur central de rythme pour la nage et un générateur pour la reptation, commandant éventuellement aux mêmes motoneurones. L'activation de l'un ou l'autre de ces générateurs centraux dépend d'une entrée mécanosensorielle informant sur la profondeur de l'eau où se déplace l'animal (Fig. 2.1C) [94, 92].

2.1.2 Allure(s) de C. elegans

De même que pour la sangsue, deux modes de locomotion, nage et reptation, coexistent chez *C. elegans*, et le choix d'un mode ou de l'autre dépend de la nature mécanique du milieu. Cependant, au contraire des exemples présentés jusqu'ici, les deux modes sont qualitativement semblables, reposant sur la propagation d'une onde de courbure le long du corps. Existe-t-il deux allures distinctes chez *C. elegans*?

Une réponse positive signifierait que nous disposons d'un exemple simple de prise de décision en fonction d'un stimulus mécanique : le faible nombre de neurones de *C. ele*gans et les connaissances disponibles sur son système nerveux en feraient alors un modèle particulièrement adapté pour étudier la manière dont une entrée sensorielle mécanique se traduit en un choix binaire – nage et reptation constituant deux modes clairement séparés – au niveau neuronal. Elle supposerait l'existence d'un ou de plusieurs générateurs centraux de rythme capables de produire deux motifs distincts d'excitation musculaire, et devrait se traduire par une transition brusque de l'un à l'autre induite par un changement d'environ-



FIGURE 2.1 – Choix du mode de locomotion chez la sangsue *Hirudo medicinalis*. A Formes successives d'une sangsue nageant en milieu liquide. L'animal propage une onde de courbure le long du corps ; la fréquence du mouvement vaut 2 Hz environ. Tiré de [95]. B Sur une surface solide ou en eau peu profonde, l'animal rampe en prenant appui sur son extrémité postérieure, puis en allongeant son corps et en encrant l'extrémité antérieure, avant de ramener le reste de son corps. Un cyle dure quelques secondes. Tiré de [96]. C Schéma simplifié des circuits neuronaux de la locomotion de la sangsue, d'après [93]. La décision de se déplacer active un sous-circuit commandant l'allongement du corps, appartenant à la fois au générateur central de rythme de la nage (rectangle en pointillés) et à celui de la reptation (tirets). La détection de la profondeur du liquide où avance la sangsue active l'un ou l'autre générateur de rythme (éventuellement les deux). La nage requiert de maintenir l'allongement du corps, alors que la reptation repose sur une alternance entre allongement et contraction.

nement.

Dans la seconde hypothèse, la modulation continue d'un même mode de locomotion permettant de se déplacer dans des milieux aussi différents qu'une goutte de liquide et la surface d'un gel offrirait l'exemple d'un système locomoteur alliant une relative simplicité à une grande robustesse par rapport à la diversité des milieux où il est possible de se déplacer. Si cette modulation continue correspond à une adaptation, il serait utile de comprendre quel est son but et quels sont les mécanismes à l'œuvre, en particulier le rôle des entrées sensorielles et de la proprioception dans cette modulation.

Plusieurs études récentes tentent de répondre à cette question. L'une d'entre elles [97] utilise une approche génétique pour mettre à jour des différences éventuelles entre nage et reptation. En milieu liquide, un mutant dont les neurones ciliés ne fonctionnent pas, *che-3*, alterne des épisodes ressemblant à la nage ou à la reptation. La distribution des fréquences du mouvement présente deux pics correspondant à des valeurs caractéristiques de la nage et de la reptation, suggérant que le ver, en l'absence d'information mécanique, choisit de manière bimodale entre les deux allures. Un crible génétique permet d'isoler un mutant, *unc-79*, capable de ramper malgré un phénotype « hésitant » (*fainter*), mais qui s'immobilise durant quelques secondes lorsqu'on le plonge dans un liquide, avant de commencer

à nager. La mesure par FRET¹ de l'activité musculaire d'animaux de type sauvage montre de plus que les différences entre nage et reptation trouvent leur origine dans des motifs distincts d'excitation musculaire : les zones contractées correspondent aux zones de courbure et suffisent à expliquer qualitativement la forme du nématode. Les propriétés mécaniques du milieu ne modèlent pas directement la forme du ver.

Deux autres études [83, 47] cherchent à caractériser la relation entre mode de locomotion et environnement mécanique pour des animaux de type sauvage. Leurs auteurs mesurent des quantités caractéristiques de la locomotion telles que la fréquence, l'amplitude ou la longueur d'onde en fonction de la viscosité ou du rapport des coefficients de friction, dans des concentrations croissantes de méthycellulose ou de gélatine. Dans les deux cas, il est possible d'observer la nage et la reptation, ainsi qu'une gamme continue de comportements intermédiaires (Fig. 1.21). Pour aucune des quantités observées il n'apparaît la discontinuité qui serait le signe d'une transition d'une allure à une autre. L'hypothèse retenue est celle d'un unique mode de locomotion produit par un unique circuit neuronal, dont la sortie est continûment modulée en réponse à l'environnement mécanique. En réponse aux travaux de Pierce-Shimomura, il est noté que si nage et reptation étaient les deux seules allures du nématode, les viscosités intermédiaires devraient être marquées par l'alternance de phases de nage et de phases de reptation. Or ce n'est pas le cas : on observe à la place un mode intermédiaire [47].

Notre approche s'inscrit à la suite de ces travaux, tout en s'en démarquant. Les variations de la locomotion sont induites en confinant le ver entre la plaque de verre et un gel d'agar. En effet, lors de la reptation à la surface d'un gel d'agar, la capillarité plaque le nématode contre la surface, qui se déforme sous la contrainte, créant la situation mécanique particulière à laquelle correspond la reptation en laboratoire. Le but des expériences décrites ci-dessous est de substituer aux forces capillaires la pression exercée par une plaque de verre sur le nématode. Nous pouvons ainsi obtenir les deux modes de locomotion observés dans le laboratoire en reproduisant les conditions mécaniques qui en sont à l'origine, ainsi qu'une large gamme de situations intermédiaires. De plus, il nous est possible de varier les conditions mécaniques au cours d'une même observation, en modifiant la valeur de la pression appliquée.

2.2 Dispositif expérimental et analyse des images

Le but du dispositif que nous décrivons ici est de permettre l'observation et l'analyse du mouvement d'un individu unique, confiné entre la surface déformable d'un gel d'agar et la surface rigide d'une plaque de verre. La distance entre les deux surfaces doit être directement modulable par l'expérimentateur, qui contrôle ainsi la profondeur de l'inden-

^{1.} Förster resonance energy transfer. Il s'agit d'une technique d'imagerie qui utilise le transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes. Dans ce cas, c'est l'activité des muscles, plus exactement les flux calciques, qui sont ainsi observés.

tation du gel par le corps du ver et l'intensité de la pression exercée sur le ver. Un prototype du dispositif a été construit par Pascal Sauvage, qui a mené des expériences préliminaires de plaquage durant sa thèse au laboratoire Matière et Systèmes Complexes [45].

2.2.1 Dispositif expérimental

Lors des expériences de plaquage, un seul individu est immergé dans du M9, puis confiné entre la surface plane d'un gel d'agar (2%) et une plaque de verre (Fig. 2.2). La plaque de verre est collée sur un support en cuivre recouvert de PDMS, que l'on peut déplacer verticalement grâce à un bras dont la hauteur est contrôlée par un actuateur linéaire miniature opéré par un boîtier de contrôle (Newport NSA12 et NSC200). Il est possible de connaître et de changer la position verticale de la plaque de verre avec une précision de 0,1 micron, et ainsi de contrôler le confinement imposé au nématode. L'interface avec le boîtier de contrôle se fait *via* le logiciel LabVIEW.

La planéité du gel ainsi que le parallélisme entre les surfaces du gel et du verre sont assurés par la procédure de coulage du gel, qui utilise une lame intermédiaire (Fig. 2.3). Le gel est coulé au fond d'une boîte de Pétri et fixé au fond de la boîte par des ergots.

Le bain est maintenu à une température constante de 20 °C par un dispositif de refroidissement composé d'une cellule transparente en Plexiglas® dans laquelle circule de l'eau réfrigérée par un bain thermostaté. L'ensemble du dispositif est placé sous une loupe binoculaire (Olympus SZX10) et des images sont prises et enregistrées par l'intermédiaire d'une caméra CCD (PixeLINK PL-B741F), à la fréquence de 18 images par seconde.

2.2.2 Analyse des images

Les films obtenus sont ensuite traités avec ImageJ [98], un logiciel d'analyse et de traitement d'images développé en Java. Le traitement automatisé des films est effectué par un greffon écrit en collaboration avec Olivier Cardoso, chercheur au laboratoire Matière et Systèmes Complexes (Fig. 2.4A). Après avoir supprimé l'arrière-plan de l'image, un seuillage permet d'obtenir une image binaire, en noir et blanc. Après une étape de lissage de la forme seuillée, celle-ci est réduite à une ligne, le *squelette*, par érosions successives. Les coordonnées de cette dernière sont ensuite ordonnées d'une extrémité à l'autre puis enregistrées (annexe B).

Le calcul des paramètres du mouvement utilise GNU Octave, un clone libre de Matlab. Pour chaque image, la forme du squelette est approchée par une *spline* (courbe de Bézier) grâce à un algorithme de lissage (*smoothing spline*). On obtient ainsi autant de points que désiré, régulièrement espacés sur une courbe lisse, qu'il est possible de paramétrer par une abscisse curviligne s qui varie entre 0 et 1, de telle manière qu'à l'extrémité antérieure corresponde le point d'abscisse s = 0.

La courbure du corps en chaque point,

$$\kappa(s) \simeq \frac{\delta \theta(s)}{\delta s} \tag{2.1}$$



FIGURE 2.2 – **Dispositif de plaquage.** A Vue d'ensemble du dispositif de plaquage. Le gel est coulé au fond d'une boîte de Pétri (1) (Fig. 2.3). Une plaque de verre est collée sur un support (2) dont la hauteur est contrôlée par un actuateur linéaire miniature (moteur pas à pas, 3). L'ensemble est placé au-dessus d'une cellule de refroidissement (4) et sous la loupe binoculaire (non figurée). Les images obtenues sont enregistrées par une caméra CCD (5) pour traitement ultérieur. **B** Le ver, confiné entre la plaque de verre et la surface du gel, est observé à travers un trou pratiqué dans le support. **C** Vue transversale du dispositif. Comme dans le schéma précédent, la taille du ver a été exagérée.



FIGURE 2.3 – **Préparation du gel. A** La plaque de verre est placée au-dessus du fond de la boîte de Pétri ; son horizontalité est vérifiée. **B** Deux lames de verre sont ajoutées de part et d'autre de la plaque de verre et du support et maintenues par des pinces. **C** Le gel est coulé entre la lame du dessous et le fond de la boîte de Pétri. **D** Après solidification du gel, les lames de verres sont retirées. Le gel, maintenu par des ergots, reste en place. L'ensemble est immergé dans du M9.

est alors calculée en mesurant l'angle $\delta \theta(s)$ formé par deux segments successifs (Fig. 2.4B), et δs , le pas élémentaire séparant deux points successifs le long de la courbe.

Il faut ici noter que la description du mouvement du ver par la donnée de la courbure $\kappa(s,t)$ diffère de celle proposée par Gray [76], que nous avons rapportée dans l'introduction. En effet, chez Gray, la forme du ver est donnée par l'ensemble des points (x(s,t),y(s,t)), liés par une relation y = f(x,t) où f est de type sinusoïdal. Les paramètres qui découlent de cette description sont la période temporelle des oscillations, T, la période spatiale du sinus, λ , et la vitesse de l'onde dans le référentiel du ver, λ/T .

Dans notre approche, la forme du ver est donnée indirectement par $\kappa(s,t)$. L'onde qui se propage est une onde de courbure, dont on suit la propagation *le long du corps*. La vitesse mesurée, V_w , diffère donc légèrement de la vitesse de l'onde au sens de Gray. La longueur d'onde associée, $\lambda_C = V_w T$, correspond à la longueur d'arc entre deux maxima de courbure. En supposant que le ver, le long duquel se propage une onde de courbure d'amplitude κ_{max} à la vitesse V_w et avec la période T peut-être effectivement décrit par un sinus d'amplitude A et de nombre d'onde $q = 2\pi/\lambda$, il est possible de passer d'une représentation à l'autre par les formules

$$\kappa_{max} = \frac{Aq^2}{\left(1 + A^2 q^2\right)^{3/2}}$$
(2.2)

$$\lambda_{C} = \frac{4\sqrt{1+a^{2}q^{2}}}{q} E\left(\frac{A^{2}q^{2}}{1+A^{2}q^{2}}\right), \qquad (2.3)$$

où E désigne l'intégrale elliptique de seconde espèce (voir l'annexe C). Tant que l'amplitude A reste petite devant la longueur d'onde, $\lambda_C = \lambda$ et $V_w = \lambda/T$ et les deux descriptions sont équivalentes. La période du mouvement T ne dépend pas du point de vue adopté.

Il est possible de visualiser l'ensemble des déformations du corps au cours du temps en traçant la courbure en fonction de l'abscisse curviligne et du temps sur un graphique où la couleur reflète la valeur de la courbure (Fig 2.5). L'algorithme de lissage fonctionne mal aux extrémités d'une courbe : il est donc difficile de déterminer avec précision la valeur de la courbure aux extrémités du squelette. Celle-ci n'apparaît pas sur ces graphiques et l'on se restreint aux abscisses *s* comprises entre 0, 1 et 0,9, ce qui correspond à une perte de 0, 1 mm environ à chaque extrémité.

Sur ce type de graphique la propagation des maxima et des minima de courbure le long du corps apparaît clairement sous la forme de traces obliques (bleues et rouges pour notre choix de couleurs), qui sont ajustées par des droites croissantes en cas de déplacement vers l'avant, décroissantes en cas de déplacement vers l'arrière. Il est alors naturel de définir la période du mouvement comme la distance moyenne entre deux droites successives. De même, la vitesse de propagation des ondes s'obtient directement à partir du coefficient



FIGURE 2.4 – **Traitement des images.** A L'image initiale est seuillée puis réduite à une seule ligne, le squelette, à partir duquel est obtenue une courbe lisse par un algorithme de lissage (*smoothing spline*). Les deux premières étapes utilisent ImageJ et la dernière GNU Octave. Barre d'échelle : 0,5 mm. B La spline (ligne rouge) reflète la forme du ver. Elle est paramétrée par une abscisse curviligne qui vaut s = 0 à la tête et s = 1 à la queue. La courbure en chaque point est alors calculée en considérant l'angle $\delta\theta(s)$ formé par deux segments élémentaires successifs.



FIGURE 2.5 – Représentation spatiotemporelle de la courbure au cours du mouvement. Un graphique d'intensité résume l'évolution de la courbure de chaque point du ver au cours du temps. La couleur reflète la valeur de la courbure, qui est tracée en fonction de l'abscisse curviligne et du temps. La propagation des ondes apparaît ici comme des traces obliques rouges et bleues qui sont ajustées par des droites (pointillés gris). La période du mouvement et la vitesse de propagation des ondes le long du corps sont déduites de la distance T entre deux de ces droites et des coefficients directeurs, tan α .

directeur des droites correspondantes, puisque

$$V_w = L \frac{\mathrm{d}s}{\mathrm{d}t} \tag{2.4}$$

$$\frac{L}{\tan \alpha},\tag{2.5}$$

où L désigne la longueur du ver et α l'angle que forme la droite avec l'horizontale.

Les grandeurs ainsi mesurées, courbure en tout point, période du mouvement et vitesse de propagation de l'onde de courbure, fournissent une description complète du mouvement du ver dans son propre référentiel. La vitesse de progression du ver dans le référentiel du laboratoire est identifiée à la vitesse du centre de masse moyennée sur 20 images.

2.2.3 Définition du paramètre de confinement

La hauteur *h* de la plaque de verre est comptée positivement vers le bas à partir d'une position de référence h = 0 qui correspond au contact entre, d'une part, le ver et le gel d'agar, et d'autre part, le ver et la plaque de verre (Fig. 2.6). Le paramètre de confinement ε est obtenu en adimensionnant la position verticale relative de la plaque de verre par le diamètre du ver,

$$\varepsilon = \frac{h}{D}.$$
 (2.6)

Le diamètre du ver est mesuré directement sur des images obtenues par fort grossissement, en supposant que le ver est axisymétrique et qu'il se déforme très peu durant les expériences².

Aux situations où le ver peut se déplacer librement, sans contact direct avec la lame de verre ni le gel, correspondent des valeurs négatives de ε . Le paramètre de confinement est nul lorsqu'il y a contact. Il est positif quand la plaque maintient le ver enfoncé dans le gel et atteint la valeur de 1 quand la surface du verre touche la surface du gel.

2.2.4 Procédure

Les vers utilisés lors des expériences de plaquage sont synchronisés afin d'obtenir une population homogène en taille et en âge. Les expériences portent sur de jeunes adultes hermaphrodites. Lors d'une expérience, un individu unique est rincé dans du M9 avant d'être transféré dans le dispositif de plaquage. On utilise pour cela un cil collé à l'extrémité d'une pipette Pasteur, afin de ne pas abîmer le ver. La plaque de verre est ensuite abaissée doucement jusqu'à ce que s'établisse le contact avec le ver qui permet de définir la position de référence correspondant à $\varepsilon = 0$. Le diamètre du ver est plus important au milieu du corps : la position de la plaque correspondant au contact est donc détectable à l'oeil, puisque le milieu du ver apparaît bloqué alors que tête et queue bougent encore librement dans le liquide. Pour plus de détails, on se reportera à l'annexe B.

^{2.} Rappelons que la déformation du ver est négligeable devant celle du gel (section 1.4).



FIGURE 2.6 – **Définition du paramètre de confinement.** La position verticale h de la plaque de verre est comptée positivement vers le bas depuis une position de référence correspondant au contact entre le ver, le verre et le gel. La position est ensuite adimensionnée par le diamètre du ver pour obtenir le paramètre de confinement, ε .

Nous étudions ci-dessous la transition entre nage et reptation à l'aide du dispositif de plaquage. Nous proposons d'abord une visualisation de la transition et un aperçu de sa dynamique en faisant varier le confinement plus ou moins rapidement au cours d'une même observation (approche dynamique). Nous cherchons ensuite à décrire précisément, en fixant les différentes valeurs du paramètre de confinement (approche quasi-statique), la variation des paramètres de la locomotion en fonction de l'environnement mécanique, afin de déceler une éventuelle rupture marquant le changement d'allure. Cette caractérisation nous fournit une référence pour l'étude du mutant *unc-79*, qui présente des difficultés à passer d'un mode lent à un mode rapide de locomotion.

2.3 Approche dynamique

2.3.1 Libération soudaine d'un ver initialement confiné

La première étape consiste à valider le dispositif expérimental en vérifiant qu'il est possible d'induire la nage comme la reptation. La Figure 2.7 présente une expérience lors de laquelle un ver initialement confiné ($\varepsilon > 0$) est soudainement relâché lorsque la plaque de verre est relevée à une vitesse grande devant la dynamique du ver ($d\varepsilon/dt = 0,7 \text{ s}^{-1}$).

Avant que la plaque ne soit relevée, le mouvement du ver, tel qu'il apparaît sur le diagramme spatiotemporel et à travers la superposition des squelettes, est caractéristique de la reptation sur gel : la fréquence est de l'ordre de 0,3 Hz, la vitesse de propagation



FIGURE 2.7 – Relâchement soudain (A) et progressif (B) d'un ver initialement confiné. De gauche à droite : évolution de la courbure au centre du ver, κ_{mid} ; évolution du paramètre de confinement, ε ; graphique spatiotemporel de la courbure ; superposition des squelettes au cours de la transition, depuis la situation initiale ($\varepsilon > 0$, gris) jusqu'à la situation finale ($\varepsilon < 0$, noir).

de l'onde de courbure est faible, la longueur d'onde est inférieure à la taille de l'animal. Nous pouvons donc reproduire les traits principaux de la reptation sur gel en exerçant une pression sur le corps du ver. Après la libération, les paramètres du mouvement ont changé : la fréquence augmente à 2 Hz, la vitesse de l'onde est désormais proche de 2 mm s⁻¹. La longueur d'onde excède la taille de l'animal, et les formes adoptées sont typiques de la nage (squelettes noirs).

La libération soudaine provoque donc chez le nématode un passage de la reptation vers la nage. La transition de l'une à l'autre s'est effectuée sur un laps de temps inférieur à la durée d'une période, et le suivi de la courbure au milieu du corps (Fig. 2.7A, à gauche) ne laisse pas apparaître de discontinuité ou de signe de réinitialisation du mouvement qui marqueraient le passage d'une allure à l'autre.

2.3.2 Libération progressive d'un ver initialement confiné

La possibilité de contrôler la vitesse de déplacement vertical de la plaque de verre conduit à répéter la même expérience, cette fois en relevant la plaque à une vitesse dix fois inférieure ($d\varepsilon/dt = 0.07 \text{ s}^{-1}$). On peut ainsi observer pour la première fois la transition *dans le temps* de la reptation vers la nage, pour un individu unique. Les études précédentes avaient en effet en commun d'analyser le mouvement de différents vers dans des environnements fixés, qu'il n'était pas possible faire évoluer dans le temps.

L'expérience de libération progressive est illustrée Figure 2.7**B**. Le début et la fin du film analysé correspondent à la reptation et à la nage comme dans l'exemple précédent. La transition dure le temps de quelques périodes. La période entre deux oscillations, qui apparaît sur le suivi de la courbure au milieu du corps, diminue progressivement à mesure que le confinement disparaît. La vitesse des ondes de courbure augmente dans le même temps, et la forme du ver est peu à peu modifiée. De même que lors du relâchement soudain, on ne décèle pas de discontinuité dans la locomotion : le passage d'un mode à l'autre semble plutôt procéder de la modulation continue d'une unique allure.

Le système expérimental de plaquage permet de modifier dynamiquement et de manière contrôlée l'environnement mécanique de *C. elegans* afin d'induire et de visualiser le passage de la reptation en situation confinée à la nage en milieu liquide. Les premières conclusions tirées des résultats obtenus semblent rejoindre celles d'études précédentes montrant que nage et reptation sont deux exemples d'un même mode de locomotion [83, 47], tout en apportant de nouveaux arguments : la modification au cours du temps des paramètres de la locomotion lors d'une transition dynamique est ici directement observable.

2.4 Approche quasi-statique : variation graduelle du confinement

Afin de quantifier plus précisément les modifications de la locomotion en rapport avec l'environnement mécanique, et de vérifier ainsi la continuité des quantités caractérisant la locomotion, nous adoptons par la suite une approche dite quasi-statique, c'est-à-dire en appliquant successivement des degrés de confinement fixes. L'objectif est de caractériser la transition en mesurant les paramètres de la locomotion dans le référentiel du ver (période, vitesse de l'onde de courbure, valeur maximale de la courbure) et dans le référentiel du laboratoire (vitesse de progression) dans une large gamme de confinements, fixés le temps de l'expérience (Fig. 2.8).

Dans la pratique, la plaque de verre est abaissée depuis une position haute jusqu'à établir le contact entre la plaque, le nématode et la surface de gel. La plaque est alors descendue ou remontée de manière à obtenir le confinement désiré, et le mouvement du ver est enregistré, à confinement constant, durant 30 à 60 s. Pour obtenir une nouvelle valeur du confinement, le ver est libéré puis la procédure est reprise.

Les résultats présentés sont des moyennes sur l'ensemble des observations réalisées sur 12 jeunes adultes hermaphrodites de phénotype sauvage, synchronisés (voir annexe B).

2.4.1 Continuité des paramètres de la locomotion

Trois exemples de graphiques spatiotemporels de la courbure, sur lesquels sont effectués les mesures des paramètres de la locomotion, sont tracés Figure 2.9. L'évolution de la période du mouvement, T, et de la vitesse de l'onde de courbure le long du corps, V_w , en fonction du paramètre de confinement ε , est présentée Figure 2.10. La variabilité des grandeurs est très faible et leur valeur reste constante pour toute la gamme des valeurs négatives de ε . La longueur d'onde correspondante s'établit autour de 1,2 mm, environ la taille du ver, produisant la forme caractéristique en C. Le nématode nage dans le liquide et l'on n'observe pas d'influence de la proximité des parois sur les paramètres de la locomotion.

Le mouvement est modifié pour des valeurs positives de ε . À mesure que le confinement s'accroît, la période augmente d'un facteur dix, alors que la vitesse de l'onde chute de 2 à 0,1 mm s⁻¹, ce qui se traduit par une modification importante de la forme du ver. Les caractéristiques de la reptation sont atteintes aux environs de $\varepsilon = 0,5$ (forme en *S*, Fig. 2.8A). Aux valeurs supérieures du paramètre de confinement, la locomotion est marquée par une fréquence d'oscillation très basse et des petites longueurs d'onde (forme en *M*, Fig. 2.8A, $\varepsilon = 0,8$). Pour $\varepsilon = 1$, la plaque de verre est alors au contact avec la surface du gel, et le ver est totalement enfoncé dans le gel.

Le tracé de l'évolution de la courbure de chaque point du corps en fonction du confinement (Fig. 2.11) révèle une nette distinction entre le cou et la tête d'une part, qui voient leur courbure maximale augmenter de manière importante avec le confinement, et le reste du corps d'autre part, dont la courbure reste approximativement constante. Il est possi-



FIGURE 2.8 – Confinement quasi-statique. A Photographies du ver en mouvement pour différentes valeurs du paramètre de confinement, ε . B Projections correspondantes du squelette au cours du temps (du gris vers le noir), sur une durée de 4 s. Intervalle entre chaque forme : 0,05 s.



FIGURE 2.9 – Exemples de graphiques spatiotemporels de la courbure, pour le type sauvage. A $\varepsilon = -0.5$. B $\varepsilon = 0.2$. C $\varepsilon = 0.7$.

ble que la nature du confinement imposé, qui n'est pas homogène sur toute la longueur du ver en raison de l'amincissement de son diamètre aux extrémités, explique en partie cette différence. Cependant l'observation du ver se déplaçant dans des liquides de viscosité croissante semble montrer le même phénomène alors que les contraintes sont les mêmes sur l'ensemble du corps [89, 47].

En réalité, la différence de courbure le long du corps rappelle la séparation des circuits moteurs de la tête et du corps en deux unités neuromusculaires séparées [55] que nous avons exposée en introduction (chapitre 1), et le classement des muscles selon leur innervation : muscles de la tête, innervés par les neurones du ganglion de la tête; muscles du cou (neurones de la tête et motoneurones de la corde nerveuse ventrale); muscles du corps (motoneurones de la corde nerveuse uniquement). Les groupes de motoneurones commandant la contraction musculaire n'étant pas les mêmes, il est vraisemblable que les mécanismes régulant la courbure de la tête et du reste du corps diffèrent.

2.4.2 Continuité dans l'espace des formes

Une approche alternative consiste à analyser le mouvement du ver en utilisant la méthode de l'analyse en composantes principales, telle que proposée par Stephens *et al.* [99]. On définit un espace des formes, où la forme du ver est repérée par un point. Lors d'un cycle de déformations, la forme du ver décrit une trajectoire fermée dans cet espace. Il s'agit d'en extraire une base, composée d'un nombre réduit de vecteurs et suffisante pour pouvoir décrire l'essentiel des formes observées, au sens suivant : l'essentiel de la variance



FIGURE 2.10 – Évolution des paramètres de la locomotion. A Période (*T*) et **B** vitesse de l'onde de courbure (V_w) en fonction du paramètre de confinement, ε . Les barres d'erreur indiquent l'écartype sur l'ensemble des vers observés. La ligne pointillée verticale indique le contact entre la plaque, le ver et le gel en $\varepsilon = 0$.



FIGURE 2.11 – Évolution de la courbure maximale en chaque point du corps. Chaque courbe correspond à un point du corps, repéré par sa coordonnée curviligne s et une couleur associée (échelle à droite). Les muscles se divisent en trois groupes suivant leur innervation : muscles de la tête, muscles du cou et muscles du corps.

doit être expliqué en se restreignant au sous-espace engendré par cette base réduite.

Dans l'étude de Stephens *et al.*, le ver est suivi lors de ses déplacements dans une boîte de Pétri. Il est montré que l'ensemble des formes adoptées par le ver, phases de réorientation comprises, peut se décomposer sur un ensemble de quatre vecteurs, appelés *vers propres* (*eigenworms*). Le comportement du ver peut être visualisé comme une trajectoire dans le sous-espace correspondant, et son suivi fait apparaître de multiples points d'attraction. Les auteurs montrent que la réponse à un stimulus thermique se traduit par des trajectoires hautement reproductibles, dépendant de la position initiale dans l'espace des formes.

Ici nous utilisons une méthode similaire dans une autre perspective : extraire des formes représentatives du ver pour les différentes valeurs du confinement. Nous nous limiterons donc aux périodes durant lesquelles le ver se déplace vers l'avant. La procédure est identique à celle de Stephens *et al.*. Une description intrinsèque de la forme du ver est obtenue lors du traitement des images à partir des N angles θ_i formés par la tangente au squelette du ver en un point \mathbf{x}_i d'abscisse *s* et l'horizontale (Fig. 2.4). Les angles sont centrés afin d'obtenir une description indépendante de l'orientation du nématode, soit

$$\frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}\theta_{i} = 0.$$
(2.7)

De même que la donnée de la courbure le long du corps au cours du temps, $\kappa_i(t)$, la connaissance de $\theta_i(t)$ fournit une description complète des déformations du ver dans son propre référentiel.

La forme du ver,

$$\mathbf{w} = \sum_{i=1}^{N} \theta_i \mathbf{a_i} \tag{2.8}$$

se décompose dans l'espace des formes sur une base $(\mathbf{a_i})_{1 \le i \le N}$ dont chaque élément est un « ver de base » dont la forme consiste en deux segments formant entre eux un angle de 1 rad au point d'abscisse curviligne s = i/100. L'objectif de l'analyse en composantes principales est de trouver une base plus naturelle de l'espace des formes et contenant moins de vecteurs de base, tout en conservant l'essentiel de la diversité des formes décrites. L'ensemble des formes pour un confinement donné est collecté sur l'ensemble des vers ; puis la matrice de covariance des angles,

$$C_{ij} = \langle (\theta_i - \langle \theta_i \rangle) (\theta_j - \langle \theta_j \rangle) \rangle, \qquad (2.9)$$

où $\langle \rangle$ indique la moyenne effectuée sur l'ensemble des formes successivement adoptées par les vers que l'on observe, est calculée. Quelques exemples de matrices de covariance sont données Figure 2.12A. Ainsi que le remarquent Stephens *et al.*, la structure de la matrice montre que l'élasticité du ver contraint fortement l'ensemble des formes accessibles en limitant l'angle formé par des segments proches et permet de prévoir que le comportement du ver sera effectivement décrit correctement si on se restreint à un sous-espace de



FIGURE 2.12 – Calcul des vers propres. A Exemples de matrices de covariance pour trois valeurs du paramètre de confinement, ε . B Les quatre premiers vecteurs propres \mathbf{u}_{μ} obtenus par diagonalisation de la matrice de covariance, pour $\varepsilon = 0, 5$.

basse dimension – en d'autres termes, que le nombre de valeurs propres de la matrice de covariance est réduit.

La diagonalisation de C_{ij} fournit une nouvelle base de l'espace des formes, formée des vecteurs propres \mathbf{u}_{μ} (*vers propres*) ordonnés par ordre décroissant des valeurs propres λ_{μ} correspondantes. La forme du ver s'écrit dans cette base

$$\mathbf{w} = \sum_{\mu=1}^{N} \varphi_{\mu} \mathbf{u}_{\mu}, \qquad (2.10)$$

où les φ_{μ} sont les coordonnées du ver dans la nouvelle base. Si l'on se restreint aux quatre premiers termes de cette somme, on obtient une forme très proche de celle résultant de la combinaison totale; et ce, pour tous les confinements. En effet, le pourcentage de la variance totale σ obtenu en ne gardant que les quatre premiers modes dépasse 99% quelque soit la valeur de ε – dans le cas de la nage, ce pourcentage est atteint avec seulement deux modes. En pratique, cela signifie que n'importe quelle forme sera obtenue par combinaison de ces quatre *vers propres*,

$$\mathbf{w} = \sum_{\mu=1}^{4} \varphi_{\mu} \mathbf{u}_{\mu}. \tag{2.11}$$

La Figure 2.12**B** montre les quatre *vers propres* obtenus pour $\varepsilon = 0.5$.

Nous proposons de reconstruire une forme fictive w_f pour chaque confinement en combinant les quatre *vers propres* avec les poids donnés par la racine carrée des valeurs propres


FIGURE 2.13 – Formes fictives ordonnées par confinement croissant. Les formes fictives sont obtenues par combinaison linéaire des quatre premiers *vers propres* ; leur poids relatif est donné par la racine carrée de la valeur propre correspondante (variance selon l'axe correspondant).

(ces valeurs propres étant des variances),

$$\mathbf{w}_{\mathbf{f}} = \sum_{\mu=1}^{4} \sqrt{\lambda_{\mu}} \mathbf{u}_{\mu}. \tag{2.12}$$

Cette forme a un sens si l'on considère que les trajectoires périodiques décrivent des ellipses dans l'espace des formes. Les formes réelles reconstruites à partir des angles obtenus par cette combinaison, fictives mais représentatives des formes réelles, sont présentées Figure 2.13. On y voit les caractéristiques de la transition de la nage vers la reptation observées au paragraphe précédent : diminution progressive de la longueur d'onde, accroissement de la courbure maximale de la partie antérieure. Cette approche montre la continuité de la posture typique dans l'espace des formes.

Nous pouvons en outre utiliser l'analyse en composantes principales pour définir l'amplitude et la période spatiale de la forme du ver. En effet, lors de l'analyse des images, nous n'avons pas accès directement à l'amplitude, A, ni à la période spatiale, λ , utilisées dans le modèle de Gray. Nous pouvons seulement les déduire des paramètres de la locomotion mesurés (T, V_w , κ_{max}) sous certaines hypothèses (annexe C).

Ici, nous proposons de mesurer l'amplitude et la période spatiale directement sur les formes fictives obtenues par reconstruction après l'analyse en composantes principales (Fig. 2.14A). Les valeurs obtenues sont inférieures à celles généralement rapportées dans la littérature, mais leur évolution confirme la continuité dans l'espace des formes (Fig. 2.14B, C).



FIGURE 2.14 – Amplitude et période spatiale, après analyse en composantes principales. A Le squelette obtenu par reconstruction (Eq. 2.12, courbe noire) est approché par une droite (en gris), par un ajustement linéaire. La demi-période spatiale, $\lambda/2$, est définie comme la distance entre les deux premières intersections (en partant de la tête) entre la courbe et la droite ; l'amplitude A comme la distance du premier extrema de la courbe à la droite. Évolution de l'amplitude A (**B**) et de la période spatiale λ (**C**) en fonction du paramètre de confinement.

2.4.3 Évolution de la vitesse de progression

La vitesse de progression du ver dans le référentiel du laboratoire montre deux tendances différentes suivant que le ver nage entre les deux surfaces ou qu'il est confiné (Fig. 2.15A).

Dans le domaine des ε positifs, la vitesse de progression diminue avec le confinement. Le glissement diminue aussi : alors que la vitesse de l'onde, V_w , est divisée par 20 entre $\varepsilon = 0$ et $\varepsilon = 1$, la vitesse de progression n'est divisée que par 4. Le pourcentage de glissement, défini comme $1 - V/V_w$, chute de 90% à 20% (Fig. 2.15**B**). Nous verrons plus bas que la diminution du glissement pour les confinements importants s'explique par la variation importante du rapport des coefficients de friction.

Lorsque le ver se déplace librement entre la plaque et la surface du gel (ε négatifs), sa vitesse de progression est d'autant plus grande que les deux surfaces sont proches. Quand ε est proche de 0, la trajectoire est aussi plus directionnelle que lors de la nage en volume (Fig. 2.8**B**, comparer les projections pour $\varepsilon = -0.8$ et $\varepsilon = -0.2$). Nous parlerons de « nage guidée » pour décrire la locomotion dans ces conditions.

Cette augmentation de la vitesse de progression du ver avec ε lorsqu'il nage n'est pas due à une modification des paramètres de la locomotion, qui restent constants sur la gamme des ε négatifs (Fig. 2.10 et 2.11). Le modèle ci-dessous montre qu'elle s'explique par l'évolution du rapport des coefficients de friction normal et longitudinal.

Le ver est ici assimilé à un cylindre infiniment long de rayon R, placé dans un liquide visqueux à mi-hauteur entre deux plaques rigides (Fig. 2.16), se déplaçant le long de l'axe horizontal à la vitesse normale V_n . La distance entre le cylindre et la plaque la plus proche



FIGURE 2.15 – Vitesse de progression. A Évolution de la vitesse de progression en fonction du paramètre de confinement, ε . B Évolution de la fraction de glissement, définie comme $1 - V/V_w$ (on a confondu la vitesse de l'onde de courbure et la vitesse de l'onde au sens de Gray) en fonction de ε .



FIGURE 2.16 – **Déplacement d'un cylindre entre deux plaques.** Schéma (coupe transversale) d'un cylindre de rayon *R* à mi-hauteur entre deux surfaces rigides. Le cylindre se déplace transversalement à la vitesse V_n . h(x) est la distance entre un point, d'abscisse *x*, de la surface du cylindre et la surface de la plaque la plus proche ; le minimum est atteint pour h(x) = e. On note p_0 et p_1 les valeurs de la pression de part et d'autre du cylindre. Le calcul (voir texte) décrit l'écoulement dans la zone grise, où a lieu l'essentiel des processus dissipatifs.

est notée e.

Nous nous limitons ici à l'écoulement dans la zone comprise entre le cylindre et l'une des deux plaques (considérées identiques), où prend place l'essentiel des processus dissipatifs. Cette zone apparaît en grisé Figure 2.16. Une longueur caractéristique de son extension est donnée par \sqrt{Re} , qui croît à la fois avec le rayon du cylindre, R, et avec la distance séparant le ver de l'une des deux surfaces, e. En régime visqueux, l'écoulement est décrit par l'équation de Stokes, qui relie le champ de pression p et le champ de vitesse **v**

$$\eta \Delta \mathbf{v} = \mathbf{grad} p. \tag{2.13}$$

L'espace e est petit devant les autres grandeurs du problème. Nous pouvons utiliser l'ap-

proximation de lubrification, selon laquelle

$$\eta \frac{\partial^2 v_x(x,z)}{\partial z^2} = \frac{\partial p}{\partial x}(x).$$
(2.14)

L'intégration de cette équation suivant *z*, en utilisant les conditions de non-glissement sur la paroi et à la surface du cylindre, fournit une expression de la vitesse,

$$v_x(x,z) = \frac{1}{2\eta} \frac{\partial p}{\partial x}(x)(z^2 - h(x)z) + V_n \frac{z}{h(x)},$$
(2.15)

où h(x) est la distance entre un point, d'abscisse x, de la surface du cylindre et la surface de la plaque la plus proche. Le débit en x vaut donc (par unité de longueur du ver),

$$Q(x) = 2 \int_{0}^{h(x)} v_x(x,z) dz$$
 (2.16)

$$= -\frac{\partial p}{\partial x}(x)\frac{h^3(x)}{6\eta} + V_n h(x).$$
(2.17)

Le cylindre se déplace vers la droite à la vitesse V_n . Le débit est constant, et correspond au volume de liquide déplacé par le mouvement du cylindre par unité de temps (Fig. 2.16),

$$Q(x) = -2RV_n. \tag{2.18}$$

Nous obtenons donc l'expression suivante pour le gradient de pression suivant l'axe horizontal :

$$\frac{\partial p}{\partial x}(x) = 6\eta V_n \frac{h(x) + 2R}{h^3(x)}.$$
(2.19)

Ceci permet d'estimer la différence de pression de part et d'autre du cylindre,

$$p_1 - p_0 = 2\frac{\partial p}{\partial x}(0)V_n\sqrt{Re}$$
(2.20)

$$= 12\eta \frac{e+2R}{e^3} V_n \sqrt{Re}$$
 (2.21)

$$= \frac{12\eta}{R} V_n(-\varepsilon)^{-5/2} (2-\varepsilon), \qquad (2.22)$$

avec $\varepsilon = -e/R$, le paramètre de confinement. Avec nos notations, $-\varepsilon$ est une quantité positive tant que le contact entre le cylindre et les parois n'est pas établi. Dans la limite où la plaque de verre est proche du ver ($-\varepsilon \ll 1$), la différence de pression vaut

$$p_1 - p_0 = \frac{24\eta}{R} V_n(-\varepsilon)^{-5/2}.$$
 (2.23)

Il en résulte une force (par unité de longueur) sur le cylindre, s'opposant au mouvement,

$$F_{n,L}^p = 48\eta V_n (-\varepsilon)^{-5/2}.$$
 (2.24)

Le cylindre est aussi soumis à une force de friction visqueuse (par unité de longueur) dans la zone d'extension \sqrt{Re} où existent de forts gradients de vitesse,

$$F_{n,L}^{\nu} \simeq 2\eta \frac{V_n}{e} 2\sqrt{Re}$$
 (2.25)

$$\simeq 4\eta V_n(-\varepsilon)^{-1/2},$$
 (2.26)

mais cette force est négligeable devant la force de pression lorsque $-\varepsilon$ tend vers 0. Par conséquent, on considère que la force normale sur le cylindre par unité de longueur, F_n , se réduit à la contribution de la pression, F_n^p .

Lorsque le cylindre se déplace le long de son axe principal à la vitesse V_l , la force de friction visqueuse vaut de même

$$F_l \simeq 2\eta \frac{V_l}{e} 2\sqrt{Re}$$
 (2.27)

$$\simeq 4\eta V_l(-\varepsilon)^{-1/2}.$$
 (2.28)

Les coefficients de friction normal et longitudinal par unité de longueur C_n et C_l , définis par $F_n = C_n V_n$ et $F_l = C_l V_l$, s'écrivent

$$C_n \simeq 48\eta (-\varepsilon)^{-5/2} \tag{2.29}$$

$$C_l \simeq 4\eta (-\varepsilon)^{-1/2}.$$
 (2.30)

Le rapport des coefficients de friction vaut donc

$$K = \frac{C_n}{C_l} \tag{2.31}$$

$$= 12(-\varepsilon)^{-1/2}.$$
 (2.32)

La formule d'Alexander [80] (Eq. 2.33) relie la vitesse de progression, V, aux paramètres de la locomotion ainsi qu'au rapport K des coefficients de friction normal et longitudinal,

$$\frac{V}{V_w} = \frac{K - 1}{K + \frac{\lambda^2}{2A^2\pi^2}}.$$
(2.33)

La quantité $2A^2\pi^2/\lambda^2$ est typiquement de l'ordre de 1 lors de la nage. Alors

$$\frac{V}{V_w} = \frac{12 - \varepsilon^2}{12 + \varepsilon^2}.$$
(2.34)

Ce rapport tend vers 1 quand le paramètre de confinement se rapproche de 0. Le pourcentage de glissement, défini comme $1 - V/V_w$ ou encore V_g/V_w où V_g est la vitesse de glissement, tend donc vers 0 à mesure que les plaques se rapprochent, si la vitesse de l'onde, V_w , est maintenue constante. Ces tendances sont confirmées expérimentalement. Le glissement le glissement est d'autant plus réduit que la plaque de verre est proche du ver (Fig. 2.15**B**). La vitesse de progression augmente alors que les paramètres de la locomotion restent fixés : ceci est dû à la variation asymétrique des coefficients de friction. Le modèle est trop grossier pour être comparé aux résultats expérimentaux ; cependant il explique de manière qualitative l'augmentation de la vitesse observée pour la nage et le phénomène de « nage guidée ».

Semin *et al.* [100] ont étudié expérimentalement et numériquement l'évolution des coefficients de friction d'un cylindre dans une géométrie semblable, mais où le cylindre reste fixe alors que le flux est imposé par une différence de pression de part et d'autre du cylindre. De même que pour notre modèle, le rapport $K = C_n/C_l$ diverge quand l'espace entre les plaques se réduit.

2.4.4 Évolution du rapport des coefficients de friction

Nous allons estimer le rapport des coefficients de friction normal et longitudinal, $K = C_n/C_l$, à partir de la formule établie par Alexander (Eq. 2.33). Il vient

$$K = \frac{1 + (V/V_w)(\lambda^2/2A^2\pi^2)}{1 - (V/V_w)}.$$
(2.35)

Nous n'avons mesuré ni l'amplitude ni la longueur d'onde. Ces quantités sont en effet difficiles à définir sans ambiguïté sur les formes observées. Il a déjà été noté que dans l'hypothèse où l'amplitude est petite devant la période spatiale, vitesse de propagation de l'onde, au sens de Gray, et vitesse de l'onde de courbure, telle qu'elle a été mesurée, peuvent être confondues; de même la période spatiale $\lambda \simeq \lambda_C = V_w T$. L'amplitude peut aussi être déduite de nos mesures. En effet, en supposant que la forme du ver peut être décrite par une fonction sinusoïdale³,

$$y(x) = A \sin\left(\frac{2\pi}{\lambda}x\right),$$
 (2.36)

toujours en supposant $A \ll \lambda$, l'amplitude est donnée par (annexe C)

$$A = \kappa_{max} \frac{\lambda^2}{4\pi^2}.$$
 (2.37)

Le rapport K estimé à partir de (2.35) et des valeurs ainsi obtenues de l'amplitude et de la longueur d'onde est tracé en fonction du confinement Figure 2.17A, ainsi qu'une autre estimation pour laquelle où nous avons utilisé les valeurs de l'amplitude et de la période spatiale fournies par l'analyse en composantes principales. Cette deuxième approche a le mérite de ne pas supposer une forme particulière du ver, mais utilise des valeurs de A et de λ que l'on sait sous-estimées. Dans tous les cas, les valeurs correspondant aux forts

^{3.} Ce n'est évidemment pas le cas, lorsqu'on considère les importantes variations de la valeur de la courbure maximale le long du corps.

confinements doivent être prises avec précaution, puisque K dépend fortement de la valeur du numérateur $1 - V/V_w$ quand celui-ci est petit, ce qui est le cas pour $\varepsilon > 0, 5$.

Pour la nage, *K* est de l'ordre de 1,6 (3 si l'on se sert des *vers propres*), ce qui correspond aux prédictions du modèle d'Alexander et aux estimations des coefficients de friction normal et longitudinal dans un liquide visqueux données dans le premier chapitre (section 1.5). Dans les deux cas, *K* augmente légèrement avec le confinement tant que ε reste négatif, en cohérence avec le modèle proposé ici (Eq. 2.34). Pour les ε positifs, *K* augmente rapidement jusqu'à $\varepsilon = 0, 5$. La gamme des *K* explorés est comparable aux expériences de Berri *et al.*. L'estimation du rapport des coefficients de friction montre l'étendue des conditions mécaniques dans lesquelles peut se déplacer *C. elegans* en modulant sa locomotion.

Nous proposons aussi (Fig. 2.17**B** et **C**) un aperçu de l'évolution de la période et de la vitesse des ondes en fonction du rapport des coefficients de friction, paramétrée par ε . Pour cela nous avons ajusté les valeurs de *K* (obtenues en approchant la forme du ver par un sinus) par une fonction de Boltzmann du type

$$K_{\rm fit}(\varepsilon) = K_1 + \frac{K_{\rm nage} - K_1}{1 + \exp[\delta(\varepsilon - \varepsilon_0)]},$$
(2.38)

où K_{nage} est le rapport des coefficients en milieu liquide (fixé à 1,6), K_1 le rapport des coefficients quand le ver est totalement enfoncé dans le gel ($\varepsilon = 1$) (à déterminer), et δ et ε_0 deux paramètres supplémentaires à déterminer. L'ajustement des données fournit les valeurs $K_1 = 79, 6 \pm 9, 5$; $\delta = 11, 7 \pm 5, 5$; $\varepsilon_0 = 0, 45 \pm 0, 05$. La courbe ajustée est tracée en pointillés rouges Figure 2.17**A**. Les valeurs de $K_{\text{fit}}(\varepsilon)$ sont ensuite utilisées pour tracer l'évolution de la période et de la vitesse de propagation en fonction du rapport des coefficients de friction (Fig. 2.17**B** et **C**).

2.5 Étude du mutant unc-79(e1068)

Les données rassemblées ici sur la locomotion de vers de type sauvage dans des environnements mécaniques variés permet la comparaison avec des mutants présentant des défauts de la locomotion. En premier lieu, nous avons voulu soumettre aux expériences de plaquage le mutant *unc-79*, dont Pierce-Shimomura *et al.* ont remarqué l'incapacité à transiter d'un mode lent à un mode rapide de locomotion. L'existence de mutants qui rampent (presque) sans défaut apparent mais incapables de passer de manière continue de la reptation à la nage lorsqu'ils sont brusquement immergés pose en effet une réelle difficulté face aux conclusions de nos expériences de plaquage. Nous adoptons de nouveau les deux approches (dynamique et quasi-statique) décrites plus haut.

2.5.1 unc-79 et unc-80, nécessaires à l'établissement des canaux NCA

Le crible génétique mené par Pierce-Shimomura *et al.* [97] à partir de l'hypothèse que nage et reptation constituaient deux allures distinctes a permis d'isoler trois mutations



FIGURE 2.17 – Évolution du rapport des coefficients de friction, K. A En noir, K est calculé à partir des moyennes des paramètres de la locomotion pour les différentes valeurs du confinement ε , en supposant une forme sinusoïdale pour le ver. Nous avons utilisé la courbure maximale au milieu du corps pour κ_{max} dans l'équation 2.35. Une approche alternative (en gris) utilise les valeurs de l'amplitude et de la période spatiale obtenues par l'analyse en composantes principales. La valeur de K n'est pas calculée pour $\varepsilon = -0.9$ car la forme reconstruite est aberrante. La courbe pointillée rouge est un ajustement de $K(\varepsilon)$ par une fonction de Boltzmann (voir texte). B Moyenne de la période $T(\varepsilon)$ en fonction du rapport $K_{fit}(\varepsilon)$ des coefficients de friction déterminé par ajustement de $K(\varepsilon)$. Chaque point correspond à une valeur de ε . C Moyenne de la vitesse de propagation $V_w(\varepsilon)$ en fonction de $K_{fit}(\varepsilon)$.

(pour les gènes *unc-79* et *unc-80*) correspondant au même phénotype : les vers rampent normalement, malgré une fréquence d'oscillation et une vitesse de propagation plus basses ; mais, une fois déposée une goutte d'eau à la surface du gel, une seule onde de courbure est propagée, puis les vers s'immobilisent durant quelques secondes avant de se mettre à nager. Le même phénotype est observé chez les doubles mutants *nca-1*;*nca-2*, avec qui ils partagent aussi un phénotype *fainter* : lorsqu'il rampe, le ver s'arrête fréquemment durant plusieurs secondes avant de reprendre son mouvement. De plus, lorsqu'on provoque une marche arrière, l'ensemble de ces mutants réagit de la même manière : une seule propagation vers l'avant de l'onde a lieu, puis le ver reste immobile quelques secondes.

unc-79, unc-80, nca-1 ou *nca-2* (ces deux derniers étant redondants) sont tous nécessaires à l'établissement des canaux ioniques de type NCA (*Nematode Calcium*) [101], qui ne sont pas fonctionnels chez les mutants isolés. L'expression de *unc-79* et de *unc-80*, visualisée par fluorescence, recouvre celle de *nca-1* et *nca-2* dans les motoneurones cholinergiques de la corde nerveuse ventrale. Les canaux de type NCA pourraient être des canaux dits « de fuite », permettant de maintenir localement le potentiel de membrane au-dessus de sa valeur de repos, afin de faciliter la propagation d'une dépolarisation du neurone le long de son axone, sans perte de signal [101]. La perte de NCA-1 et NCA-2 conduit en effet à une réduction de la transmission synaptique au niveau des jonctions neuromusculaires cholinergiques et GABAergiques.

L'hypothèse exposée pour expliquer le phénotype des mutants isolés par Pierce-Shimomura *et al.* est la suivante : le passage d'un mode de locomotion lent (reptation) à un mode rapide (nage, fuite vers l'arrière) nécessiterait une phase d'initiation reposant sur l'activation des canaux de type NCA [97]. Le mécanisme exact du rôle joué par ces canaux n'est cependant pas détaillé.

2.5.2 Confinement dynamique et quasi-statique des mutants unc-79

Nous avons d'abord soumis les mutants *unc-79(e1068)* à un changement dynamique du confinement correspondant à la libération soudaine d'un ver initialement confiné, afin de comparer le comportement des mutants avec celui de la souche sauvage (présenté Fig. 2.7). Lorsqu'ils se retrouvent en milieu liquide entre la plaque de verre et le gel, la plupart des mutants s'immobilisent avant de progressivement commencer à nager, ainsi que l'avaient décrit Pierce-Shimomura *et al.* (Fig 2.18**A**). La distribution des durées de cette immobilisation (Fig 2.18**B**) montre qu'elle dure en moyenne 4 à 5 s et qu'elle est très variable. Les mutants parviennent cependant à adapter leur allure et à nager après ce retard.

Nous avons aussi analysé le mouvement des mutants *unc-79(e1068)* dans le cadre du confinement quasistatique, afin de quantifier les différences globales par rapport à la souche sauvage, et l'évolution de la locomotion en fonction du confinement. D'une manière générale, cette dernière est beaucoup plus hésitante (de manière cohérente avec le phéno-type *fainter*), et présente de nombreux épisodes de déplacement arrière ou d'immobilisation, ce qui rend plus difficile la quantification du mouvement. Nous nous sommes restreints pour notre analyse aux phases de déplacement vers l'avant. Trois exemples de graphiques spatiotemporels de la courbure pour différentes valeurs du confinement sont donnés Figure 2.19. L'évolution moyenne des paramètres de la locomotion est présentée Figure 2.20.

Les mutants *unc-79(e1068)* présentent des défauts de la locomotion sur l'ensemble des confinements. Lors de la nage et pour les faibles valeurs positives du confinement, la période est plus longue, la vitesse de propagation des ondes plus faible, et la courbure moins importante. Les mutants ne présentant pas d'altération visible des muscles ou de la cuticule, ce dernier point est probablement à mettre sur le compte d'une moindre excitation des muscles par les motoneurones. Il n'est pas rare d'observer des ondes de courbure « se rejoindre » avant d'avoir atteint l'extrémité postérieure de l'animal. Les défauts deviennent sévères pour les fortes valeurs du confinement ($\varepsilon \ge 0,4$). Bien que leur fréquence soit comparable à celle de la souche sauvage, les oscillations qui naissent à la tête ne se propagent pas toutes le long du corps (Fig. 2.19), et la progression devient très lente. Ceci est illustré par le suivi de la période (Fig. 2.20) : nous avons mesuré la période des oscillations à la tête (vert sombre) et au milieu du corps (orange). La disjonction s'opère à partir de $\varepsilon = 0, 4$, et la très importante variabilité des mesures effectuées au milieu du corps reflète le caractère



FIGURE 2.18 – Libération soudaine de *unc-79(e1068)*. A Exemple de graphique spatiotemporel de la courbure. L'évolution du paramètre de confinement au cours du temps est donnée à gauche. B Distribution des délais séparant la libération de la reprise du mouvement (nombre de vers = 30.



FIGURE 2.19 – Exemples de graphiques spatiotemporels de la courbure, pour *unc-79(e1068)*. A $\varepsilon = -0.5$. B $\varepsilon = 0.2$. C $\varepsilon = 0.7$.



FIGURE 2.20 – Évolution des paramètres de la locomotion des mutants *unc-79(e1068)* en fonction du confinement. Les résultats pour la souche sauvage sont rappelés en noir pour comparaison. Les courbes sont obtenues en moyennant la réponse de 12 vers à différents confinements. Les barres d'erreur représentent l'écart-type des mesures pour un confinement donné. Sont présentées : A la période, mesurée à la tête (vert) et au milieu du corps (orange) ; B la vitesse de propagation des ondes le long du corps ; C la courbure maximale du corps en différents points : tête (s = 0, 1, haut), milieu (s = 0, 5, milieu) et queue (s = 0, 9, bas). Statistiques : test de Kolmogorov-Smirnov sur les données correspondant aux quatres valeurs du confinement modéré) et $\varepsilon = 0, 8$ (fort confinement). Les astérisques indiquent les confinements pour lesquels p < 0,05 après correction de Bonferroni.

erratique de la propagation des ondes le long du corps.

Ces observations montrent que les défauts de *unc-79(e1068)* ne se limitent pas à l'initiation de la nage, mais affectent l'ensemble des modes de la locomotion, dans l'ensemble des conditions mécaniques auxquelles nous avons soumis les vers. Le corps est moins courbé, et la contraction musculaire se propage avec difficulté, à des vitesses moindres. Dans ces conditions, il est difficile de conclure que le délai observé entre reptation et initiation de la nage lors de la libération soudaine des mutants est dû à un défaut dans l'initiation d'une forme rapide de locomotion. Ce délai peut aussi bien être la conséquence d'un défaut du mécanisme de propagation de l'onde qui confère au type sauvage sa robustesse vis-à-vis d'une variation brusque du confinement, et correspondre au temps d'initiation d'une nouvelle onde (Fig. 2.18**A**, c'est seulement à partir de la deuxième onde de courbure initiée à la tête que les ondes se propagent correctement). Le rôle des canaux ioniques de type NCA à l'élaboration desquels participerait *unc-79* n'est cependant pas suffisamment caractérisé pour formuler des hypothèses solides sur leur rôle lors de la locomotion [101].

2.6 Conclusion et discussion

Les récentes études de l'influence de l'environnement mécanique sur la locomotion de *C. elegans* utilisent des liquides de visco-élasticité variable afin d'induire les différents modes de locomotion [89, 83, 47]. Le système de plaquage décrit en début de section permet une nouvelle approche de l'étude de la locomotion de *C. elegans* : non seulement parce que les situations mécaniques explorées comprennent la nage et la reptation sur gel, les deux modes de locomotion communément observés au laboratoire ; mais aussi parce que l'environnement peut être modulé en temps réel par l'utilisateur, afin d'observer la dynamique de la transition d'un mode de locomotion à l'autre.

La variation des paramètres retenus pour décrire le mouvement de *C. elegans* pour divers degrés du confinement montre la forte dépendance de la locomotion par rapport à l'environnement mécanique. Cette évolution se caractérise par la continuité de tous les paramètres par rapport au paramètre de confinement, et par la continuité des postures dans l'espace des formes, comme le montre l'analyse en composantes principales. Ceci confirme les résultats obtenus pour des variations dynamiques du confinement, qui montraient la continuité des modes de locomotion dans le temps. Plutôt que de comprendre deux allures distinctes, nage et reptation, séparées par une transition discontinue, la locomotion de *C. elegans* consiste en la déclinaison d'une seule allure en un ensemble de modes. Cet ensemble est continu au sens qu'il peut être décrit par des quantités qui varient continûment en fonction de l'environnement.

À partir des mesures de l'activité musculaire des vers lors de la nage et de la reptation (Fig. 2.21), Pierce-Shimomura *et al.* [97] ont émis l'hypothèse que nage et reptation sont deux modes de locomotion distincts. Cet argument n'est pas contradictoire par rapport à nos conclusions. À une allure donnée peuvent correspondre un ensemble de schémas d'excitation et de contraction musculaires dont la cinématique évolue de manière continue, sans



FIGURE 2.21 – Mesures de l'activité musculaire par Pierce-Shimomura *et al.* [97]. La courbure est représentée par la couleur, et tracée au cours du temps (axe horizontal), le long du corps (A: antérieur, P: postérieur), pour les côtés dorsal et ventral. Les axes temporels et spatiaux sont inversés par rapport à la représentation graphique introduite Figure 2.5. Les pointillés délimitent les zones où a été mesurée une forte activité musculaire par FRET. Les schémas d'excitation musculaires sont différents pour la nage et la reptation, et les zones de forte activité coïncident avec de fortes courbures.

Référence	$\lambda_{C, min}/L$	$\lambda_{C, max}/L$	T_{min} (s)	T_{max} (s)
Fang-Yen et al. [47]	0,8	1,5	0,6	6,7
Berri et al. [83]	0,5	1,5	0,7	5
Cette étude	0,4	1,1	0,6	5,7

TABLE 2.1 – Valeurs limites des paramètres de la locomotion : comparaison avec les études tirées de la bibliographie. Valeurs pour la longueur d'onde de courbure $\lambda_C = V_w T$ rapportée à la taille du ver et pour la période T du mouvement.

que les modalités de l'excitation du système nerveux ne changent qualitativement⁴. Ceci pourrait être confirmé par les mesures de l'activité musculaire des vers lors de la reptation initiées par Charlotte Py au laboratoire et reprises par Thomas Chartier.

L'étendue de la gamme des modes induits grâce au système de plaquage est comparable aux études déjà existantes [47, 83] (Table 2.1), utilisant différentes concentrations de méthylcellulose ou de gélatine. Nos valeurs de la longueur d'onde de courbure sont sensiblement inférieures aux valeurs des travaux existants⁵; en revanche l'évolution globale des paramètres est la même.

Notre approche, qui consiste à remplacer les forces capillaires par le confinement, a l'a-

^{4.} Ainsi, lors de la marche, la vitesse désirée est atteinte en faisant varier la longueur des pas ou leur fréquence, mais le mouvement reste qualitativement le même.

^{5.} Ceci est peut-être dû au fait que nous avons utilisé des individus légèrement plus âgés lors de nos expériences, donc de taille supérieure (annexe B). De plus, les animaux sont plus longs lorsqu'ils sont cultivés à $16^{\circ}C$ [35], comme c'est le cas pour nos travaux.

vantage de reproduire les conditions de la reptation sur gel – excepté le fait que la force qui s'exerce sur le ver n'est pas uniforme tout au long de son corps en raison de la diminution de son diamètre aux extrémités ; d'y parvenir de manière continue depuis la nage, puis de les dépasser jusqu'à la reptation *dans* le gel, pour $\varepsilon = 1$. En théorie, ce plaquage contrôlé est équivalent à faire varier la tension superficielle du liquide imprégnant le gel, ce qui est difficile à réaliser en pratique, à cause de la toxicité des tensioactifs [81].

Un intérêt supplémentaire est l'observation de la nage guidée : lorsque les deux surfaces, verre et gel, se rapprochent sans qu'il y ait contact, la vitesse du nématode augmente significativement en raison de la modification du rapport des coefficients de friction. Le caractère directionnel de la nage, aussi appelée *thrashing* en anglais, a été discuté [97] en raison de son apparente inefficacité : en effet, en l'absence de parois, le ver tourne littéralement en rond et ne semble pas progresser en dépit de ses battements rapides. Nos expériences montrent que lorsque les parois sont proches, le mouvement est bien directionnel : il se pourrait donc que la nage représente au contraire un mode de locomotion efficace près des interfaces liquide/solide ou liquide/air, où la résistance du milieu est faible alors que le rapport des coefficients de friction est favorable : ces situations sont vraisemblablement plus souvent rencontrées dans la nature que de vastes volumes d'eau, qui ne semblent pas constituer l'habitat naturel de *C. elegans*.

Les expériences dynamiques illustrent un autre avantage de la locomotion ondulatoire de *C. elegans* dans des environnements complexes et changeants : lors de variations lentes comme brusques du confinement, le mouvement ne s'arrête pas alors que la forme et le rythme du ver s'adaptent immédiatement, ce qui montre la grande robustesse de ce mode de locomotion tel qu'il est biologiquement mis en œuvre chez *C. elegans*. Cette robustesse aux perturbations mécaniques est reproduite par certains modèles numériques [73], mais n'avait pas été observée jusqu'ici. Au contraire, les mutants *unc-79* s'immobilisent quelques secondes lorsqu'ils sont libérés brusquement dans du liquide.

Après avoir observé et caractérisé la transition de la nage vers la reptation, nous disposons des courbes d'évolution des paramètres de la locomotion, que nous utiliserons dans le chapitre suivant pour déterminer l'influence de certaines mutations de gènes impliqués dans la mécanosensation sur l'adaptation à l'environnement mécanique. L'attrait du modèle *C. elegans* réside en effet dans le grand nombre de mutants disponibles. L'observation de certains d'entre eux permet de dégager des éléments de réponse sur les mécanismes, moléculaires et neuronaux, à l'origine de la modulation de la locomotion.

CHAPITRE **3**

Mécanosensation et régulation de la locomotion

Sommaire

Mécanosensation chez <i>C. elegans</i>		80
3.1.1	Neurones mécanosensoriels	80
3.1.2	Mécanismes moléculaires de la mécanotransduction	82
Effets	de la suppression du toucher léger	82
3.2.1	Le complexe mécanotransducteur MEC-4/MEC-10	82
3.2.2	Confinement des mutants mec-4(e1611)	84
trp-4	: le rôle potentiel du contrôle de la courbure	88
3.3.1	TRP-4 est nécessaire pour la sensibilité à la texture et au contrôle	
	de la courbure	89
3.3.2	Confinement de <i>trp-4(sy695)</i> : résultats et discussion	90
Le choix du couple (T, V_w) dépend des neurones ciliés \ldots		92
Conclusion		
	Mécai 3.1.1 3.1.2 Effets 3.2.1 3.2.2 <i>trp-4</i> 3.3.1 3.3.2 Le che Concl	 Mécanosensation chez <i>C. elegans</i> 3.1.1 Neurones mécanosensoriels 3.1.2 Mécanismes moléculaires de la mécanotransduction Effets de la suppression du toucher léger 3.2.1 Le complexe mécanotransducteur MEC-4/MEC-10 3.2.2 Confinement des mutants <i>mec-4(e1611)</i> <i>trp-4</i> : le rôle potentiel du contrôle de la courbure 3.3.1 TRP-4 est nécessaire pour la sensibilité à la texture et au contrôle de la courbure 3.3.2 Confinement de <i>trp-4(sy695)</i> : résultats et discussion Le choix du couple (<i>T</i>, <i>V_w</i>) dépend des neurones ciliés

Nous avons établi que *C. elegans* module un unique mode de locomotion en fonction de son environnement mécanique. Quelles sont les voies de cette adaptation ? L'architecture du sous-système nerveux de la locomotion distingue trois niveaux de traitement de l'information sensorielle : neurones mécanosensoriels, interneurones de commande et motoneurones. La propagation d'une onde de courbure reste observable en l'absence d'une partie des entrées sensorielles chez des mutants présentant des défauts de la mécanosensation tels que *che-3* [97] ou *mec-4* [89].

La locomotion est cependant affectée chez ces mutants, indiquant un rôle important de la mécanosensation lors du choix des paramètres de la locomotion dans un milieu donné. C'est ce rôle que nous avons voulu explorer et quantifier en soumettant des animaux mutants aux expériences de plaquage décrites dans la partie précédente : nous étudions les effets du confinement sur la locomotion de quelques mutants qui présentent des défauts de la mécanosensation, mec-4(e1611), trp-4(sy695) et che-3(e1124).

3.1 Mécanosensation chez C. elegans

Les animaux adaptent leur comportement en réponse aux données mécaniques qu'ils perçoivent par l'intermédiaire des neurones mécanosensoriels : forces externes, telles que le poids, les chocs avec des obstacles, les variations rapides de pression extérieure dans le cas de l'audition, la résistance du milieu au mouvement lors de la locomotion; forces internes, comme le degré d'étirement d'une partie du corps, ou la pression interne. Le sens du toucher dans le premier cas, la proprioception dans le second, sont donc deux modalités de la mécanosensation.

La mécanosensation est très étudiée chez le modèle *C. elegans*. La combinaison de techniques de neurobiologie (enregistrement de courants transmembranaires, ablation sélective par laser de neurones), d'imagerie (FRET) et de génétique ont permis d'identifier les neurones responsables de la mécanosensation et leur fonction, ainsi que certains des mécanismes moléculaires de la mécanotransduction à l'œuvre dans ces neurones.

3.1.1 Neurones mécanosensoriels

Les neurones mécanosensoriels représentent approximativement un dixième des neurones de *C. elegans*, sans compter les motoneurones qui portent peut-être des récepteurs à l'étirement, et d'autres cellules potentiellement impliquées dans la proprioception [102]. Leur emplacement ne varie pas d'un individu à l'autre. Deux types de cellules mécanosensorielles sont à distinguer : les neurones ciliés, portant des cils mécanosensibles sur leurs dendrites, et les neurones non ciliés [103] (Table 3.1).

Les cils des neurones ciliés sont des extensions membranaires qui sont soit en contact avec le milieu extérieur, soit enchâssés dans la cuticule dont ils ressentent les déformations. Parmi ces cellules, les neurones ASH, dont les cils sont exposés au dehors de la cuticule,

Neurones		Principaux comportements associés	
Non-ciliés	ALM (L, R), PLM (L, R),	Réaction au toucher léger	
	AVM, PVM		
	PVD (L, R)	Réaction au toucher appuyé	
Ciliés	CEP (DL, DR, VL, VR),	Ralentissement en présence de nourriture	
	ADE(L, R), PDE(L, R)		
	ASH (L, R), FLP (L, R),	Péaction au toucher du nez	
	OLQ (DL, DR, VL, VR)	Reaction au toucher du nez	
	IL1 (DL, DR, L, R, VL, VR)	Réaction au toucher du nez	

TABLE 3.1 – **Neurones mécanosensoriels de** *C. elegans*, **d'après [102].** Deux premières lignes : neurones non ciliés. Lignes suivantes : neurones ciliés. Les lettres indiquées entre parenthèses précisent la localisation des cellules lorsqu'elles sont plusieurs du même type : gauche (L), droite (R), ventrale (V), dorsale (D).

détectent les contacts du nez avec les obstacles : leur activation entraîne l'arrêt du ver et sa réorientation pour éviter l'obstacle. Une autre forme de toucher, la sensibilité à la texture, requiert les neurones ciliés CEP, ADE et PDE : lorsque le ver se trouve en présence de bactéries, la fréquence des ondulations et sa vitesse de progression diminuent [62].

Les neurones non-ciliés répondent au toucher léger (lorsque le ver est stimulé au moyen d'un cil monté sur une pipette pasteur ou sur un cure-dents) et au toucher appuyé (contact avec un fil de platine) [103]. Les neurones PVD sont responsables de la réaction au toucher appuyé [102] : ils sont activés par des forces importantes, (supérieures à 100 μ N). Ils possèdent pour cela un réseau de dendrites recouvrant la totalité de la surface du corps.

C. elegans possède aussi six neurones du toucher léger (Fig. 3.1), dont les longs prolongements couvrent la moitié postérieure ou antérieure du corps, suivant l'emplacement du corps cellulaire¹. Les neurones ALM droit et gauche et AVM qui se trouvent au milieu du corps ressentent en effet les stimulations légères de la partie antérieure du ver; PLM droit et gauche et PVM, de la moitié postérieure. Les corps cellulaires de ces neurones se trouvent dans la paroi du corps, et leurs extensions sont en contact étroit avec l'hypoderme et la cuticule, entourées de matrice extracellulaire, si bien qu'ils sentent vraisemblablement les légères déformations de celle-ci dues aux forces engendrés par les déplacements latéraux lors de la locomotion, ainsi que l'étirement lors de la courbure du corps. Des forces de l'ordre de 100 nN sont ainsi détectées, mais l'amplitude des courants transmembranaires sature pour des sollicitations supérieures à 1 μ N [104].

^{1.} Sur la manière dont une stimulation sur la moitié antérieure ou postérieure du corps entraîne un mouvement de fuite vers l'avant ou vers l'arrière, voir l'introduction (chapitre 1).



FIGURE 3.1 – **Neurones du toucher léger, d'après [102].** Pour les paires ALM et PLM, ne sont représentées que les cellules du côté gauche. Les stimulations mécaniques légères sont ressenties par ALM et AVM pour la moitié antérieure, par PVM et PLM pour la partie extérieure, grâce à de longs prolongements qui couvrent la moitié du corps.

3.1.2 Mécanismes moléculaires de la mécanotransduction

Les connaissances acquises sur le fonctionnement de neurones mécanosensoriels ont profité aux recherches sur les mécanismes moléculaires de la mécanotransduction, qui cherchent à déterminer comment les cellules nerveuses convertissent le stimulus mécanique en signal électrique ou chimique [105]. Lors d'une stimulation mécanique, les canaux ioniques mécanosensibles, qui sont des complexes protéiques présents sur la membrane des neurones, s'ouvrent. Il s'établit un courant ionique transmembranaire, qui modifie le potentiel du neurone [106].

Deux types de mécanismes permettent de contrôler mécaniquement l'ouverture de tels canaux [107] (Fig. 3.2). L'étirement de la membrane peut entraîner directement un changement de conformation et l'ouverture des canaux qui la traversent. Dans d'autres cas, les domaines extra ou intracellulaires sont liés physiquement à la matrice extracellulaire ou à des composants du cytosquelette. Le déplacement relatif de la membrane par rapport au point d'ancrage du lien entraîne l'ouverture du canal. C'est le cas, par exemple, du complexe MEC-4 chez *C. elegans*, ou encore des canaux ioniques des cellules ciliées de l'oreille interne chez l'homme.

3.2 Effets de la suppression du toucher léger

Nous avons observé la locomotion de mutants déficients pour le toucher léger, afin d'apprécier le rôle de cette entrée mécanosensorielle lors de la modulation de la locomotion induite par la modification du confinement. Notre intérêt s'est porté sur le gène *mec-4*, qui code pour une sous-unité d'un complexe protéique formant le pore d'un canal sodique mécanosensible présent sur les dendrites des six neurones du toucher léger [102].

3.2.1 Le complexe mécanotransducteur MEC-4/MEC-10

mec-4 est exprimé uniquement dans les neurones du toucher léger [109]. La sensibilité de ces derniers à des forces appliquées localement à la cuticule du ver a pu être mise en



FIGURE 3.2 – Mécanismes d'ouverture des canaux ioniques mécanosensibles, d'après [107]. A Les canaux récepteurs à l'étirement s'ouvrent quand la tension exercée sur eux par la membrane dépasse un certain seuil (gauche : canal fermé, droite : canal ouvert). B Le complexe protéique de MEC-4/MEC-10 chez *C. elegans* est un autre exemple de mécanisme d'ouverture, qui requiert un lien physique attachant une partie du canal à la matrice extracellulaire, et un lien intracellulaire (MEC-2) entre le canal et les microtubules du cytosquelette. La déformation de la cuticule, adjacente à la membrane, entraîne ainsi l'ouverture du canal et l'entrée des ions Na⁺. D'après [108].

évidence et caractérisée *in vivo* grâce à la technique du *patch-clamp*² et à la visualisation de l'activité des neurones par FRET [110]. L'approche génétique et l'étude de la structure de la protéine MEC-4 ont démontré qu'elle s'associe avec une protéine de structure voisine, MEC-10, et au moins trois autres protéines (MEC-2, UNC-24 et MEC-6), afin de former un canal ionique dont l'ouverture est provoquée par une stimulation mécanique correspondant à l'application d'une force allant de 100 nN à 1 μ N [109, 104] (Fig. 3.2**B**). Les courants mécanorécepteurs décroissent rapidement lorsque la force est maintenue, mais sont de nouveau observés lorsque la pression est relâchée, traduisant l'adaptation à un stimulus soutenu au niveau du neurone mécanosensoriel [104].

Korta *et al.*ont abordé le rôle de la mécanosensation dans la régulation de la locomotion en mesurant la fréquence des oscillations du ver dans des liquides de différentes viscosité [89]. Ils notent une augmentation de cette fréquence pour les mutants *mec-4* par rapport aux vers sauvages, ce qui laisse penser que le toucher léger joue un rôle dans l'adaptation de la locomotion aux conditions mécaniques. L'ablation laser des neurones du toucher léger ALM, puis PLM, donne des résultats similaires. Nous avons voulu tester cette hypothèse par l'observation de l'évolution des paramètres de la locomotion dans le dispositif de plaquage. Les neurones du toucher léger de la souche utilisée, *mec-4(e1611)*, ne fonctionnent pas³.

^{2.} Les courants traversant la membrane du neurone induits par l'ouverture des canaux ioniques sont mesurés en appliquant la pointe d'une micropipette contre la paroi membranaire de la cellule. Il est ainsi possible de suivre l'activité d'un canal unique [106].

^{3.} Outre la perte du toucher léger, ces mutants présentent une dégénération des six neurones correspondant [111]. Pour cette raison la superfamille à laquelle appartient MEC-4 est appelée DEG/ENaC (le terme ENaC faisant référence aux canaux sodiques épithéliaux des vertébrés).



FIGURE 3.3 – Graphique spatiotemporel de la courbure pour *mec-4(e1611)*. Trois exemples représentatifs de la locomotion pour différentes valeurs du confinement : $\varepsilon = -0,5$ (A), $\varepsilon = 0,2$ (B), $\varepsilon = 0,7$ (C).

3.2.2 Confinement des mutants mec-4(e1611)

Évolution des paramètres de la locomotion

Quelques exemples illustrant la locomotion de mec-4(e1611) dans le dispositif de plaquage sont présentés Figure 3.3. Si l'augmentation du confinement entraîne aussi une transition progressive de la nage vers la reptation, l'évolution des paramètres de la locomotion des mutants mec-4(e1611) se distingue des mesures effectuées sur la souche sauvage par une plus haute vitesse de propagation des ondes (Fig. 3.4), en particulier pour la nage, même si cela reste vrai pour de plus grandes valeurs de ε . La courbure du corps reste comparable à celle de la souche sauvage pour l'ensemble des confinements observés. La période est quant à elle légèrement inférieure pour les fortes valeurs du confinement.

Pour des confinements importants ($\varepsilon \ge 0,5$), il arrive fréquemment que les mutants présentent un défaut de la locomotion (Fig. 3.3C) : les ondes de courbure successives ne se propagent pas toutes à la même vitesse, et se rejoignent parfois avant d'avoir atteint la queue ; par ailleurs le degré de courbure du corps change d'une propagation à la suivante. Notons que les oscillations de la tête semblent régulières, et que le défaut concerne plutôt la propagation de l'onde que son initiation.

Nos résultats sont en contradiction avec ceux de Korta *et al.*, qui montraient une augmentation de la fréquence pour des mutants nuls mec-4(d) en train de nager (1,8 Hz contre



FIGURE 3.4 – Évolution des paramètres de la locomotion des mutants *mec-4(e1611)* en fonction du confinement. Les résultats pour la souche sauvage sont rappelés en noir pour comparaison. Les courbes sont obtenues en moyennant la réponse de 12 vers à différents confinements. Les barres d'erreur représentent l'écart-type des mesures pour un confinement donné. Sont présentées : A la période ; B la vitesse de propagation des ondes le long du corps ; C la courbure maximale du corps en différents points : tête (s = 0, 1, haut), milieu (s = 0, 5, milieu) et queue (s = 0, 9, bas). Statistiques : test de Kolmogorov-Smirnov sur les données correspondant aux quatres valeurs du confinement modéré) et $\varepsilon = 0, 8$ (fort confinement). Les astérisques indiquent les confinements pour lesquels p < 0,05 après correction de Bonferroni.



FIGURE 3.5 – Vitesse de progression de mec-4(e1611). A Évolution de la vitesse de progression en fonction du confinement, pour les mutants mec-4(e1611) et la souche sauvage (voir Fig. 3.4 pour les tests statistiques). B Comparaison de la nage d'un ver sauvage (gauche) et d'un mutant mec-4 (droite), sur deux cycles d'oscillation. La forme du mutant diffère de celle du ver sauvage, à cause de sa plus petite taille et de la valeur plus importante de V_w . La trajectoire du centre de masse (points noirs ou bleus) est plus régulière dans le cas du type sauvage. La vitesse moyenne de progression sur les deux cycles est indiquée par une flèche noire ou bleue. C Projection de la vitesse instantanée du centre de masse (notée V_x) sur la direction de la vitesse moyenne, pour les mêmes vers, sauvage (en noir) et mutant (en bleu). Lors d'un cycle, la vitesse du mutant, mais pas celle du type sauvage, peut passer par des valeurs significativement négatives.

1,5 Hz pour la souche sauvage), alors que la forme était préservée [89]. Ils semblent en revanche en accord avec d'autres observations d'un mutant moins sévère (mec-4(e1339)) [85].

Vitesse de progression

De manière surprenante, malgré une plus haute vitesse de propagation des ondes dans le référentiel du ver, la vitesse de progression dans le référentiel du laboratoire des mutants *mec-4* est plus faible, pour l'ensemble des confinements, que la vitesse de la souche sauvage (Fig. 3.4A).

Comment expliquer la détérioration de la vitesse de progression par rapport à la souche sauvage ? La seule différence entre les deux souches concerne la vitesse de propagation des ondes, V_w . Or, en supposant que la courbe maximale κ_{max} est une constante du mouvement, la vitesse de progression V doit varier comme (éq. 2.33)

$$V = V_w \frac{K - 1}{K + (2\omega^2)/(V_w^2 \kappa_{max}^2)},$$
(3.1)

où nous avons introduit $\omega = 2\pi/T$, la pulsation de l'onde de courbure, pour plus de clarté. Rappelons que *K* désigne le rapport des coefficients de friction normal et longitudinal. Selon la description de Gray/Alexander, lorsque *T*, κ_{max} et *K* sont fixés, la vitesse de progression est donc fonction croissante de la vitesse de propagation des ondes. Ce point est contredit par nos expériences.

Un examen de la taille des animaux utilisés pour les deux séries d'expériences (sauvages et mec-4(e1611)) révèle que les mutants avaient une taille légèrement inférieure (1,1 mm en moyenne contre 1,3 mm pour la souche sauvage). Cependant la taille de l'animal n'apparaît pas dans l'équation (3.1) autrement que dans la valeur des coefficients de friction. Si l'on s'en tient à la formule proposée dans le premier chapitre (éq. 1.18), le rapport théorique des coefficients de friction reste inchangé (1,38 pour les mutants contre 1,4 pour la souche sauvage).

En revanche, la longueur de l'animal, de même que la valeur de la vitesse de propagation de l'onde, ont une influence sur la forme du ver. Ainsi, pour un confinement de $\varepsilon = -0.5$, la longueur d'onde le long du corps $\lambda_C = V_w T$ vaut 1,9 en moyenne pour mec-4 et 1,26 pour la souche sauvage. Rapportée à la longueur du corps, la différence est encore plus importante : λ_C/L vaut 1,7 dans le premier cas, 1 seulement dans le second. Les conditions de la locomotion des mutants s'éloignent donc du cadre d'application de la théorie de Gray-Alexander telle que nous l'avons exposée dans le premier chapitre. Ce modèle suppose en effet soit que la longueur du ver est infinie, soit qu'elle correspond à un nombre entier de longueurs d'onde, ce qui assure qu'à tout instant la composante de la vitesse du ver perpendiculaire à la direction de propagation est nulle : les appuis sont équilibrés entre côté dorsal et côté ventral. Ce n'est plus le cas lorsque la forme du ver ne représente plus qu'une branche de sinus de longueur nettement inférieure à la période spatiale.

Nous ne pouvons pas proposer de relation entre vitesse de progression et vitesse de l'onde dans ces conditions, mais la comparaison de deux exemples de nage pour *mec-4* et pour un ver sauvage (Fig. 3.5B et C) semble indiquer que le mouvement du centre de masse est plus régulier dans le second cas, et que la forme du ver sauvage l'empêche de revenir en arrière lors d'un cycle d'oscillation, comme c'est le cas pour le mutant.

La vitesse de progression des mutants reste inférieure à celle de la souche sauvage pour des valeurs positives du confinement. Ceci est certainement imputable aux défauts de la locomotion qui apparaissent pour les fortes valeurs de ε .

Discussion

En comparaison des mutants *mec-4*, la valeur plus faible et la moindre variabilité de V_w pour la souche sauvage semblent indiquer que les neurones du toucher léger sont impliqués dans le contrôle de la propagation des ondes, mais ne participent pas à la régulation de la fréquence du mouvement. La valeur de V_w observée lors de la nage des vers sauvages ne représente pas une limite physiologique, mais semble plutôt maintenue inférieure à des valeurs que *C. elegans* réserve peut-être à d'autres situations : fuite, adaptation à la présence d'obstacles, etc.

Ces conclusions rappellent celles des expériences de Park *et al.*[85], lors desquelles *C. elegans* se déplace dans un réseau carré de plots d'agar (Fig. dans l'introduction). Alors que la vitesse de progression des vers sauvages est très nettement améliorée dans cet environnement, les mutants *mec-4(e1339)* s'y déplacent beaucoup moins efficacement, malgré une fréquence du mouvement comparable bien qu'un peu plus faible. Ces mutants semblent incapables d'adapter leur forme à la topologie particulière du milieu (par exemple, en ajustant la valeur de V_w et donc de λ_C). De même, le contrôle de la valeur de V_w par le type sauvage observée dans nos expériences pourrait garantir une vitesse maximale, en adaptant la forme du corps au milieu mécanique tout en maintenant fixées la période et la courbure maximale.

Le contrôle de V_w nécessite le fonctionnement intact des neurones du toucher léger. Cependant la nature de la mesure effectuée par ces neurones reste hypothétique. Remarquons que l'enregistrement des courants provoqués par une stimulation mécanique de ces neurones a montré un phénomène d'adaptation neuronale [104] : les courants mécanorécepteurs sont observés lors de l'application d'une force ou de son relâchement, mais ils disparaissent au bout de quelques dizaines de millisecondes lorsque la pression est maintenue. Il est donc peu probable que le ver puisse ressentir une stimulation prolongée telle que la pression constante exercée verticalement par la plaque de verre et le gel.

En revanche les neurones ne se désensibilisent pas lorsque les stimuli sont répétés, même sur de longues périodes. Il est donc vraisemblable que les forces détectées par le ver soient les forces périodiques générées par la locomotion. Comme il a été noté, les neurones du toucher léger se trouvent sous la cuticule, sans accès direct à l'extérieur. Les forces en question sont donc soit dues à la déformation de la cuticule, soit des forces extérieures, mais ressenties à travers la paroi du corps, dont les propriétés de transmission mécanique varient avec ses déformations et le degré de contraction des muscles [112].

3.3 *trp-4* : le rôle potentiel du contrôle de la courbure

La conservation de la courbure maximale en un point donné du corps (à l'exception de la tête et du cou) pour les différents confinements imposés constitue une caractéristique marquante de la transition entre la nage et la reptation. L'importance de la protéine TRP-4 dans le contrôle de la courbure a été montré par Li *et al.* [63], en particulier par l'analyse de la locomotion du mutant *trp-4(sy695)*. Nous avons donc soumis ce mutant à divers degrés de confinement afin de caractériser le rôle du contrôle de la courbure lors de la modulation de la locomotion.



FIGURE 3.6 – **Neurones où est exprimé** *trp-4*, **d'après** [102]. Il s'agit des neurones des sensilles céphaliques CEP (nous n'avons représenté que CEPDL et CEPVL), des neurones ADE et PDE (seuls ceux du côté gauche sont représentés). Ces neurones sont responsables de la sensibilité à la texture. Le neurone DVA, dont le corps cellulaire est situé dans la queue mais dont l'axone parcourt l'ensemble du corps, est nécessaire pour le contrôle de la courbure [63].

3.3.1 TRP-4 est nécessaire pour la sensibilité à la texture et au contrôle de la courbure

Les protéines qui forment les canaux ioniques mécanosensibles présents dans les neurones ciliés appartiennent presque toutes à la superfamille TRP⁴ [103]. *trp-4* est exprimé dans les neurones ciliés CEP et ADE et dans les interneurones DVA et DVC [63] (Fig. 3.6). Kang *et al.* ont montré que TRP-4 faisait partie d'un complexe formant le pore d'un canal calcique mécanosensible [114].

Li *et al.* ont observé deux phénotypes concernant la locomotion, apparemment distincts, chez les mutants *trp-4(sy695)* et *trp-4(sy695)*. Premièrement, les mutants ne présentent pas le ralentissement habituellement observé lors du déplacement sur un tapis de bactéries. Ce comportement est lié la libération de dopamine, qui est un inhibiteur de la locomotion, par les neurones CEP, où est exprimé *trp-4*, et disparaît en l'absence de bactéries.

Deuxièmement, la courbure maximale du corps lors de la locomotion est plus importante pour les mutants *trp-4*; cette observation ne dépend pas de la présence de bactéries et reste vraie pour des mutants déficients en dopamine. Li *et al.* montrent que la régulation de la courbure se fait par l'intermédiaire de l'interneurone DVA. Le corps cellulaire de ce dernier se trouve dans la queue et son axone s'étend sur toute la longueur du corps (Fig. 3.6). La visualisation par imagerie calcique de l'activité du neurone montre que celui-ci est excité lorsque la courbure du ver excède un certain seuil situé autour de $\kappa = 4$ mm⁻¹. Cette détection de la courbure requiert *trp-4*, qui est exprimé tout le long de l'axone de DVA.

Le modèle proposé est le suivant : tant que la courbure ne dépasse pas le seuil, l'activité de DVA stimule les motoneurones et entraîne ainsi la contraction musculaire. En revanche, lorsque la valeur seuil est atteinte, la dépolarisation de DVA entraîne l'inhibition des interneurones de commande avec qui il forme des synapses inhibitrices. Il en résulte une plus

^{4.} Pour *Transient Receptor Potential*. Ce type de canaux a été observé pour la première fois chez la mouche *Drosophila melanogaster*. L'exposition à la lumière des neurones photorecepteurs entraîne une réponse transitoire du potentiel, même lorsque le stimulus est prolongé [113], d'où le nom de *Transient Receptor Potential*.

faible excitation générale des motoneurones et par conséquent une moindre intensité de la courbure. L'originalité de ce modèle est de proposer une régulation à la fois positive et négative de la courbure par l'intermédiaire d'un seul neurone.

3.3.2 Confinement de trp-4(sy695) : résultats et discussion

Les résultats des expériences de plaquage sur les mutants trp-4(sy695) sont présentés Figure 3.7. De même que pour les mutants mec-4, il est toujours possible d'observer la transition continue depuis la nage vers la reptation, même si la mutation perturbe l'évolution des paramètres de la locomotion. Comme attendu, la courbure maximale est supérieure à celle des vers sauvages pour les valeurs positives de ε , quelque soit l'endroit du corps considéré. La manière dont nos mesures sont effectuées diffère de l'article de Li *et al.*[63], et les conditions d'observation ne sont pas les mêmes, mais le rapport entre la courbure des mutants et celle de la souche sauvage est comparable, autour de 1,3. Il n'est pas possible de distinguer les mutants de la souche sauvage lors de la nage.

La mutation du gène *trp-4* a aussi des conséquences sur la cinétique du mouvement, en particulier pour les hautes valeurs du confinement ($\varepsilon > 0, 5$). Par rapport à la souche sauvage, la période est plus basse de 10 à 30%, et la vitesse de propagation des ondes est plus haute de 20 à 50% – cela n'est pas lisible sur la figure, mais la différence est confirmée par le test statistique de Kolmogorov-Smirnov.

D'après le modèle proposé par Li *et al.*, la suppression de l'activité de TRP-4 a pour conséquence la suppression de l'inhibition des interneurones de commande par DVA. Les modèles numériques expliquant l'origine des oscillations et leur propagation le long du corps soulignent l'augmentation de la fréquence avec l'activité des interneurones AVB et/ou PVC [72, 73], en cohérence avec les résultats présentés ici. La dépolarisation de AVB entraîne aussi une diminution du délai séparant la contraction de deux segments consécutifs (c'est à dire une augmentation de V_w) dans un des deux modèles[73]. Cependant ces modèles n'envisagent pas le changement d'environnement mécanique, et n'expliquent pas pourquoi les différences ne seraient visibles que pour les forts confinements.

Une autre explication supposerait un rôle des neurones ciliés où est exprimé *trp-4* (CEP et ADE) lors des forts confinements. Le ver ressent la texture du milieu où il se déplace par l'intermédiaire de ces neurones : ainsi la présence de bactéries ou de billes de taille semblable à celle des bactéries induit un ralentissement lorsqu'on dépose un individu sur une nouvelle boîte après l'avoir rincé [62]. La présence de TRP-4 est nécessaire pour observer ce comportement, appelé *ralentissement basal* [63]. Kang *et al.* ont confirmé que TRP-4 était nécessaire à l'activation des neurones CEP par une stimulation mécanique [114]. Il est possible que les forces engendrées par la locomotion dans des environnements très confinés entraînent la dépolarisation de ces neurones mécanosensoriels, avec des conséquences semblables à celles du ralentissement basal : baisse de la fréquence et de la vitesse des ondes, ce qui expliquerait pourquoi les mutants *trp-4* progressent plus vite aux forts confinements,



FIGURE 3.7 – Évolution des paramètres de la locomotion des mutants *trp-4(sy695)* en fonction du confinement. Les résultats pour la souche sauvage sont rappelés en noir pour comparaison. Les courbes sont obtenues en moyennant la réponse de 12 vers à différents confinements. Les barres d'erreur représentent l'écart-type des mesures pour un confinement donné. Sont présentées : A la période ; B la vitesse de propagation des ondes le long du corps ; C la courbure maximale du corps en différents points : tête (s = 0, 1, haut), milieu (s = 0, 5, milieu) et queue (s = 0, 9, bas). Statistiques : test de Kolmogorov-Smirnov sur les données correspondant aux quatres valeurs du confinement modéré) et $\varepsilon = 0, 8$ (fort confinement). Les astérisques indiquent les confinements pour lesquels p < 0,05 après correction de Bonferroni.

et l'absence de différence entre souches sauvage et mutante pour la nage.

3.4 Le choix du couple (T, V_w) dépend des neurones ciliés

Les neurones non ciliés du toucher léger et soutenu ne sont pas la seule voie pour les entrées mécanosensorielles chez *C. elegans*. Un certain nombre de neurones ciliés sont mécanosensibles, intervenant lors du toucher du nez (ASH, IL1, FLP), de la sensibilité à la texture (CEP, ADE, PDE) ou des deux (OLQ) [115]. Pierce-Shimomura *et al.* [97] ont étudié l'effet de la mutation *che-3(e1124)* sur la locomotion. CHE-3 est nécessaire à la croissance et à la maintenance des neurones ciliés, qui ne sont pas fonctionnels chez les mutants. Le toucher léger est cependant intact chez ces mutants [116].

Les animaux mutants se déplacent normalement sur le gel, avec une fréquence toutefois plus basse que la souche sauvage [97]. En milieu liquide, en revanche, ils alternent entre des périodes de nage et d'autres formes de locomotion, dont les caractéristiques (fréquence, forme du corps) sont similaires à celles de la reptation. La transition d'un mode de locomotion à l'autre se fait de manière soudaine, sans modification progressive des paramètres. La distribution des fréquences d'oscillation présente deux pics, l'un proche de la fréquence de la nage des individus sauvages, l'autre, plus faible et plus étalé, proche de la fréquence typique de la reptation (chapitre 2, section 2.1).

Nous avons observé le mouvement des mêmes mutants *che-3(e1124)* dans le dispositif de plaquage (Fig. 3.8). Pour tous les confinements, la locomotion est très affectée. Les animaux s'arrêtent souvent tout à fait, et se déplacent plus fréquemment vers l'arrière, même en milieu liquide. Nous avons effectivement observé des transitions brusques d'un mode de locomotion à l'autre. Les mesures présentées ici ont été effectuées sur cinq vers différents, uniquement sur les périodes de marche avant, lorsque la régularité des paramètres de la locomotion dans le temps était suffisante. Nous présentons l'intégralité des données, et non des moyennes qui n'auraient pas de sens pour une telle variabilité.

Les modes de locomotion observés sont en effet très variés et ne semblent pas dépendre de la situation mécanique. En particulier lors de la nage, nous observons des périodes et des vitesses de propagation des ondes caractéristiques de la reptation, et pour des confinements moyens des couples (T,V_w) rappelant ceux des forts confinements de la souche sauvage. Nous ne distinguons cependant pas la distribution bimodale des modes de locomotion observée par Pierce-Shimomura *et al.*, sur laquelle s'appuyait l'opposition proposée entre nage et reptation (voir partie précédente). Il semble au contraire que tout le spectre des modes de locomotion soit exploré par le mutant, même si la situation mécanique ne dicte pas la valeur du couple (T,V_w) comme pour la souche sauvage ou les deux mutants précédents.

L'exemple de *che-3(e1124)* montre l'importance des neurones ciliés dans le choix du mode de locomotion. La mutation n'est cependant pas suffisamment spécifique pour déterminer les neurones exacts impliqués dans la régulation de la locomotion. Notons en outre que bien qu'un confinement donné puisse donner lieu à plusieurs valeurs possibles de la



FIGURE 3.8 – Évolution des paramètres de la locomotion des mutants *che-3(e1124)* en fonction du confinement. L'ensemble des mesures, collectées sur cinq vers, sont présentées (et non les moyennes). A Période et **B** vitesse de propagation des ondes le long du corps.

période et de la vitesse de propagation, la plage des modes de locomotion adoptés semble contrainte par l'environnement mécanique : l'ensemble des périodes et des vitesses de propagation mesurées se trouvent respectivement au-dessus et au-dessous de la courbe de la souche sauvage (Fig. 3.8).

3.5 Conclusion

Le dispositif de plaquage présenté au chapitre 2 apparaît comme un outil utile pour une approche quantitative de l'observation de la locomotion chez les mutants. Des défauts subtils de la locomotion, difficilement observables lors de la seule reptation sur gel, sont ainsi mis à jour grâce à la large gamme de situations mécaniques explorées correspondant aux différents confinements : certaines différences sont observables uniquement lors de la nage, d'autres seulement pour de forts confinements.

Ici, nous avons voulu caractériser l'importance des entrées mécanosensorielles dans la modulation de la locomotion mise en évidence dans la partie précédente. Nous avons montré que la suppression du toucher léger chez les mutants mec-4(e1611) perturbe la propagation des ondes de courbure ; les expériences avec trp-4(sy695) ont illustré le rôle potentiel du contrôle de la courbure ; nous avons enfin observé que les mutants che-3(e1124), dont les neurones ciliés ne sont pas fonctionnels, n'adaptaient ni la période des oscillations, ni la vitesse de propagation de manière déterministe aux conditions mécaniques.

L'existence de mutants (mec-4(e1611) et, dans la partie précédente, unc-79(e1068)) dont la période des oscillations à la tête est semblable à celle de la souche sauvage, mais dont la vitesse de propagation en diffère, montre que l'initiation des oscillations ne dépend pas, ou faiblement, du retour sensoriel provenant du reste du corps. En revanche, le cas des mutants *che-3(e1124)* montre qu'une période défectueuse altère aussi la vitesse de propagation. La relation entre période et vitesse de propagation sera explorée plus en détail dans la partie suivante.

CHAPITRE 4

Sélection sous contrainte du mode de locomotion

Sommaire

4.1	Une r	elation entre période et vitesse des ondes 96
	4.1.1	Contrôle de la courbure maximale
	4.1.2	Existence d'une « relation de dispersion » pour la propagation
		des ondes
	4.1.3	Comportement des mutants
	4.1.4	Discussion
4.2	Sélec	tion du mode de locomotion
	4.2.1	Angle d'attaque
	4.2.2	Puissance musculaire
4.3	Conc	usion

Lorsqu'il rencontre un nouvel environnement mécanique, *C. elegans* adapte une allure unique en modulant la période du mouvement et la vitesse de propagation des ondes, alors que la courbure maximale reste constante. Nous avons montré l'importance des entrées mécanosensorielles, qui détectent les conditions mécaniques internes et externes, pour cette modulation. Le traitement de cette information détermine le choix des paramètres de la locomotion.

Le but de cette partie est d'identifier les contraintes qui restreignent l'espace des modes de locomotion accessibles au nématode. Après avoir rappelé l'importance du contrôle de la courbure, nous exposons une relation entre période et vitesse de propagation à laquelle *C. elegans* ne semble pas pouvoir désobéir. Nous proposons ensuite un modèle pour expliquer la sélection du mode de locomotion en fonction de l'environnement mécanique, en prenant appui sur le calcul du maximum de la puissance musculaire développée lors de la locomotion proposé par Fang-Yen *et al.*[47].

4.1 Une relation entre période et vitesse des ondes

4.1.1 Contrôle de la courbure maximale

À l'exception de la tête, la courbure maximale reste constante quand l'environnement mécanique change (chapitre 2). Li *et al.* [63] ont donné un exemple de contrôle de la courbure que nous avons exposé et dont nous avons examiné l'importance lors du confinement dans le chapitre précédent. Ces expériences ont montré que les courbures maximales que nous mesurons pour le type sauvage ne correspondent pas à une limite qui serait imposée par l'élasticité du corps ou par le milieu extérieur, puisque que les mutants *trp-4* sont capables d'atteindre des courbures supérieures. Ceci est confirmé par les quelques événements de déplacement vers l'arrière que nous avons pu enregistrer lors des expériences de confinement d'animaux de type sauvage (Fig. 4.1). Les valeurs de la courbure maximale au milieu du corps sont alors sensiblement supérieures à celles observées pour les mêmes animaux se déplaçant vers l'avant. Il semble bien que la valeur de la courbure maximale soit contrôlée durant la locomotion.

4.1.2 Existence d'une « relation de dispersion » pour la propagation des ondes

Si nous considérons la courbure maximale en un point donné du corps comme constante dans la plage des confinements explorés, alors la locomotion de *C. elegans* pour un confinement donné est entièrement caractérisée par la donnée du couple (T, V_w) de la période des oscillations et de la vitesse de propagation de la courbure le long du corps.

Afin de visualiser l'ensemble des modes de locomotion accessibles par le ver dans les différents confinements, nous avons tracé l'ensemble des points expérimentaux dans le plan (T, V_w) (Fig. 4.2). Toutes les mesures s'alignent sur une seule courbe, qui peut être ajustée par une loi de puissance du type

$$V_w \sim T^{-1,4}$$
. (4.1)



FIGURE 4.1 – Exemples de déplacements vers l'arrière pour différents confinements (courbure maximale au milieu du corps). Chaque point (en bordeaux) correspond à un événement de déplacement vers l'arrière sur plusieurs périodes. Le faible nombre d'observations traduit la rareté des ces événements. Les moyennes des données pour le déplacement vers l'avant sont indiquées en noir.



FIGURE 4.2 – Relation entre la vitesse de propagation des ondes de courbure, V_w , et la période des oscillations, T. L'ensemble des mesures expérimentales pour le type sauvage et pour l'ensemble des confinements est représenté. Les données peuvent être ajustées par une loi de puissance du type $V_w \sim T^{-1,4}$. Les deux cercles cyan et vert indiquent respectivement le couple (T, V_w) pour la nage en liquide et la reptation sur gel d'agar (en l'absence de bactéries).

Nous avons voulu déterminer si cette relation restait vraie dans une autre situation expérimentale, en quantifiant le mouvement des vers lorsqu'ils se déplacent dans une goutte de M9 à la surface d'un gel d'agar (Fig. 4.3). À mesure que le liquide est absorbé par le gel et s'étale, l'épaisseur du film d'eau couvrant le ver se réduit, et la résultante de forces capillaires augmente. Comme dans les expériences de plaquage, le ver passe de manière progressive de la nage à la reptation sur gel. En revanche, il n'est pas possible de quantifier le confinement imposé par la tension superficielle, comme c'était le cas pour le plaquage. Bien que la nature des forces extérieures et leur distribution le long du corps soient différentes, les valeurs de la vitesse de propagation et de la période se placent sur la même courbe que les valeurs obtenues pour le confinement (Fig. 4.3C).

De manière plus surprenante, la même relation entre T et V_w est observée lors du déplacement vers l'arrière. Les quelques événements de déplacement arrière suffisamment longs pour en extraire les paramètres de la locomotion sont présentés Figure 4.4. Ils indiquent que la cinétique caractérisant la marche arrière est différente du déplacement avant. La période, plus importante lors de la nage, reste faible même pour des confinements importants (Fig. 4.4A). La vitesse de propagation de l'onde est plus basse pour la nage, mais est supérieure à celle du déplacement avant pour la reptation (Fig. 4.4B). Le déplacement vers l'arrière peut correspondre à une stratégie de réorientation mais aussi d'évitement ou de fuite, ce qui peut expliquer ces différences qui garantissent une vitesse de progression élevée, même aux forts confinements (Fig. 4.4C).

Malgré des évolutions dissemblables des paramètres du mouvement, les points expérimentaux de V_w en fonction de T se superposent à ceux obtenus pour le déplacement vers l'avant, même si la gamme explorée est moins étendue (Fig. 4.4**D**).

4.1.3 Comportement des mutants

La relation entre T et V_w est globalement respectée lors de la locomotion des mutants que nous avons observés dans les chapitres précédents : unc-79(e1068), mec-4(e1611), trp-4(sy696) et che-3(e1124) (Fig. 4.5). Le comportement du mutant trp-4(sy696) reste très proche du type sauvage. L'écart le plus important est observé pour mec-4(e1611) et unc-79(e1068), qui présentaient des défauts dans la propagation de l'onde le long du corps. Notons encore une fois que dans le second cas, les mesures effectuées ne reflètent que partiellement la locomotion très altérée du mutant. Enfin, le cas particulier de che-3(e1124)mériterait certainement d'être approfondi. Nous avons vu que ces animaux, dont le fonctionnement des neurones ciliés est défectueux, n'adoptent ni leur période, ni leur vitesse de propagation de manière déterministe en réponse aux conditions mécaniques. En revanche, la relation entre les deux grandeurs reste contrainte de la même manière que pour le type sauvage.

4.1.4 Discussion

Il est tentant d'interpréter la relation entre période et vitesse de propagation que nous avons présentée ici comme une relation de dispersion. En physique, une relation de dispersion caractérise le transport d'une perturbation dans un milieu donné en reliant la vitesse de propagation à la fréquence à laquelle le milieu est excité (ou, de manière équivalente, la vitesse de l'onde à la longueur d'onde) : ici la courbure représente la perturbation ; quant au milieu, il s'agit du corps du nématode. Une relation de dispersion dépend de la nature du milieu à travers lequel se propage l'onde. Le corps de C. elegans est un milieu très particulier : non seulement il est actif (l'excitation continue des motoneurones par les interneurones favorise la contraction musculaire), mais il est aussi sujet à des couplages non-locaux : à cause de l'élasticité de la cuticule et de l'existence potentielle de récepteurs à l'étirement, la courbure du corps en un point donné dépend de la courbure de l'ensemble des points voisins, sur une plage pouvant être relativement étendue (au plus la longueur du ver). En revanche, si l'on s'en tient aux quelques données disponibles pour le déplacement vers l'arrière, cette relation de dispersion ne dépend pas du sens de propagation de l'onde : en d'autres termes, les mécanismes de propagation des ondes vers l'avant ou vers l'arrière de l'animal sont similaires.

Les modèles numériques de la locomotion de *C. elegans* prédisent-ils une telle relation entre période de l'onde et vitesse de propagation ? Le modèle proposé par Karbowski *et al.* [72] n'envisage pas de dépendance de la vitesse de propagation par rapport à la fréquence des oscillations initiées à la tête. Dans l'approche de Bryden *et al.* [73], au contraire, le couplage des motoneurones par des récepteurs à la courbure distants du corps cellulaire et des jonctions neuromusculaires, qui assure la propagation de l'onde de contraction le long du corps, entraîne l'interdépendance de V_w et T: le décalage temporel entre la contraction de deux segments adjacents diminue avec la fréquence des oscillations. La relation de dispersion s'expliquerait alors par le recours à la proprioception pour propager les ondes. Il est cependant difficile d'envisager une confirmation expérimentale de ces hypothèses, ne serait-ce que parce que les récepteurs à la courbure des motoneurones n'ont pas été identifiés avec certitude.

Quant au rôle du couplage mécanique, il est difficile à déterminer en l'absence de connaissances sur les motifs d'excitation musculaires. Les expériences d'imagerie des muscles lors de la locomotion menées actuellement par Thomas Chartier au laboratoire pourraient fournir plus de renseignements sur ces derniers.

Le suivi de la courbure maximale en un point du corps en fonction du confinement montre que, si la courbure maximale de la tête est d'autant plus importante que le confinement est fort, la courbure maximale est approximativement constante pour la majeure
partie du corps, pour l'ensemble des confinements : au mode de locomotion adopté par *C*. elegans dans une situation donnée correspond alors un point du plan (T, V_w) . Représenté dans ce plan, l'ensemble des données expérimentales peut alors s'ajuster par une loi de puissance du type $V_w \sim T^{-1,4}$. Cette forte contrainte sur les modes de locomotion accessibles est aussi respectée pour la locomotion dans des films d'eau d'épaisseur variable, et, de manière plus surprenante, les déplacements vers l'arrière.

Les données collectées sur les mutants montrent que ceux-ci ne dévient que légèrement de la courbe maîtresse. Les écarts les plus importants sont observés pour les mutants qui présentent des défauts de la propagation de l'onde. Le cas le plus frappant est certainement celui de *che-3(e1124)*, pour qui, malgré l'apparente absence de corrélation entre l'environnement mécanique et la période du mouvement, la vitesse de propagation reste fortement déterminée par cette dernière.

4.2 Sélection du mode de locomotion

L'adoption d'un mode de locomotion en réponse à une situation mécanique donnée – du moins dans le dispositif de plaquage – est donc équivalent au choix d'un seul paramètre, période ou vitesse de propagation, les deux étant liés et la courbure restant approximativement constante. Nous allons ici discuter des raisons pouvant dicter la sélection du mode de locomotion.

4.2.1 Angle d'attaque

Fang-Yen *et al.* proposent que le ver essaye de maintenir son angle d'attaque θ_{max} , c'est à dire l'angle maximal formé par son corps et la direction de progression (Fig. 4.6A), quelque soit le milieu. En effet, nous avons vu dans l'introduction que l'essentiel de la poussée vers l'avant est produite au niveau des segments dont l'angle θ formé avec la direction de progression est maximum. Pour de faibles valeurs de θ_{max} ($A \ll \lambda$), sa valeur s'obtient à partir de la courbure maximale,

$$\theta_{max} = \frac{\lambda}{2\pi} \kappa_{max} \simeq \frac{V_w T}{2\pi} \kappa_{max}.$$
(4.2)

Nous n'observons cependant pas une valeur constante de θ_{max} lors des expériences de plaquage (Fig. 4.6**B**). La décroissance avec le confinement est moins forte au niveau de la tête, mais si le nématode adaptait sa locomotion aux conditions mécaniques, on s'attendrait surtout à voir maintenu l'angle d'attaque au milieu du corps où, à cause de la variation du diamètre du ver, le rapport des coefficients de friction est maximal et la poussée est la plus importante. Le maintien d'un angle d'attaque constant ne semble donc pas pouvoir expliquer la sélection du mode de locomotion de *C. elegans*.

4.2.2 Puissance musculaire

Un changement d'allure, par exemple le passage d'un humain de la marche à la course, peut s'expliquer par l'optimisation du coût énergétique rapporté à la distance parcourue [1]. Même en dehors du cas du changement d'allure, des raisons d'optimisation énergétique pourraient dicter la relation observée expérimentalement entre la fréquence f des pas et la vitesse V de la marche humaine chez des adultes [117], du type $V \sim f^{1,7}$, similaire à la relation existant entre V_w et T dans le cas de C. *elegans*. Le choix du mode de locomotion de C. *elegans* pourrait de même constituer une réponse à des critères énergétiques : nous explorons ci-dessous les conséquences de l'hypothèse selon laquelle le ver cherche à maintenir constante la puissance musculaire développée lors de la locomotion.

Lors de la nage en milieu liquide, la puissance dissipée par les frottements fluides fournit une borne inférieure de la puissance musculaire développée par le nématode lors de la locomotion. La puissance δP nécessaire au déplacement d'un segment de longueur élémentaire dont les coefficients de friction longitudinal et normal par unité de longueur sont C_l et C_n s'écrit [80]

$$\delta P = V_n F_n + V_l F_l \tag{4.3}$$

$$= C_n V_n^2 + C_l V_l^2, (4.4)$$

où nous avons repris le formalisme de l'introduction. La puissance intégrée sur la longueur du nématode, moyennée sur une période du mouvement,

$$P = \frac{1}{T} \int_{0}^{T} ds \int_{0}^{L} dt \left(C_n V_n^2 + C_l V_l^2 \right), \qquad (4.5)$$

peut être calculée à partir des mesures de déplacement du ver. Alexander [80] propose une formule simplifiée de la puissance par unité de longueur lorsque la forme du ver est décrite par un sinus d'amplitude A et de période spatiale λ^{1} ,

$$\frac{P}{L} = V^2 C_n + \frac{6(\pi A)^4}{\lambda^4} V_w^2 C_n + \frac{2(\pi A)^2}{\lambda^2} \left[(V^2 + V_w^2) C_n + 2V V_w (C_n - C_l) \right].$$
(4.6)

Des études antérieures ont ainsi estimé la puissance dissipée par frottement visqueux en moyenne sur un cycle d'ondulation, en utilisant les valeurs des coefficients de friction en fonction de la viscosité (pour un cylindre) données dans l'introduction [89] ou en déterminant *a posteriori*, numériquement, leur valeur après analyse du mouvement du ver [83]. Dans les deux cas, la puissance dissipée augmente de plusieurs ordes de grandeur avec la charge mécanique, passant de 10^{-1} à 10^2 nW environ. D'après ces estimations, la puissance moyenne consacrée à déplacer le fluide lorsque celui-ci a une viscosité égale à celle de l'eau représente donc une faible fraction de la puissance moyenne utilisée à de plus fortes viscosités (jusqu'à 50 Pa s), ou, dans le cadre de nos expériences, à déformer le gel : le ver ne maintient pas la puissance moyenne constante alors qu'il change de milieu.

En réalité, la contraction des muscles ne sert pas seulement à vaincre la résistance du milieu extérieur, mais aussi à déformer le corps, qu'il est possible d'assimiler à un filament

^{1.} En supposant que la forme du ver est décrite par un nombre entier ou infini de longueurs d'onde.

visco-élastique [52]. Fang-Yen *et al.* [47] ont proposé un modèle biomécanique prenant en compte l'élasticité de la cuticule². La puissance instantanée par unité de longueur fournie par le ver en un point *s* du corps vaut

$$P(s,t) = \omega \kappa_{max}^2 \left[b \sin(qs - \omega t) \cos(qs - \omega t) + \omega C_n q^4 \cos^2(qs - \omega t) \right], \qquad (4.7)$$

où *b* désigne le module élastique du ver, comme nous l'avons défini dans l'introduction, section 1.4. Pour des raisons de clarté, nous avons adopté pour décrire l'onde le formalisme utilisant la pulsation de l'onde $\omega = 2\pi/T$ et le nombre d'onde $q = 2\pi/\lambda$. Le premier terme correspond à la puissance utilisée pour déformer la cuticule; le second à la puissance utilisée pour vaincre la résistance du milieu. La puissance développée par un muscle pour courber localement le corps n'est donc pas prise en compte lorsque l'on effectue la moyenne temporelle, qui fait disparaître le terme dû à l'élasticité de la cuticule. Les auteurs proposent de considérer plutôt la puissance musculaire (par unité de longueur) maximale développée en un point du corps, qui s'écrit

$$P_{max} = \kappa_{max}^2 C_n \frac{\omega^2}{2q^4} \left(1 + \frac{1}{\sin(\varphi)} \right)$$
(4.8)

avec

$$\varphi = \arctan\left(\frac{C_n \omega}{bq^4}\right). \tag{4.9}$$

Puisque dans les expériences de Fang-Yen *et al.* la valeur du coefficient de friction normal C_n et du module de flexion élastique *b* sont connues, il est possible de remonter aux valeurs de P_{max} dans les différentes environnements explorés. Au contraire de la puissance moyenne, les auteurs de cette étude remarquent que la puissance maximale varie étonamment peu en fonction de la viscosité du liquide.

Dans l'hypothèse où la relation de dispersion $V_w(T)$ régissant la propagation des ondes le long du corps en fonction de la période de l'excitation musculaire représente une contrainte pour le nématode, le choix d'un mode de locomotion, autrement dit d'un couple (T, V_w) (la courbure maximale restant constante), revient à sélectionner un point sur la courbe du plan (T, V_w) donnée par la relation de dispersion. Or, le choix de maintenir le maximum de la puissance instantanée P_{max} constant quelque soit la valeur du coefficient de friction normale C_n fixe une seconde relation entre ω et q, c'est-à-dire, de manière équivalente, entre $T = 2\pi/\omega$ et $V_w = \omega/q$.

Nous avons tracé (Fig. 4.7) sur le même graphique la relation de dispersion reliant les point expérimentaux et les courbes de niveau correspondant aux C_n constants données par l'équation (4.8), où nous avons fixé P_{max} à 8 10⁻⁶ W m⁻¹, ce qui assure un couple (T, V_w)

^{2.} Leur mesure de l'élasticité de la cuticule et de sa viscosité conduisent à négliger la seconde devant la première.

coïncidant avec les paramètres de la nage lorsque $C_n = 10$ mPa s³.

L'intersection des courbes données par chaque valeur de C_n en supposant P_{max} constante avec la courbe de la relation de dispersion fournit les points de fonctionnement pour la locomotion de *C. elegans*, et par conséquent l'évolution de la période et de la vitesse de propagation des ondes en fonction de C_n , seul paramètre décrivant la mécanique du milieu où se déplace le ver (Fig. 4.8A et **B**).

Nous n'avons pas accès aux valeurs du coefficient de friction normale correspondant aux différents confinements explorés dans notre dispositif expérimental, il nous est donc difficile de confronter ce modèle à nos données. Il est cependant possible de comparer l'évolution théorique des paramètres de la locomotion avec l'évolution réelle mesurée par Fang-Yen *et al.*, bien que les conditions expérimentales, et vraisemblablement l'âge des animaux, diffèrent (Fig. 4.8C et **D**) : la tendance principale et les ordres de grandeur sont correctement reproduits par le modèle.

4.3 Conclusion

Si nous faisons l'hypothèse que la forme du ver peut être approchée par un sinus dont la courbure maximale reste constante quelque soit l'environnement mécanique, l'ensemble de modes de locomotion se réduit à un espace à une dimension, décrit par une relation de dispersion liant période et vitesse de propagation, que nous avons mis en évidence.

Cette relation ne semble pas dépendre des entrées sensorielles, comme le montre l'exemple de *che-3*, mais elle peut être affectée pour des mutants présentant des défauts de la propagation des ondes. Elle traduit vraisemblablement des contraintes sur la locomotion dues à la manière dont est assurée la propagation des ondes le long du corps ; elle est en particulier cohérente avec l'hypothèse que la propagation repose sur des récepteurs à l'étirement des motoneurones. La mécanique du squelette hydrostatique pourrait aussi y participer.

Nous avons montré que la combinaison de cette relation de dispersion avec l'hypothèse que le ver cherche à maintenir constante la puissance instantanée maximale développée en un point donné du corps peut expliquer la sélection du mode de locomotion en fonction de l'environnement mécanique. Cette valeur de la puissance maximale pourrait correspondre au maximum consenti par le ver pour le déplacement vers l'avant, ce qui expliquerait pourquoi, dans le cas de *che-3*, les valeurs de *T* et de V_w sont très variables, mais cependant bornées par les valeurs du type sauvage.

Les quelques observations de déplacement vers l'arrière montrent cependant que dans ce cas, si la relation entre période et vitesse de l'onde reste inchangée, la puissance maximale est plus importante : pour les confinements importants, la fréquence et la vitesse de

$$C_n = \frac{4\pi\eta}{\ln(2L/D) + 0.5} \simeq 7\eta$$

^{3.} Nous avons choisi cette valeur parce qu'elle correspond environ à la viscosité de l'eau, $\eta = 10^{-3}$ Pa s. En effet (éq. 1.18),

l'onde sont toutes deux plus importantes que lors de la marche avant. Dans notre hypothèse, la valeur de P_{max} peut être dépassée lors de la marche arrière. La sélection du mode de locomotion dans un environnement donné resulte donc d'un équilibre entre, d'une part, la relation entre période et vitesse de l'onde imposée par le mécanisme de propagation, et, d'autre part, la puissance maximale consentie pour se déplacer, qui semble différer selon que le déplacement a lieu vers l'avant ou vers l'arrière.



FIGURE 4.3 – Locomotion dans une goutte absorbée par la surface d'un gel d'agar. A et B Le ver est placé dans une goutte de M9 posée à la surface d'un gel d'agar. La goutte est progressivement absorbée par le gel, et la résultante \vec{F}_L des forces capillaires dues à la tension de surface γ est modifiée. On peut noter l'apparition du ménisque entourant le ver lorsque la goutte est totalement absorbée (photographie du bas), qui apparaît en foncé et fait paraître le ver plus large qu'il ne l'est réellement. C Malgré les différences expérimentales, les couples (T, V_w) se placent sur la même courbe que les données du plaquage.



FIGURE 4.4 – **Déplacement vers l'arrière.** Les (rares) événements de déplacement vers l'arrière sont indiqués en bordeaux. Chaque point correspond à un événement. Période (**A**), vitesse de propagation de l'onde (**B**) et vitesse de progression (**C**) sont tracées en fonction du confinement. Les moyennes pour le déplacement vers l'avant sont indiquées en noir pour comparaison. **D** Le déplacement vers l'arrière satisfait la même relation entre T et V_w que le déplacement avant.



FIGURE 4.5 – Relation entre période et vitesse de propagation (mutants). L'ensemble des mesures expérimentales sont représentées, pour le type sauvage, *unc-79(e1068)*, *mec-4(e1611)*, *trp-4(sy696)* et *che-3(e1124)*, sur le même graphique (A, les exposants de la loi puissance correspondante $V_w \sim T^{\alpha}$ sont indiqués dans la couleur correspondante au mutant) et séparément (B).



FIGURE 4.6 – Évolution de l'angle d'attaque en fonction du confinement. A Définition de l'angle d'attaque, θ_{max} , comme l'angle maximal entre la tangente à la ligne centrale et la direction de progression du ver (indiquée par la flèche noire). Les segments formant l'angle θ_{max} avec la direction de progression sont ceux qui contribuent le plus à la poussée totale (voir chapitre 1, section 1.5). B L'évolution de θ_{max} en fonction du confinement ε est présentée pour la tête, le milieu et la queue. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.



FIGURE 4.7 – **Sélection du mode de locomotion.** La ligne continue (appelée ici relation de dispersion) est un ajustement par une loi de puissance des données expérimentales pour le type sauvage (points gris). Les lignes pointillées sont les courbes correspondant à la puissance instantanée maximale constante, pour différentes valeurs du coefficient de friction normale C_n . L'intersection de ces courbes avec la relation de dispersion fournit le couple (T, V_w) pour un environnement mécanique donné.



FIGURE 4.8 – Évolution des paramètres selon le modèle. A et B, période (*T*) et vitesse de propagation (V_w) prédites par le modèle en fonction du coefficient de friction normale C_n , obtenues à partir de la relation de dispersion liant les points exmérimentaux, et en supposant $P_{max} = 8 \ 10^{-6} \ W \ m^{-1}$ (voir Fig. 4.7). C et D Fréquence (*f*) et longueur d'onde (λ) théoriques (lignes pointillées) et valeurs expérimentales obtenues par Fang-Yen *et al.* [47], en supposant que la relation de dispersion est vraie aussi pour les animaux utilisés lors de leurs expériences ; que la longueur des vers utilisés vaut 1 mm ; et que $P_{max} = 8 \ 10^{-6} \ W \ m^{-1}$.

CHAPITRE 5 Électrotaxie

Sommaire

5.1	Électrotaxie chez <i>C. elegans</i>
	5.1.1 Description et mécanismes du comportement électrotactique 110
	5.1.2 Utilisations de l'électrotaxie
5.2	Système expérimental
5.3	Allers-retours dans un champ alterné
	5.3.1 Procédure et résultats
	5.3.2 Discussion
5.4	Conclusion

Nous nous sommes jusqu'ici attachés à décrire et à caractériser les mécanismes de la locomotion de *C. elegans* dans divers environnements mécaniques. Nous abordons dans cette partie le problème des liens entre locomotion et navigation dans l'environnement. *C. elegans* se déplace pour trouver de la nourriture, en réponse à des signaux chimiques [118], thermiques [58], mécaniques [62], ou lumineux [59]. Ses stratégies de recherche ou d'évitement, éventuellement en présence d'indices sensoriels, font intervenir un jeu complexe de modulations de la locomotion : ajustement de la vitesse de progression ; alternance de phases de déplacement vers l'avant, de déplacement vers l'arrière, ou d'arrêts ; réorientations légères ou abruptes qui infléchissent ou brisent la trajectoire [119]. Des modèles neuronaux expliquant ces comportements sont en cours d'élaboration [120, 118].

La faculté de déplacement de *C. elegans* sur des distances et sur des échelles importantes dépend du fonctionnement du système locomoteur : la modification de l'excitation musculaire ou de l'état des muscles entraîne un changement des paramètres de la locomotion et de la vitesse de progression. Nous proposons ici d'étudier le comportement du ver et l'évolution de sa locomotion sur de longues distances en tirant avantage de l'électrotaxie de *C. elegans*. Dans un champ électrique, le ver descend en effet les potentiels [121], de manière remarquablement reproductible. Nous présentons ici un système expérimental pour le suivi de *C. elegans* dans un champ électrique, et quelques résultats préliminaires, qui montrent que l'électrotaxie peut être envisagée comme un outil pour explorer les liens entre locomotion et navigation. Le but de ces expériences est de déceler un effet éventuel de la fatigue musculaire ou de l'adaptation neuronale, dues à une longue période de locomotion forcée par la présence du champ électrique. Nous exposons aussi, au titre d'introduction au comportement électrotactique de *C. elegans*, les travaux effectués en collaboration avec Xavier Manière (équipe « Génétique Moléculaire Evolutive et Médicale » de l'IN-SERM, à l'Hôpital Necker) sur le tri de populations hétérogènes utilisant l'électrotaxie.

5.1 Électrotaxie chez C. elegans

5.1.1 Description et mécanismes du comportement électrotactique

De nombreux organismes détectent les champ électriques et modifient leur comportement en conséquence. C'est le cas de certaines bactéries [122], paramécies [123] et amibes, au nombre desquelles on compte l'organisme modèle *Dictyostelium discoideum* [124]. Pour désigner l'ensemble de ces comportements, on parle d'électrotaxie ou de galvanotaxie.

La navigation de *C. elegans*, ainsi que celles d'autres nématodes, est modifiée par la présence d'un champ électrique [121]. Dans des champs de l'ordre de quelques V cm⁻¹ établis à l'aide de deux électrodes à la surface d'un gel d'agar hydraté par une solution salée, le ver se dirige vers la cathode, exceptionnellement vers l'anode (Fig. 5.1A). La trajectoire du nématode se distingue de la locomotion en l'absence de champ par une forte directionnalité et par le très faible nombre de réorientations et de marches arrière (Fig.

5.1**B**). La trajectoire du ver n'est pas parallèle aux lignes de champ : elle forme avec cellesci un angle dont l'amplitude dépend linéairement de la valeur du champ [60] (Fig. 5.1**B**). Pour des valeurs suffisamment faibles du champ (3 V cm^{-1}), l'angle d'approche reste donc faible (Fig. 5.1**C**) [60]. La comparaison avec des vers se déplaçant en l'absence de champ montre un biais très important dans la distribution des angles des vitesses instantanées pour les individus en présence du champ. Par conséquent, la distribution de la composante parallèle au champ de la vitesse est significativement décalée vers les valeurs positives, correspondant à l'orientation du champ (Fig. 5.1**D**).

Les vers adultes ressentent le champ à partir de 3 V cm⁻¹ et s'immobilisent lorsque le champ dépasse 14 V cm⁻¹. Lorsque le champ est supprimé, les vers reprennent un mouvement normal, sans altération apparente [60]. De même, l'espérance de vie ou les facultés reproductives ne semblent pas modifiées par l'exposition au champ [126].

Des mutants ne possédant pas certains neurones sensoriels, ou des animaux sauvages dont ces neurones ont été supprimés par ablation laser, ne répondent pas au champ électrique [60]. L'électrotaxie repose donc sur la détection du champ par certains de ces neurones : ASJ et dans une moindre mesure ASH, AWB, AWC et ASK. Les dendrites ciliés de ces neurones sont exposés à l'extérieur du corps au niveau des amphides, qui sont deux ouvertures dans la cuticule situées de part et d'autre de la bouche de l'animal. L'activité des neurones ASJ, visualisée grâce à des sondes calciques, est maximale lorsque le nez pointe dans la direction de l'anode : l'animal viserait donc à minimiser l'activité de ASJ en s'alignant le long du champ dans la direction de la cathode [60].

Le ver est sensible à la différence de potentiel plutôt qu'à l'intensité du courant ionique, comme le montrent des expériences d'électrotaxie utilisant des concentrations ioniques variées [60]. Le mécanisme par lequel *C. elegans* détecte la présence et l'orientation d'un champ électrique reste cependant inconnu, ainsi que la raison pour laquelle la trajectoire forme un angle avec la direction du champ. Tout au plus Rezai *et al.* [126] ont ils pu mettre en évidence un effet de la taille sur la sensibilité au champ : des animaux de petite taille (mutants *dumpy*) et les larves du type sauvage sont sensibles à des champs plus faibles et sont paralysés plus rapidement que les adultes du type sauvage, alors que des mutants *long*, de taille supérieure au type sauvage, sont moins sensibles et ne s'immobilisent pas.

L'intérêt de l'électrotaxie pour *C. elegans* n'est pas évident. Certaines espèces de nématodes parasitaires utilisent les champs électriques existants dans les tissus de leur hôte pour localiser les organes [60] : peut-être ce comportement est-il hérité d'un ancêtre commun, mais aucune preuve n'existe d'une telle hypothèse.

5.1.2 Utilisations de l'électrotaxie

Dans quelques études récentes, le comportement électrotactique de *C. elegans* est envisagé comme une méthode pour trier les nématodes en fonction de leurs capacités locomotrices. La forte reproductibilité du comportement permet en effet de diriger les nématodes dans une direction souhaitée et de les séparer suivant leur vitesse, celle-ci étant très peu variable comparée à la locomotion en l'absence de champ, qui est marquée par de nom-



FIGURE 5.1 – Électrotaxie de *C. elegans* dans le dispositif de Manière *et al.* [125]. A Une différence de potentiel V_+ est appliquée aux extrémités d'un gel d'agar hydraté par une solution salée, assurant le transport des ions. Le champ électrique résultant, **E**, dirige le mouvement d'une population de nématodes vers la cathode (pôle négatif). Le gel se trouve dans une cuve d'électrophorèse (non montrée) et est baigné d'une solution salée dans laquelle sont plongées les électrodes. **B** Trajectoires d'une quinzaine de vers exposés à un champ électrique : les trajectoires forment un angle relativement déterminé avec la direction du champ. **C** et **D** distribution des angles et des composantes normale et parallèle au champ de la vitesse instantanée d'une population de *C. elegans* de type sauvage, en l'absence (bleu) et en présence (orange) d'un champ électrique. La valeur du champ a été choisie suffisamment faible, de manière à obtenir une distribution des angles piquée en 0.



FIGURE 5.2 – L'électrotaxie comme outil de séparation de populations (Manière *et al.* [125]). A La distribution des vitesses instantanées de quatre populations dans un champ électrique met en évidence une hiérarchie des défauts de la locomotion causés par des mutations (*acr-16* et *unc-29*) affectant des récepteurs à l'acétylcholine des muscles de la paroi du corps. Ces récepteurs fonctionnent séparément, le double mutant est donc plus sévèrement affecté que les simples mutants. B Séparation de deux populations aux capacités locomotrices différentes : N2 et *dbl-1*. Le gel est divisé en cinq bandes (délimitées par des lignes pointillées) : initialement les deux populations, mélangées, se trouvent dans la première bande (bande de gauche). Sous l'effet du champ, les vers se dirigent vers la droite. Les mutants *dbl-1* sont plus lents : à la fin de la course, presque tous les vers de type sauvage se trouvent dans la dernière bande, alors que les mutants se concentrent dans les bandes 3 et 4.

breuses phases d'arrêt et de réorientation [119]. La combinaison de l'électrotaxie en milieu liquide et de la microfluidique permet ainsi de séparer les animaux suivant leur stade de développement [126], ou de tester des molécules toxiques pour des espèces parasitaires comme *Oesophagostomum dentatum*, un parasite du sanglier et du porc [127].

Les expériences menées avec Xavier Manière à l'Hôpital Necker montrent l'intérêt de l'électrotaxie pour l'analyse et le tri de populations hétérogènes de *C. elegans*. Il est ainsi possible de quantifier les différences dans la vitesse de progression et d'établir une hiérarchie parmi des mutants déficients pour des récepteurs à l'acétylcholine ¹ des muscles de la paroi du corps (Fig. 5.2A) : *unc-29* (manque d'un récepteur sensible au lévamisol), *acr-16* (manque d'un récepteur sensible à la nicotine), et le double mutant *unc-29;acr-16*.

Autre exemple d'application, la séparation de deux populations caractérisées par des vitesses différentes est illustrée Figure 5.2**B**. Ce type de dispositif, utilisé avec des popula-

^{1.} Rappelons que l'acétylcholine est le neurotransmetteur utilisé au niveau des jonctions neuromusculaires excitatrices (chapitre 1, section 1.4).

tions nombreuses et éventuellement couplé à des systèmes microfluidiques, pourrait servir à des cribles génétiques ou à des cribles de médicaments.

5.2 Système expérimental

Le système utilisé par Xavier Manière a l'avantage d'être facile à mettre en place, puisqu'il utilise une cuve d'électrophorèse et le générateur associé pour établir le champ électrique. Le champ de la caméra est adapté à l'étude et au tri de populations, mais ne permet pas de suivre avec précision un individu unique. De plus, la tension est appliquée aux électrodes plongées dans la cuve : la valeur du champ dans le gel n'est pas clairement déterminée, ce qui rend difficile l'étude systématique de l'électrotaxie.

Les buts du système expérimental que nous avons mis au point et que nous décrivons ci-dessous et dans la Figure 5.3 sont : d'une part, d'établir dans le gel un champ électrique dont la valeur est ajustable et contrôlée par l'utilisateur ; d'autre part, d'observer *C. ele-gans* à un fort grossissement durant l'électrotaxie et de le suivre dans ses déplacements. Le dispositif a été construit avec l'aide de Mathieu Receveur, ingénieur de recherche au laboratoire et de Laurent Réa, technicien, pour l'aspect mécanique et d'Arnaud Grados, ingénieur, pour la partie électronique, en particulier pour la conception et la construction du boîtier de contrôle.

Cuve et support du gel

La cuve d'électrotaxie est au centre du dispositif (Fig. 5.3**A** et **B**). Elle est construite en Plexiglas® sur le modèle d'une cuve d'électrophorèse : un support central, où est posé le gel d'agar, est entouré d'une solution salée. Le gel d'agar a la forme d'un parallélépipède carré de 10 cm de côté et de 5 cm de haut. Les bords sont surélevés par rapport à la partie centrale, afin d'éviter l'inondation du gel par la solution qui remplit la cuve. Nous avons suivi le protocole décrit dans [60] pour la composition de la solution (eau déionisée, 0.25 mM L⁻¹ de NaCl, glycerol pour atteindre une osmolarité de 50 mM L⁻¹) et du gel (même composition que la solution et 2,5 % d'agar contre 1,7% dans les expériences de Gabel *et al.*).

Le champ électrique dans la cuve et dans le gel est établi en appliquant une différence de potentiel à deux électrodes constituées par deux fils de platine, placées dans le liquide de part et d'autre du support. La différence de potentiel est de l'ordre de 250 V pour obtenir un champ de 4 V cm⁻¹, pour un courant de 30 mA. La recirculation et le refroidissement du liquide, assurés par une pompe et un bain thermostaté, évitent les variations de l'intensité dues à la déplétion ionique et de l'échauffement de la solution par effet Joule. Pour des raisons de sécurité électrique, un couvercle transparent recouvre la cuve.



FIGURE 5.3 – **Dispositif d'électrotaxie.** A Le gel d'agar (1) est posé sur un support transparent, lui-même placé dans une cuve contenant une solution salée (2). La tension délivrée, U_d , est maintenue par deux électrodes (3) plongées dans le liquide, et régulée grâce à la mesure de la tension dans le gel, U_m , par deux autres électrodes (4). Le ver est éclairé en fond noir par un anneau de diodes électroluminescentes (5). Les images sont acquises à travers un objectif (6) par une caméra CCD (7) montée sur une platine XY (8), ce qui permet le suivi automatisé du ver lors de ses déplacements. Le traitement des images nécessaire au suivi (seuillage et calcul du barycentre du ver), ainsi que le contrôle de la platine, sont effectués par un code écrit en LabVIEW. Une carte National Instruments fait l'interface entre le boîter de contrôle de la tension et LabVIEW, où s'exécutent aussi les programmes de commande et de régulation de la tension. La cuve a les dimensions d'un parallélépipède de base carrée de 20 cm de côté et de 10 cm de hauteur. **B** Vue de la cuve d'électrotaxie. **C** Exemple de photographie d'un ver en fond noir.

Boîtier de contrôle de la tension

La tension est délivrée par le boîtier de contrôle et sa valeur est choisie par l'utilisateur via le logiciel LabVIEW et une carte d'acquisition National Instruments assurant l'interface entre l'ordinateur et le boîtier de contrôle. La valeur de la tension dans la cuve peut être changée en son opposé par l'utilisateur.

Il est nécessaire de connaître précisément la tension aux bornes du gel. Pour cela, deux électrodes mesurent la différence de potentiel aux deux extrémités du gel. La mesure est communiquée par la carte d'acquisition au programme de régulation de la tension, écrit en LabVIEW. Une boucle de régulation proportionelle permet de maintenir constante la tension dans le gel, à la valeur demandée par l'utilisateur. L'intensité du courant est aussi mesurée, afin de vérifier que ses variations ne sont pas trop importantes.

Imagerie et suivi du ver

Le gel est éclairé en fond noir par un anneau de diodes électroluminescentes placé sous la cuve : les vers apparaissent plus clairs que le fond de l'image (Fig. 5.3C). Une caméra CCD (Edmund Optics, EO-0813M) assure l'acquisition des images. Un premier système utilise un zoom manuel de faible grossissement (Computar MLH 10x), afin d'observer des populations de plusieurs individus. Dans une seconde configuration, la caméra est équipée d'un tube (Infinitube) et d'un objectif à longue portée (objectif de microscope Infinity Achrovid 2x ou 5x), ce qui permet d'obtenir des grossissements importants pour l'observation d'un individu unique.

La caméra est montée sur une platine XY (Zaber Motorized Stage), elle-même fixée sur une structure métallique. Les déplacements latéraux de la platine sont contrôlés par l'utilisateur depuis LabVIEW. Si ce dernier le souhaite, les déplacements de la platine peuvent être asservis à ceux du ver après un traitement automatique élémentaire des images reçues (seuillage de la forme et détection du barycentre du ver, puis de sa vitesse). Ce dispositif assure le suivi d'un individu à fort grossissement, sur de longues périodes, sans intervention de l'observateur et sans risque qu'il ne sorte du champ de la caméra.

Les images acquises et les déplacements de la platine sont enregistrés. Les informations disponibles décrivent donc les déformations du corps dans son référentiel aussi bien que les mouvements du ver à grande échelle. Le traitement des données collectées se fait avec ImageJ comme décrit dans le chapitre 2, et avec GNU Octave.

Logiciel de contrôle

L'interface entre l'utilisateur, le boîtier de contrôle de la tension, la caméra et la platine XY est assurée par un unique logiciel écrit en LabVIEW. L'image du ver, la valeur de la tension dans la cuve et dans le gel apparaissent sur un même écran, ainsi que les contrôles de la caméra, de la tension dans le gel et du sens du courant, et les paramètres des boucles de régulation de la tension et de la position de la platine. Une fonctionnalité du programme permet d'inverser périodiquement le sens du champ, tout en gardant constante sa valeur absolue.

5.3 Allers-retours dans un champ alterné

Nous avons étudié le comportement de *C. elegans* dans un champ électrique dont la norme et la direction sont constantes, mais dont le sens change de manière périodique. Le ver effectue alors des allers-retours sur le gel.

5.3.1 Procédure et résultats

Nous présentons ici quelques résultats préliminaires. Lors de chaque expérience, un jeune adulte hermaphrodite est placé dans le dispositif d'électrotaxie et une différence de potentiel correspondant à un champ de 4 V cm⁻¹ dans le gel est établie dans la cuve (voir l'annexe B pour les détails). Le sens du champ est ensuite inversé toutes les 45 s. Les déplacements de la platine, qui suit le mouvement du centre de masse du ver, sont enregistrés toutes les 0,1 s, de même que les images du ver lorsqu'il rampe. Nous appelerons *run* l'intervalle entre deux basculements du champ. Les résultats présentés ci-dessous on été obtenus sur un total de 31 individus.

Lorsque le champ est établi, le ver se dirige immédiatement vers la cathode. Le mouvement est directionnnel, comme décrit plus haut dans d'autres conditions expérimentales. Quand le sens du champ est inversé, le nématode opère une réorientation pour s'aligner de nouveau avec le champ et se diriger vers l'électrode opposée. Les caractéristiques de cette réorientation sont stéréotypées, du moins lors de premiers *runs* (Fig. 5.4**A**) : le ver arrête immédiatement de se déplacer vers l'avant et effectue une marche arrière correspondant à quelques périodes du mouvement, lors de laquelle il change de direction. Il reprend ensuite son déplacement vers l'avant, et achève sa réorientation en se courbant de nouveau du côté désiré. Cette dernière manœuvre est connue sous le nom de *virage* Ω , en raison de la forme particulière du ver lorsque sa courbure est maximale [119].

Les réorientations ne sont pas toutes aussi directes : il arrive que le ver ait besoin de plusieurs essais avant de reprendre son déplacement vers la cathode (Fig. 5.4**B**). Il alterne alors marche avant et marche arrière, en modifiant l'angle de progression à l'aide de virages Ω .

La trajectoire d'un ver est reconstruite à partir de l'analyse des déplacements de la platine, combinée au relevé des temps de basculement du champ. Les transitions entre déplacement vers l'avant et vers l'arrière sont détectées en calculant la vitesse instantanée du centre de masse. Ceci nous permet de définir deux phases principales lors d'un run :

- une phase directionnelle, lors de laquelle le ver se dirige sans interruption en direction de la cathode, comme la plus longue période de déplacement vers l'avant au cours d'un run;
- une phase de réorientation suivant le basculement du champ et précédant une nouvelle phase directionnelle, lors de laquelle le nématode alterne marches avant et marches arrière en tentant de s'aligner selon le nouveau sens du champ électrique, avant de repartir dans la nouvelle direction.



FIGURE 5.4 – **Réorientation suite au basculement du champ.** A Réorientation directe : avant le basculement du champ, le ver rampe dans sa direction. Après le basculement (ligne pointillée), la réorientation comprend un virage en marche arrière (en rouge), un virage en marche avant, puis la reprise du mouvement dans la direction opposée (en vert). B Exemple de virage en Ω : le ver change de direction en courbant intensément son corps, parfois jusqu'à toucher sa queue avec sa tête. C Réorientation hésitante : après le basculement du champ, le ver repart dans la direction opposée après une alternance de plusieurs marches avant et arrière.

Il est possible d'observer une éventuelle troisième phase, si le ver s'arrête lors de la phase directionnelle, avant que le champ ne bascule de nouveau. Durant cette phase, observée surtout au bout de quelques runs, soit le ver s'arrête quelques secondes avant de repartir, soit il effectue une manœuvre de réorientation. Exceptionnellement (2 observations), il arrive qu'un ver ne réponde pas au champ sur le modèle décrit ci-dessus, et rampe vers l'anode plutôt que vers la cathode sans passer par une phase de réorientation. Nous n'avons pas pris en compte ces vers lors de notre analyse.

Durant la phase de réorientation, le ver modifie l'angle de sa vitesse d'environ 180° afin de suivre le nouveau sens du champ électrique. La part des réorientations directes, correspondant à un simple demi-tour (Fig. 5.4A), diminue avec le nombre d'allers-retours effectués. La durée des épisodes de réorientation s'allonge alors que le nombre d'alternances entre marche arrière et marche avant augmente (Fig. 5.6A). Il arrive fréquemment que la durée de la réorientation atteigne les 45 s qui séparent deux inversions du champ. Par conséquent, le nombre de phases directionnelles dépassant les 10 s diminue avec le nombre de runs (Fig. 5.6B).

La distance parcourue lors de la phase directionnelle diminue avec le nombre de runs (Fig. 5.6C). Ceci n'est pas seulement dû à l'allongement du temps de réorientation : la vitesse de progression durant la phase directionnelle diminue aussi (Fig. 5.6D). Il arrive parfois que le ver s'immobilise totalement. Les séquences que nous avons analysées ne dépassent pas les 15 runs car au-delà il devient rare d'observer une phase directionnelle. Soit le ver s'arrête et s'immobilise durant plusieurs runs, soit il ne répond plus au champ



FIGURE 5.5 – Extraction et analyse des trajectoires. A Trajectoire dans un champ alterné (* : départ, + : arrivée). Le sens du champ (bleu vers la droite, rouge vers la gauche) change quasiinstantanément (en moins de 0,2 s) toutes les 45 s. L'analyse des trajectoires distingue une phase de réorientation (branches bleues et rouges, en fonction du sens du champ), une phase directionnelle (branches cyan et magenta), et une éventuelle troisième phase si la phase directionnelle est interrompue (en noir, exemple à la fin du premier retour, indiqué par la flèche noire). B Distribution des vitesses instantanées lors des phases directionnelles de l'expérience présentée en A. La distribution est régulière et la vitesse moyenne est clairement définie.

de la manière attendue et atteint les bords du gel.

5.3.2 Discussion

Ainsi que le notent Gabel *et al.* [60], le comportement de *C. elegans* lors de la réorientation rappelle la stratégie utilisée lors de la chimiotaxie. *C. elegans* dispose en effet d'un système chimiosensible pour la détection de composés volatils ou en solution, et se déplace de manière à remonter ou à descendre les gradients chimiques, en fonction du caractère attractif ou répulsif du composé chimique [118]. Les neurones sensoriels impliqués, dont certains servent aussi à la détection du champ électrique, se situent dans les amphides.

Pierce-Shimomura *et al.* [128] ont montré que lors de la chimiotaxie *C. elegans* procède par tâtonnements, une stratégie qui rappelle celle des bactéries *E. coli* [129], en alternant des phases de déplacement ininterrompu et des phases de réorientation appelées pirouettes. Une pirouette est un ensemble de marches arrière, de virages abrupts et de virages Ω dont le résultat est un changement de direction. Les pirouettes sont des événements aléatoires, mais leur fréquence dépend du gradient de concentration du composé récemment ressenti par le ver. Si, par exemple, le composé est attractif, un gradient positif (ressenti, dans le référentiel du ver, comme une variation temporelle dC/dt positive) entraîne la baisse de fréquence, voire la suppression, des pirouettes. Un gradient négatif (dC/dt < 0) entraîne l'augmentation de la fréquence des pirouettes. Les déplacements en direction de la source du gradient durent donc en moyenne plus longtemps que ceux qui s'en éloignent : ce modèle de marche aléatoire biaisée suffit à expliquer le comportement et les trajectoires de *C. elegans* lors de la chimiotaxie.



FIGURE 5.6 – Comportement dans un champ électrique alterné en fonction du nombre de runs. L'ensemble des données collectées sur 31 individus est présenté ; les moyennes apparaissent en noir. A Durée de la phase de réorientation : B fraction de phases directionnelles longues de plus de 10 s ; C vitesse de progression durant la phase directionnelle ; D distance parcourue durant la phase directionnelle.



FIGURE 5.7 – **Modèle neuronal pour l'électrotaxie, proposé par Gabel [60].** Les neurones sensoriels sont représentés par des triangles, les interneurones et les motoneurones par des hexagones. Les synapses chimiques sont indiquées par des flèches et les jonctions communiquantes par des terminaisons en T.

À supposer que la navigation dans un champ électrique suive un schéma similaire, le comportement du ver lors des premiers allers-retours pourrait être dû à une réorientation suivant immédiatement l'inversion brusque du champ électrique, puis à une suppression totale des pirouettes durant la phase directionnelle. Par la suite, ce schéma pourrait être altéré par le nombre des allers-retours : la distribution des pirouettes en réponse au gradient serait modifiée, et par conséquent le nombre d'essais nécessaires à la réorientation suivant une inversion du champ augmenterait.

La modification du comportement du ver en fonction du nombre d'allers-retours lors de nos expériences contraste avec les expériences de Gabel *et al.* [60]. Pour observer le comportement du ver sur une longue durée, la direction du champ est lentement tournée au cours du temps : le ver adapte alors sa direction de progression en modifiant légèrement l'angle que fait sa tête avec le reste du corps, et sa trajectoire suit la rotation du champ et décrit un cercle. Dans ces conditions, le ver peut ramper pendant une à trois heures sans montrer de signe de désensibilisation ou d'adaptation neuronale. Dans nos expériences, nous observons au contraire une altération importante de la phase de réorientation au bout de quelques allers-retours et une diminution de la vitesse de progression lors de la phase directionnelle.

Le type de réorientation suite à un changement de direction du champ dépend de l'amplitude de ce changement [60]. Pour de faibles modification de l'angle du champ, le ver préfère ajuster légèrement sa direction en courbant davantage son cou du côté désiré, sans interrompre sa progression vers l'avant (virage léger [130]). Pour des angles plus importants, il aura recours à la combinaison d'une marche arrière et d'un virage en Ω . Les circuits neuronaux qui contrôlent les deux manœuvres de réorientation sont différents (Fig. 5.7) [60] : peut-être l'augmentation de la durée des phases de réorientation n'est-elle pas due à une diminution de la détection du champ électrique, mais plutôt à une altération du traitement neuronal en aval, au niveau des interneurones par exemple, ce qui expliquerait les différences entre nos expériences et celles de Gabel *et al.*.

5.4 Conclusion

Nous avons prolongé l'approche des expériences menées avec Xavier Manière, qui montrent que l'électrotaxie peut être envisagée comme un outil pour le tri de populations de *C. elegans* sur des critères d'aptitude locomotrice et pour l'étude de la locomotion en général. Après avoir décrit le système expérimental élaboré pour suivre *C. elegans* dans un champ électrique, nous avons étudié le comportement du ver dans un champ dont le sens est inversé périodiquement.

La période (45 s) est suffisamment longue pour que nous puissions observer une phase de réorientation suivant le basculement du champ, puis une phase directionnelle de reptation ininterrompue. Ces premiers résultats montrent un allongement de la phase de réorientation avec le nombre d'allers-retours effectués, au détriment de la phase directionnelle. Ceci traduit vraisemblablement une altération de la navigation au niveau neuronal ; cependant la diminution de la vitesse de progression durant la phase directionnelle pourrait aussi être due à de la fatigue musculaire.

L'amélioration de l'actuel dispositif pour obtenir un champ électrique à deux dimensions semblable à celui présenté par Gabel *et al.* [60] permettrait d'obtenir des trajectoires circulaires et de préciser, par comparaison, l'effet du changement de sens et des réorientations sur la locomotion.

D'autres utilisations du dispositif actuel peuvent être envisagées, au nombre desquelles l'étude du comportement de *C. elegans* lorsqu'il est soumis à deux stimuli devant provoquer des comportements opposés mais dont le traitement neuronal emprunte des voies similaires (chimiotaxie et électrotaxie), l'amélioration du tri de larges populations sur leurs aptitudes locomotrices ou encore l'observation d'autres espèces capables d'électrotaxie (*Dictyostelium discoideum*).

CHAPITRE 6 Conclusion

La locomotion ondulatoire consiste à déformer localement et périodiquement un corps élancé, élastique, de manière à propager une onde de courbure d'une extrémité à l'autre. Ce mode de locomotion, bien qu'utilisé par de nombreux organismes à des échelles et dans des milieux très différents, commence seulement à être implémenté par l'homme dans des dispositifs dont la plupart s'inspirent de la morphologie des serpents [131]. La locomotion ondulatoire dispose pourtant d'atouts considérables lorsqu'il s'agit de se déplacer dans des environnements complexes et hétérogènes aussi divers que des tissus vivants, des suspensions de particules, des milieux visqueux, poreux ou granulaires, des décombres ou des pierriers. La distribution de l'appareil moteur tout le long du corps de l'animal assure en particulier la robustesse du déplacement vis-à-vis des perturbations mécaniques.

La compréhension de l'aspect physique de la locomotion ondulatoire, ou comment l'onde de déformation permet à l'animal de progresser dans son milieu, a bénéficié des travaux fondateurs de James Gray dans les années cinquante [76]. Ici, nous avons étudié l'influence de l'environnement mécanique sur la locomotion de *C. elegans*. Ce nématode de taille millimétrique a émergé comme système modèle en biologie dans les années soixantedix, initialement pour comprendre les fondements génétiques du développement [30]. Les avantages de ce modèle pour l'étude de la locomotion tiennent à la structure mécanique du ver, assimilable à un filament visco-élastique ; à la simplicité du système locomoteur, qui comprend le squelette hydrostatique et un jeu de cellules musculaires régulièrement placées le long du corps ; à la caractérisation fine du système nerveux, pour ne citer que les plus importants. En outre, dans son habitat naturel, *C. elegans* se trouve confronté à une grande variété d'environnements mécaniques, auxquels sa locomotion répond par une large gamme de modulations des schémas rythmiques et des formes adoptés.

Les travaux présentés dans cette thèse s'inscrivent dans un ensemble d'études récentes de la locomotion ondulatoire chez *C. elegans* [89, 97, 83, 47]. Ils s'en distinguent en proposant un dispositif qui permet le contrôle de l'environnement mécanique d'un individu unique par son confinement, en milieu liquide, entre les deux surfaces parallèles d'une plaque de verre et d'un gel d'agar déformable. Nous suivons ainsi l'évolution des paramètres de la locomotion d'un même individu en fonction des modifications dynamiques ou graduelles de son confinement.

Ce dispositif est décrit dans le chapitre 2. Il est possible de reproduire les deux modes

de locomotion communément observés au laboratoire, la nage en milieu liquide et la reptation sur gel d'agar, la pression exercée par la plaque de verre se substituant à l'action des forces capillaires dans ce second cas. La transition d'un mode à l'autre, induite par la variation dynamique du confinement, montre une adaptation progressive de la locomotion, suggérant que les différents modes de locomotion consistent en des dynamiques différentes d'un même schéma d'excitation musculaire plutôt qu'en plusieurs allures distinctes. La continuité des modes de locomotion est confirmée par l'analyse détaillée de la transition depuis la nage vers la reptation, provoquée par un changement graduel du confinement. Les paramètres de la locomotion (période, vitesse de propagation des ondes, courbure maximale) évoluent continûment, marquant le passage de la nage à la reptation telle qu'elle est décrite dans la littérature scientifique, jusqu'à des modes de locomotion se situant au-delà de la reptation dans l'éventail des modes adoptés. Une analyse en composantes principales de la forme du ver souligne la continuité de l'ensemble des modes de locomotion dans l'espace des formes. Finalement, l'examen du mutant unc-79, qui présente des difficultés pour basculer de la reptation à la nage, démontre l'utilité de notre approche pour déceler et quantifier les défauts de la locomotion d'animaux mutants.

L'adaptation des motifs d'excitation musculaire produisant l'onde de déformation nécessite l'intégration sensorielle, d'une part des données mécaniques de l'environnement et d'autre part de la réponse du corps aux sollicitations des muscles dans ce contexte mécanique. La part du toucher et de la proprioception dans la régulation de la locomotion de *C. elegans* est explorée dans les quelques expériences décrites dans le chapitre 3. Le comportement d'animaux mutants *mec-4*, *trp-4* et *che-3* permet d'aborder les rôles respectifs des neurones du toucher léger, du contrôle neuronal de la courbure et de l'entrée mécanosensorielle au niveau des neurones ciliés, mais aussi leur importance relative en fonction de l'intensité du confinement.

Dans le chapitre 4 nous exposons une relation liant vitesse de propagation et période des ondes de courbure. Cette relation de dispersion ne semble pas dépendre du sens de propagation de l'onde, et ne se trouve que partiellement modifiée lors de l'observation des animaux mutants. En postulant qu'elle correspond à une contrainte sur la propagation des ondes le long du corps, nous proposons un mécanisme expliquant la sélection du mode de locomotion chez le type sauvage. Notre modèle suppose le maintien de la puissance maximale instantanée développée en un point donné du corps pour se courber, ce qui signifie vaincre l'élasticité de la cuticule, mais aussi la résistance mécanique du milieu où évolue le ver.

Nous abordons finalement le comportement de *C. elegans* dans un champ électrique (électrotaxie) dans le chapitre 5, qui sort du cadre strict de l'étude de la locomotion. Les trajectoires du ver dans un champ électrique se distinguent en effet par la directionnalité et la régularité de la vitesse de progression [60]. Après avoir exposé l'intérêt de ce comportement dans l'élaboration d'une méthode de tri des nématodes en fonction de leurs capacités locomotrices, il présente un dispositif pour le suivi d'un ver unique dans un champ électrique. Les premiers résultats, obtenus dans un champ électrique dont le sens est périodiquement alterné, montrent une modification du processus de réorientation en fonction

du nombre d'allers-retours effectués, et une diminution de la vitesse de progression, ce qui pose la question des liens existant entre navigation et locomotion chez *C. elegans*.

L'essentiel des résultats présentés dans cette thèse concerne la modulation de la locomotion de *C. elegans*. Il serait intéressant de les confronter aux modèles numériques s'appuyant sur les connaissances disponibles à propos du système nerveux et de la mécanique du ver, qui n'ont jusqu'ici pas considéré les effets de changements dans l'environnement mécanique [72, 73, 75]. En particulier, la question se pose de savoir si la relation de dispersion des ondes de courbure peut être obtenue comme conséquence du mécanisme neuronal de propagation des ondes. Du point de vue expérimental, la combinaison d'une version miniaturisée du dispositif de plaquage et de la technique d'imagerie des muscles par FRET actuellement développée au laboratoire permettrait d'établir le lien entre l'intensité de la contraction musculaire et la courbure du corps dans un environnement donné, et d'observer la présence éventuelle d'une phase entre l'onde de contraction musculaire et l'onde de courbure [47].

La démarche biomimétique qui est à l'origine de l'étude de *C. elegans* au laboratoire Matière et Systèmes Complexes s'enrichira nécessairement d'une compréhension fine de sa locomotion et de ses interactions avec l'environnement mécanique. Pour notre part, nous espérons avoir ainsi montré l'originalité et l'utilité du modèle *C. elegans* dans des domaines autres que la biologie « pure ». Originellement proposé afin d'élucider les mécanismes moléculaires du développement, *C. elegans* s'est imposé comme un modèle indispensable dans des champs très variés de la biologie, jusqu'à atteindre des disciplines connexes. Récemment, le ver a ainsi été l'objet d'approches hydrodynamiques [48], mécaniques [112] ou robotiques [132]. En retour, la recherche en biologie autour de *C. elegans* se nourrit dorénavant de techniques nouvelles ou de domaines naissants, comme la microfluidique [133] ou l'optogénétique [134].

Bibliographie

- [1] Robert McNeill ALEXANDER : *Principles of Animal Locomotion*. Princeton University Press, 2003.
- [2] Étienne-Jules MAREY : Le mouvement. Masson, Paris, 1894.
- [3] E. M. PURCELL : Life at low Reynolds number. *American Journal of Phyics*, 45(1):3–11, 1977.
- [4] Étienne GUYON, Jean-Pierre HULIN et Luc PETIT : *Hydrodynamique physique*. CNRS Éditions, 2001.
- [5] Éric LAUGA : Life around the scallop theorem. Soft Matter, 7:3060–3065, 2011.
- [6] L. E. BECKER, S. A. KOEHLER et H. A. STONE : On self-propulsion of micromachines at low Reynolds number : Purcell's three-link swimmer. *Journal of Fluid Mechanics*, 490:15–35, 2003.
- [7] Brian CHAN : *Bio-inspired fluid locomotion*. Thèse de doctorat, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, États-Unis, 2009.
- [8] C. J. BROCAW : Non-sinusoidal bending waves of sperm flagella. Journal of Experimental Biology, 43:155–169, 1965.
- [9] Daniel TAM et A. E. HOSOI : Optimal stroke patterns for Purcell's three-link swimmer. *Physcal Review Letters*, 98:68105, 2007.
- [10] J. E. AVRON et O. RAZ : A geometric theory of swimming : Purcell's swimmer and its symmetrized cousin. *New Journal of Physics*, 10, 2008.
- [11] J. GRAY : The mechanism of locomotion in snakes. *Journal of Experimental Biology*, 23(2), 1946.
- [12] David L. HU, Jasmine NIRODY, Terri SCOTT et Michael J. SHELLEY : The mechanics of slithering locomotion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(25):10081–10085, 2009.
- [13] Étienne-Jules MAREY : Locomotion comparée chez les différents animaux. *La nature*, (1057), 1893.
- [14] Ryan D. MALADEN, Yang DING, Chen LI et Daniel I. GOLDMAN : Undulatory swimming in sand : subsurface locomotion of the sandfish lizard. *Science*, 325(314): 314–318, 2009.

- [15] A. WOLF, H. M. CHOSET, H. B. BROWN et R. CASCIOLA : Design and control of a mobile hyper-redundant urban search and rescue robot. *International Journal of Advanced Robotics*, 19(8):221–248, 2005.
- [16] L. MAHADEVAN, S. DANIEL et M. K. CHAUDURY : Biomimetic ratcheting motion of a soft, slender, sessile gel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(1):23–26, 2004.
- [17] John SCHWARTZ : In the lab : Robots that slink and squirm. *The New York Times*, page F1, 2007.
- [18] Filip ILIEVSKI, Aaron D. MAZZEO, Robert F. SHEPHERD, Xin CHEN et George M. WHITESIDES : Soft robotics for chemists. *Angewandte Chemie International Edition*, 50:1890–1895, 2011.
- [19] Gavriel IDDAN, Gavriel MERON, Arkady GLUKHOVSKY et Paul SWAIN : Wireless capsule endoscopy. *Nature*, 405:417, 2000.
- [20] G. L. M. MEISTER et H. C. BERG : Bacteria swim by rotating their flagellar filaments. *Nature*, 325(6105):637–640, 1973.
- [21] Jake J. ABBOTT, Kathrin E. PEYER, Marco Cosentino LAGOMARSINO, Li ZHANG, Lixin DONG, Ioannis K. KALIAKASTOS et Bradley J. NELSON : How should microrobots swim? *The International journal of robotics Research*, 28(11-12):1434– 1447, 2009.
- [22] Rémi DREYFUS, Jean BAUDRY, Marcus L. ROPER, Marc FERMIGIER, Howard A. STONE et Jérôme BIBETTE : Microscopic artificial swimmers. *Nature*, 437(6):862– 865, 2005.
- [23] Alessandro CRESPI, André BADERTSCHER, André GUIGNARD et Auke Jan IJSPEERT : Amphibot I : an amphibious snake-like robot. *Robotics and Autonomous Systems*, 50:163–175, 2005.
- [24] Hyunwoo YUK, Daeyeon KIM, Honggu LEE, Sungho JO et Jennifer H. SHIN : Shape memory alloy-based small crawling robots inspired by c. elegans. *Bioin-spiration and Biomimetics*, 6:046002, 2011.
- [25] Li ZHANG, Jake J. ABBOTT, Lixin DONG, Bradley E. KRATOCHVIL, Dominik BELL et Bradley J. NELSON : Artificial bacterial flagella : Fabrication and magnetic control. *Applied Physics Letters*, 94:064107, 2009.
- [26] Gary B. GILLIS : Neuromuscular control of anguilliform locomotion : patterns of red and white muscle activity during swimming in the american eel *Anguilla rostrata*. *Journal of Experimental Biology*, 201:3245–3256, 1998.
- [27] Alexandra HOUSSAYE, Feng XU, Lukas HELFEN, Vivian De BUFFRÉNIL, Tilo BAUMBACH et Paul TAFFOREAU : Three-dimensional pelvis and limb anatomy of the cenomanian hind-limbed snake *Eupodophis descouensi* (squamata, ophidia) revealed by synchrotron-radiation computed laminography. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 31:2–7, 2011.

- [28] Antoine BARRIÈRE et Marie-Anne FÉLIX : High local genetic diversity and low outcrossing rate in *Caenorhabditis elegans* natural populations. *Current Biology*, 15:1176–1184, 2005.
- [29] Z. F. ALTUN, L. A. HERNDON, C. CROCKER, R. LINTS et D. H. HALL: WormAtlas. 2002-2010.
- [30] Sydney BRENNER : The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77:71–94, 1974.
- [31] Sydney BRENNER : Nobel lecture. Nature's gift to science. *Bioscience Reports*, 23:225–237, 2003.
- [32] J.E. SULSTON, E. SCHIERENBERG, J.G. WHITE et J.N. THOMSON : The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 100(1):64–119, 1983.
- [33] J. G. WHITE, E. SOUTHGATE, J. Nichol THOMSON et Sydney BRENNER : The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London*, 314:1–340, 1986.
- [34] Wormbase web site, WS226, 2011.
- [35] L. BYERLY, R. C. CASSADA et R. L. RUSSEL : The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans. Developmental Biology*, 51(1):22–33, 1976.
- [36] Beth L. CHEN, David H. HALL et Dimitri B. CHKLOVSKII : Wiring optimization can relate neuronal structure and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(12):4723–4728, 2006.
- [37] Qiang LIU, Gunther HOLLOPETHER et Erik M. JORGENSEN : Graded synaptic transmission at the *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(26):10823–10828, 2009.
- [38] Boris SHTONDA et Leon AVERY : CCA-1, EGL-19 and EXP-2 currents shape action potentials in the *Caenorhabditis elegans* pharynx. *Journal of Experimental Biology*, 208:2177–2190, 2005.
- [39] François-Émile MAUPAS : La mue et l'enkystement chez les nématodes. *Archives de zoologie expérimentale*, 7, 1899.
- [40] Jonathan HODGKIN et Tabitha DONIACH : Natural variation and copulatory plug formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 146:149–164, 1997.
- [41] Karin KIONTKE et Walter SUDHAUS : *Wormbook*, chapitre Ecology of *Caenorhabditis* species. The *C. elegans* Research Community, 2006.
- [42] Warwick L. NICHOLAS, Ellsworth C. DOUGHERTY et Eder Lindsay HANSEN : Axenic cultivation of *Caenorhabditis briggsae* with chemically undefined supplements : comparative studies with related nematodes. *Annals of the New York Academy of Science*, 77:218–236, 1959.
- [43] Marie-Anne FÉLIX et Christian BRAENDLE : The natural history of *Caenorhabditis* elegans. Current Biology, 20(22):R965–R969, 2010.

- [44] J. GRAY et H. W. LISSMANN : The locomotion of nematodes. Journal of Experimental Biology, 41:135–154, 1964.
- [45] Pascal SAUVAGE : Étude de la locomotion chez C. elegans et perturbations mécaniques du mouvement. Thèse de doctorat, Université Paris Diderot, 2007.
- [46] Sung-Jin PARK, Miriam B. GOODMAN et Beth L. PRUITT : Analysis of nematode mechanics by piezoresistive displacement clamp. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(44):17376 –17381, 2007.
- [47] Christopher FANG-YEN, Matthieu WYART, Julie XIE, Risa KAWAI, Tom KODGER, Sway CHEN, Quan WEN et Aravinthan DT SAMUEL : Biomechanical analysis of gait adaptation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(47):20323–20328, 2010.
- [48] J. SZNITMAN, X. SHEN, R. SZNITMAN et P. E. ARRATIA : Propulsive force measurements and flow behavior of undulatory swimmers at low Reynolds number. *Physics of Fluids*, 22, 2010.
- [49] Anne C. HART : *Wormbook*, chapitre Behavior. The *C. elegans* Research Community, WormBook, 2006.
- [50] D. L. LEE et H. J. ATKINSON : *Physiology of Nematodes*. The Macmillan Press Ltd., Londres, 1976.
- [51] Iain L. JOHNSTONE : The cuticle of the nematode *Caenorhabditis elegans* : A complex collagen structure. *BioEssays*, 16(3):171–178, 1994.
- [52] Z. V. GUO et L. MAHADEVAN : Limbless undulatory propulsion on land. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(9):3179–3184, 2008.
- [53] J. SZNITMAN, Prashant K. PUROHIT, P. KRAJACIC, T. LAMITINA et P. E. ARRA-TIA : Material properties of *Caenorhabditis elegans* swimming at low Reynolds number. *Biophysical Journal*, 98:617–626, 2010.
- [54] Alexandre SAEZ, Marion GHIBAUDO, Benoît LADOUX, Axel BUGUIN et Pascal SILBERZAN : Les cellules vivantes répondent à la rigidité de leur substrat. *Images de la Physique*, pages 94–100, 2007.
- [55] Stephen E. Von STETINA, Millet TREININ et David M. Miller III : The motor circuit. *International Review of Neurobiology*, 69:125–167, 2006.
- [56] Piali SENGUPTA et Aravinthan DT SAMUEL : *Caenorhabditis elegans* : a model system for systems neuroscience. *Current Opinion in Neurobiology*, 19:637–643, 2009.
- [57] David B. DUSENBERRY : Analysis of chemotaxis in the nematode *Caenorhabditis elegans* by countercurrent separation. *Journal of Experimental Biology*, 188(1):41–47, 1974.
- [58] William S. RYU et Aravinthan DT SAMUEL : Thermotaxis in *Caenorhabditis elegans* analyzed by measuring responses to defined thermal stimuli. *Journal of Neuroscience*, 22(13):5727–5733, 2002.

- [59] Alex WARD, Julie LIU, Zhaoyang FENG et XZ Shawn XU : Light-sensitive neurons and channels mediate phototaxis in *C. elegans. Nature Neuroscience*, 11:916–922, 2008.
- [60] Christopher V. GABEL, Harriso GABEL, Dmitri PAVLICHIN, Albert KAO, Damon A. CLARK et Aravinthan DT SAMUEL : Neural circuits mediate electrosensory behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neuroscience*, 27:7586–7596, 2007.
- [61] Alexander BOUNOUTAS et Martin CHALFIE : Touch sensitivity in *Caenorhabditis* elegans. European Journal of Physiology, 454:691–702, 2007.
- [62] Elizabeth R. SAWIN, Rajesh RANGANATHAN et H. Robert HORVITZ : *C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway. *Neuron*, 26:619–631, 2000.
- [63] Wei LI, Zhaoyang FENG, Paul W. STERNBERG et XZ Shawn XU : A *C. elegans* stretch receptor neuron revealed by a mechanosensitive TRP channel homologue. *Nature*, 440(30):684–687, 2006.
- [64] Martin CHALFIE, John E. SULSTON, John G. WHITE, Eileen SOUTHGATE, J. Nichol THOMSON et Sydney BRENNER : The neural circuit for touch sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neuroscience*, 5(4):956–964, 1985.
- [65] Cornelia I. BARGMANN et Leon AVERY : Laser killing of cells in *Caenorhabditis* elegans. Methods in cell biology, 48:225–250, 1995.
- [66] David H. HALL et E.M. HEDGECOCK : Kinesin-related gene *unc-104* is required for axonal transport of synaptic vesicles in *C. elegans*. *Cell*, 65:837–847, 1991.
- [67] Nektarios TAVERNARAKIS, Wayne SHREFFLER, Shiliang WANG et Monica DRISCOLL : *unc-8*, a DEG/ENaC family member, encodes a subunit of a candidate mechanically gated channel that modulates *C. elegans* locomotion. *Neuron*, 18:107–119, 1997.
- [68] Eve MARDER et Dirk BUCHER : Central pattern generators and the control of rhythmic movements. *Current Biology*, 11:R986–R996, 2001.
- [69] Jianhua CANG et W. O. FRIESEN : Model for intersegmental coordination of leech swimming : Central and sensory mechanisms. *Journal of Neurophysiology*, 87:2760–2769, 2002.
- [70] R. M. HARRIS-WARRICK et A. H. COHEN : Serotonin modulates the central pattern generator for locomotion in the isolated lamprey spinal cord. *Journal of Experimental Biology*, 116:27–46, 1985.
- [71] J. A. KAHN et A. ROBERTS : The central nervous origin of the swimming motor pattern in embryos of *Xenopus laevis*. *Journal of Experimental Biology*, 99:185– 196, 1982.
- [72] Jan KARBOWSKI, Gary SCHINDELMAN, Christopher J. CRONIN, Adeline SEAH et Paul W. STERNBERG : Systems level circuit model of *C. elegans* undulatory locomotion : mathematical modeling and molecular genetics. *Journal of Computational Neuroscience*, 24:253–276, 2007.

- [73] John BRYDEN et Netta COHEN : Neural control of *Caenorhabditis elegans* forward locomotion : the role of sensory feedback. *Biological Cybernetics*, 98:339–351, 2008.
- [74] Yi ZHENG, Penelope J. BROCKIE, Jerry E. MELLEM, David M. MADSEN et Andres Villu MARICQ : Neuronal control of locomotion in *C. elegans* is modified by a dominant mutation in the GLR-1 ionotropic glutamate receptor. *Neuron*, 24:347– 361, 1999.
- [75] J. H. BOYLE, John BRYDEN et Netta COHEN : Integrated neuro-mechanical model of *C. elegans* forward locomotion. *Lecture Notes in Computer Science*, 4984:37–47, 2008.
- [76] J. GRAY et G. J. HANCOCK : The propulsion of sea-urchin spermatozoa. *Journal* of Experimental Biology, 32:802–814, 1955.
- [77] Maria M. TIRADO et José Garcia de LA TORRE : Translation friction coefficients of rigid, symmetric top macromolecules. Application to circular cylinders. *Journal* of Chemical Physics, 171:2581–2587, 1979.
- [78] G. K. BATCHELOR : Slender-body theory for particles of arbitrary cross-section in Stokes flow. *Journal of Fluid Mechanics*, 44(419), 1970.
- [79] Sunghwan JUNG : *Caenorhabditis elegans* swimming in a saturated particulate system. *Physics of Fluids*, 22, 2010.
- [80] Robert McNeill ALEXANDER : *The Biology of Nematodes*, chapitre Locomotion. Taylor and Francis Inc., 2002.
- [81] Pascal SAUVAGE, Médéric ARGENTINA, J. DRAPPIER, T. SENDEN, J. SIMÉON et Jean-Marc DI MEGLIO : An elasto-hydrodynamical model of friction for the locomotion of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biomechanics*, 44(6):1117–1122, 2011.
- [82] Jan KARBOWSKI, Christopher J. CRONIN, Adeline SEAH, Jane E. MENDEL, Daniel CLEARY et Paul W. STERNBERG : Conservation rules, their breakdown, and optimality in *Caenorhabditis elegans* sinusoidal locomotion. *Journal of Theoretical Biology*, 242:652–669, 2006.
- [83] Stefano BERRI, Jordan H. BOYLE, Manlio TASSIERI, Ian HOPE et Netta COHEN : Forward locomotion of the nematode *C. elegans* is achieved through modulation of a single gait. *HFSP Journal*, 3(3):186–193, 2009.
- [84] G. JUAREZ, K. LU, J. SZNITMAN et P. E. ARRATIA : Motility of small nematodes in wet granular media. *EPL*, 92, 2010.
- [85] Sungsu PARK, Hwang HYEJIN, Seong-Won NAM, Fernando MARTINEZ, Robert H. AUSTIN et William S. RYU : Enhanced *Caenorhabditis elegans* locomotion in a structured microfluidic environment. *PLoS One*, 3(6), 2008.
- [86] S. R. LOCKERY, K. J. LAWTON, J. C. DOLL, S. FAUMONT, S. M. COULTHARD, T. R. THIELE, N. CHRONIS, K. E. MCCORMICK, Miriam B. GOODMAN et Beth L. PRUITT : Artificial dirt : Microfluidic substrates for nematode neurobioloy and behavior. *Journal of Neurophysiology*, 99:3136–3143, 2008.

- [87] Archana PARASHAR, Roy LYCKE, John A. CARR et Santosh PANDEY : Amplitudemodulated sinusoidal microchannels for observing adaptability in *C. elegans* locomotion. *Biomicrofluidics*, 5, 2011.
- [88] H. WALLACE : Movement of eelworms 1. influence of pore size and moisture content of the soil on the migration of larvae of the beet eelworm. *Annals of Applied Biology*, 46:74–85, 1958.
- [89] Jeremie KORTA, Damon A. CLARK, Christopher V. GABEL, L. MAHADEVAN et Aravinthan DT SAMUEL : Mechanosensation and mechanical load modulate the locomotory gait of swimming *C. elegans. Journal of Experimental Biology*, 210: 2383–2389, 2007.
- [90] J. SZNITMAN, X. SHEN, Prashant K. PUROHIT et P. E. ARRATIA : The effects of fluid viscosity on the kinematics and material properties of *C. elegans* swimming at low Reynolds number. *Experimental Mechanics*, 50:1303–1311, 2010.
- [91] Robert McNeill ALEXANDER : A model of bipedal locomotion on compliant legs. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London B*, 338:189–198, 1992.
- [92] Karen A. MESCE et Jonathan T. PIERCE-SHIMOMURA : Shared strategies for behavioral switching : understanding how locomotor patterns are turned on and off. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 4, 2010.
- [93] Teresa ESCH, Karen A. MESCE et William B. KRISTAN : Evidence for sequential decision-making in the medicinal leech. *Journal of Neuroscience*, 22:11045–11054, 2002.
- [94] K. L. BRIGGMAN, H. D. I. ABARBANEL et W. B. Kristan JR. : Optical imaging of neuronal populations during decision-making. *Science*, 302:896–901, 2005.
- [95] J. CHEN, W. O. FRIESEN et T. IWASAKI : Mechanisms underlying rhythmic locomotion : body-fluid interaction in undulatory swimming. *Journal of Experimental Biology*, 214:561–574, 2011.
- [96] Biodidac, 2011.
- [97] Jonathan T. PIERCE-SHIMOMURA, Beth L. CHEN, James J. MUN, Raymond HO, Raman SARKIS et Steven L. MCINTIRE : Genetic analysis of swimming and crawling locomotory patterns in *C. elegans. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52):20982–20987, 2008.
- [98] M. D. ABRAMOFF, P. J. MAGALHAES et S. J. RAM : Image processing with imagej. *Biophotonics International*, 11(7):36–42, 2004.
- [99] Greg J. STEPHENS, Bethany JOHNSON-KERNER, William BIALEK et William S. RYU: Dimensionality and dynamics in the behavior of *C. elegans. PloS Computational Biology*, 4, 2008.
- [100] Benoît SEMIN, Jean-Pierre HULIN et Harold AURADOU : Influence of flow confinement on the drag force on a static cylinder. *Physics of Fluids*, 21:103604, 2009.

- [101] Edward YEH, Sharon NG, Mi ZHANG, Magali BOUHOURS, Ying WANG, Min WANG, Wesley HUNG, Kyota AOYAGI, Katya MELNIK-MARTINEZ, Michelle LI, Fang LIU, William R. SCHAFER et Mei ZHEN : A putative cation channel, NCA-1, and a novel protein, UNC-80, transmit neuronal activity in *C. elegans. PloS Biology*, 6, 2008.
- [102] Robert O'HAGAN et Martin CHALFIE : Mechanosensation in *Caenorhabditis ele*gans. International Review of Neurobiology, 69:169–203, 2006.
- [103] Miriam B. GOODMAN : *Wormbook*, chapitre Mechanosensation. The C. elegans Research Community, 2006.
- [104] Robert O'HAGAN, Martin CHALFIE et Miriam B. GOODMAN : The MEC-4 DEG/ENaC channel of *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons transduces mechanical signals. *Nature Neuroscience*, 8(1):43–50, 2005.
- [105] Sergei SUKHAREV et Andriy ANISHKIN : Mechanosensitive channels : what can we learn from simple model systems ? *Trends in neuroscience*, 27:345–351, 2004.
- [106] Dale PURVES, George J. AUGUSTINE et David FITZPATRICK : *Neurosciences*. De Boeck, Paris, Bruxelles, 2005.
- [107] Michael SHEETZ et Viola VOGEL : Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7:265–275, 2006.
- [108] Diane RONAN et Peter GILLESPIE : Metazoan mechanotransduction mystery finally solved. *Nature Neuroscience*, 8:7–8, 2005.
- [109] C. C. LAI, K. HONG, M. KINNELL, Martin CHALFIE et Monica DRISCOLL : Sequence and transmembrane topology of MEC-4, an ion channel subunit required for mechanotransduction in *Caenorhabditis elegans*. *Journal Cell Biology*, 133:1071– 1081, 1996.
- [110] Hiroshi SUZUKI, Rex KERR, Laura BIANCHI, Christian FRØKJAER-JENSEN, Dan SLONE, Jian XUE, Beate GERSTBREIN, Monica DRISCOLL et William R. SCHAFER : In vivo imaging of *C. elegans* mechanosensory neurons demonstrates a specific role for the MEC-4 channel in the process of gentle touch sensation. *Neuron*, 39:1005–1017, 2003.
- [111] Martin CHALFIE et John E. SULSTON : Developmental genetics of the mechanosensory neurons of *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 82:258–270, 1981.
- [112] Bryan C. PETZOLD, Sung-Jin PARK, Pierre PONCE, Clifton ROOZEBOOM, Chloé POWELL, Miriam B. GOODMAN et Beth L. PRUITT : *Caenorhabditis elegans* body mechanics are regulated by body wall muscle tone. *Biophysical Journal*, 100:1977– 1985, 2011.
- [113] Guy VASSORT et Jérémy FAUCONNIER : Les canaux TRP (transient receptor potential), une nouvelle famille de canaux à expression variée. *Médecine/Sciences*, 24:163–168, 2008.

- [114] Lijun KANG, Jingwei GAO, William R. SCHAFER, Zhixiong XIE et X. Z. Shawn XU: C. elegans TRP family protein TRP-4 is a pore-forming subunit of a native mechanotransduction channel. Neuron, 67:381–391, 2010.
- [115] Peter N. INGLIS, Guangshuo OU, Michel LEROUX et Jonathan M. SCHOLEY : *Wormbook*, chapitre The sensory cilia of *Caenorhabditis elegans*. The C. elegans Research Community, WormBook, 2007.
- [116] Stephen R. WICKS, Corry J. de VRIES, Henri G. A. M. can LUENEN et Ronald H. A. PLASTERK : CHE-3, a cytosolic dynein heavy chain, is required for sensory cilia structure and function in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 221:295– 307, 2000.
- [117] Arthur D. KUO: A simple model of bipedal walking predicts the preferred speedstep length relationship. *Journal of Biomechanical Engineering*, 123(264):264–269, 2001.
- [118] Cornelia I. BARGMANN : *Wormbook*, chapitre Chemosensation in *C. elegans*. The *C. elegans* Research Community, 2006.
- [119] Neil A. CROLL : Components and patterns in the behaviour of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Zoology*, 176(2):159–176, 1975.
- [120] Jesse M. GRAY, Joseph J. HILL et Cornelia I. BARGMANN : A circuite for navigation in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(9):3184–3191, 2005.
- [121] Nirmal C. SUKUL et Neil A. CROLL : Influence of potential difference and current on the electrotaxis of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Nematology*, 10:314–317, 1978.
- [122] J. ADLER et W. SHI : Galvanotaxis in bacteria. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 53:23–25, 1988.
- [123] J. A. MILLER et L. S. GOLDSTON : Galvanotropic responses of paramecia to balanced square waves. *Ohio Journal of Science*, 47(3):127–129, 1947.
- [124] Lynne J. SHANLEY, Petr WALCZYSKO, Mary BAIN, David J. MCEWAN et Min ZHAO: Influx of cellular Ca²⁺ is necessary for electrotaxis in *Dictyostelium*. Journal of Cell Science, 119:4741–4748, 2006.
- [125] Xavier MANIÈRE, Félix LEBOIS, Ivan MATIC, Benoît LADOUX, Jean-Marc DI MEGLIO et Pascal HERSEN : Running worms : C. elegans self-sorting by electrotaxis. PLoS One, 6(2), 2011.
- [126] Pouya REZAI, Asad SIDDIQUI, Ponnambalam Ravi SELVAGANAPATHY et Bhagwati P. GUPTA : Electrotaxis of *Caenorhabditis elegans* in a microfluidic environment. *Lab on a Chip*, 10:220–226, 2010.
- [127] John A. CARR, Archana PARASHAR, Richard GIBSON, Alan P. ROBERTSON, Richard J. MARTIN et Santosh PANDEY : A microfluidic platform for highsensitivity, real-time drug screening on *C. elegans* and parasitic nematodes. *Lab* on a Chip, 11:2385–2396, 2011.
- [128] Jonathan T. PIERCE-SHIMOMURA, Thomas M. MORSE et Shawn R. LOCKERY : The fundamental role of pirouettes in *Caenorhabditis elegans* chemotaxis. *Journal* of Neuroscience, 19(21):9557–9569, 1999.
- [129] Howard C. BERG : Chemotaxis in bacteria. Annual Review of Biophysics and Bioengineering, 4:119–136, 1975.
- [130] Daeyon KIM, Sungsu PARK, L. MAHADEVAN et Jennifer H. SHIN : The shallow turn of a worm. *Journal of Experimental Biology*, 214:1554–1559, 2011.
- [131] James K. HOPKINS, Brent W. SPRANKLIN et Satyandra K GUPTA : A survey of snake-inspired robot designs. *Bioinspiration and biomimetism*, 4:021001, 2009.
- [132] Bao Kha NGUYEN, Jordan H. BOYLE, Abbas A. DEHGHANI-SANIJ et Netta CO-HEN: A C. elegans-inspired micro-robot with polymeric actuators and online vision. Proceedings of the 2009 IEEE International Conference on Robotics and Biomimetics, pages 765–770, 2009.
- [133] S. Elizabeth HULME, Sergey S. SHEVKOPLYAS et Aravinthan DT SAMUEL : Microfluidics : streamlining discovery in worm biology. *Nature Methods*, 5:589–590, 2008.
- [134] Andrew M. LEIFER, Christopher FANG-YEN, Marc GERSHOW, Mark J. ALKEMA et Aravinthan DT SAMUEL : Optogenetic manipulation of neural activity in freely moving *Caenorhabditis elegans*. *Nature Methods*, 8:147–152, 2011.
- [135] H. Robert HORVITZ, Sydney BRENNER, Jonathan HODGKIN et R. K. HERMAN : A uniform genetic nomenclature for the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Molecular* and general genetics, 175:129–133, 1979.
- [136] Theresa STIERNAGLE : *Wormbook*, chapitre Maintenance of *C. elegans*. The *C. elegans* Research Community, WormBook, 2006.

ANNEXE **A** Nomenclature

A.1 Neurones

Les 302 neurones de *C. elegans* sont organisés en 118 classes sur des critères de morphologie, de fonction et suivant les synapses existantes avec d'autres neurones [33]. Une classe peut contenir un ou plusieurs neurones, et est repérée par trois lettres capitales en caractères romains (droits). Par exemple, CEP désigne la classe des neurones des sensilles céphaliques.

Lorsqu'une classe ne contient qu'un seul neurone (par exemple DVA), celui-ci est désigné par le nom de la classe. Lorsque plusieurs neurones existent au sein d'un même classe, le nom de la classe est suivi de lettres ou de nombres qui précisent l'emplacement du neurone. Par exemple, la classe de motoneurones VA inclut 12 neurones qui sont indexés en fonction de leur emplacement le long de la corde nerveuse ventrale. Le neurone VA4 est le quatrième de cette classe à partir de l'extrémité antérieure. De même, PLML désigne le neurone situé à gauche (*Left*) parmi les deux neurones que compte la classe PLM (*Posterior Lateral Microtubule cell*). Dernier exemple, CEPDL est le neurone situé sur le côté dorsal, à gauche, parmi les neurones de la classe CEP.

Une liste complète des neurones de *C. elegans*, leur désignation et leur emplacement ainsi que des informations supplémentaires peuvent être trouvées sur le site *Wormatlas* [29].

A.2 Génétique

Le phénotype est repéré par trois ou quatre lettres dont la première est une capitale. Par exemple, Unc fait référence au phénotype « uncoordinated » et Mec au phénotype « mechanosensation variant ».

Un gène est désigné par trois ou quatre lettres minsucules italiques, suivies d'un nombre [135]. Les lettres font référence au phénotype le plus communément provoqué par une mutation du gène en question, ou au produit du gène (protéine, ARN...). Le nombre permet de distinguer deux gènes dont la mutation entraînerait le même phénotype. Ainsi, *unc-79*

et *unc-24* sont deux gènes distincts correspondant au même phénotype général Unc. *trp-4* tire son nom de la protéine produite, qui participe à un canal TRP.

Chaque mutation est désignée par le nom du gène affecté, suivi d'une ou de deux lettres minuscules correspondant au nom du laboratoire où la mutation a été obtenue et d'un nombre, le tout entre parenthèses. *unc-79(e1068)* indique que ce génotype a été obtenu dans le laboratoire « e » (Laboratoire de Biologie Moléculaire du MRC à Cambridge). Une souche est désignée par deux lettres capitales désignant le laboratoire d'origine de la souche, suivies d'un nombre. Par exemple, la souche utilisée pour *unc-79(e1068)* est CB1068.

La protéine produit d'un gène reprend le nom du gène, écrit en lettres capitales. UNC-79 est le produit d'expression de *unc-79*, TRP-4 de *trp-4*.

ANNEXE B Méthodes et protocoles

B.1 Maintenance et synchronisation des souches

Toutes les souches de *C. elegans* utilisées (N2, *unc-79(e1068)*, *mec-4(e1611)*, *trp-4(sy296)*, *che-3(e1124)*) ont été obtenues auprès du *Caenorhabditis Genetics Center* (Université du Minnesota). Les vers sont cultivés dans des boîtes de Pétri sur un gel de culture recouvert d'un tapis de bactéries *E. coli* OP50 selon les procédures standard décrites dans [136]. La température de culture est fixée à 16° C.

Pour obtenir des animaux synchronisés en âge, nous avons suivi un protocole de synchronisation pour de petites populations [136]. La boîte de Pétri est rincée, puis les vers sont dissous dans une solution d'eau de Javel et de soude. Les œufs résistent au traitement, et sont rincés par plusieurs passages à la centrifugeuse puis suspendus dans du M9 et placés dans l'incubateur à 16°C. Au cours de la nuit, les œufs éclosent. En l'absence de nourriture, les larves restent bloquées au stade L1 durant plusieurs jours. 96 heures avant le début de l'expérience, 0,2 mL du liquide où sont suspendus les œufs est transféré sur une boîte de Pétri. Les individus ainsi obtenus sont de jeunes adultes [35] dont la taille est uniforme et n'est pas affectée par le temps passé au stade L1 (Fig. B.1). La procédure de synchronisation est répétée toutes les semaines. Les souches sont conservées à -80°C et décongelées tous les trois mois.

B.2 Expériences de plaquage

Préparation du gel

Une demi-heure avant le début de l'expérience, le gel d'agar est préparé comme décrit dans la Figure B.2, au-dessus du dispositif de refroidissement. La solidification du gel prend 15 min. Les plaques intermédiaires sont ensuite retirées, et le liquide (M9) est versé dans la boîte de Pétri jusqu'à immerger totalement le gel. Le dispositif de refroidissement est allumé et réglé manuellement de manière à obtenir une température de 20°C dans le liquide.



FIGURE B.1 – **Synchronisation des vers.** La taille moyenne des animaux est indiquée en fonction du temps suivant le transfert. Le transfert des vers sur boîte de Pétri a été effectué le jour suivant la procédure de synchronisation (Jour 1), le lendemain (Jour 2) et ainsi de suite jusqu'à une semaine suivant la synchronisation (Jour 8). Les données montrent que la taille de l'animal n'est pas affectée par le temps passé au stade L1 affamée.



FIGURE B.2 – **Préparation du gel.** A La plaque de verre est placée au-dessus du fond de la boîte de Pétri ; son horizontalité est vérifiée. B Deux lames de verre sont ajoutées de part et d'autre de la plaque de verre et du support et maintenues par des pinces. C Le gel est coulé entre la lame du dessous et le fond de la boîte de Pétri. D Après solidification du gel, les lames de verres sont retirées. Le gel, maintenu par des ergots, reste en place. L'ensemble est immergé dans du M9.

Variation dynamique du confinement

Lors des expériences de variation dynamique du confinement, un individu unique est rincé, puis transféré à l'aide d'un cil monté sur une pipette Pasteur dans le dispositif de plaquage. La plaque de verre est ensuite abaissée jusqu'à établir le contact (détectable à l'œil) entre le gel, le ver et la surface du verre. La plaque est alors abaissée de la hauteur désirée pour confiner le ver, puis au bout d'un temps déterminé par l'utilisateur la plaque est relevée à une vitesse réglable afin de libérer le ver entre les deux surfaces du gel et du verre. Cette séquence est automatisée par un programme écrit en LabVIEW. Puisque nous ne possédons pas les pilotes LabVIEW de la caméra utilisée, la synchronisation entre le moteur contrôlant la hauteur de la plaque de verre et la prise d'image est assurée par l'utilisation d'une diode électroluminescente dont l'allumage très bref est contrôlé par le même programme contrôlant la hauteur de la plaque (Fig. B.3). La détection de l'allumage



FIGURE B.3 – Synchronisation des images et de la variation du confinement ε . L'exemple présenté correspond à une libération soudaine du ver. Le programme, écrit en LabVIEW, contrôle la position verticale de la plaque de verre et l'allumage de la diode, ce qui permet de connaître la valeur du confinement pour chacune des images enregistrées.

de la diode lors de l'analyse du film permet de synchroniser les images avec la hauteur h(t) de la plaque.

Variation quasistatique du confinement

Les premières étapes de la procédure sont identiques à celles décrites ci-dessus. Un individu unique est rincé puis transféré dans le dispositif. Une mesure correspond à une valeur du confinement, $\varepsilon = h/D$, où h est la hauteur de la plaque de verre comptée positivement vers le bas depuis la position de référence correspondant au contact, et D le diamètre du ver. À chaque nouvelle mesure, le ver est libéré en relevant la plaque de verre et commence à nager dans le liquide. La plaque est doucement abaissée jusqu'à établir le contact, puis abaissée de nouveau jusqu'à la hauteur désirée. La hauteur de la plaque est contrôlée par l'utilisateur *via* LabVIEW. Un film de 30 à 60 s est alors acquis, puis le ver est libéré et la procédure est recommencée. Une série de mesures ne dure pas plus de 30 min, ce qui permet de faire une trentaine de films correspondant à la totalité de la gamme des confinements désirés. Avant de retirer le ver du dispositif, nous prenons une photographie du ver à la plus forte valeur du grossissement afin de déterminer son diamètre et sa longueur.

Traitement des données expérimentales

Un premier traitement des données est effectué à l'aide d'ImageJ, afin d'éliminer des films des événements tels qu'une sortie du ver du champ de la caméra ou un événement de

marche arrière, susceptibles de ne pas être correctement traités par l'algorithme d'analyse des films. Celui-ci a été écrit en Java en utilisant les fonctions de traitement des images d'ImageJ et peut-être appelé depuis ce logiciel. Il permet de traiter une série d'expériences en appliquant à chaque film la séquence d'opérations suivante (Fig. B.4) :

- projection verticale, afin de ne garder pour chaque pixel que sa valeur la plus claire au cours du film (les vers apparaissant plus sombre que le fond). On obtient ainsi l'arrière-plan;
- soustraction de l'arrière-plan, afin de ne garder que la forme du ver ;
- seuillage, pour obtenir une image binaire;
- suppression des petites particules éventuellement présentes sur l'image, pour ne garder que la forme du ver;
- succession de lissages et de seuillages, afin d'obtenir une forme régulière et éviter l'apparition de branches lors de l'étape suivante;
- réduction de la forme à une ligne continue de pixels par érosions successives grâce à la fonction *Skeletonize*;
- détection d'une des extrémités du squelette et enregistrement des coordonnées du squelette du ver, ordonnées depuis une extrémité vers l'autre, dans un fichier texte (cet algorithme a été écrit par Olivier Cardoso).

La séquence des squelettes ainsi obtenu est ensuite traitée à l'aide de GNU Octave. Le traitement suit la procédure décrite dans [89]. Pour chaque image, le squelette est ajusté par une courbe de Bézier (*cubic smoothing spline*) qui permet d'obtenir une courbe lisse et différentiable. Cette courbe est paramétrée par une abscisse curviligne *s* qui varie entre 0 et 1, de telle manière qu'à l'extrémité antérieure corresponde le point d'abscisse s = 0.

La courbure du corps en chaque point,

$$\kappa(s) \simeq \frac{\delta \theta(s)}{\delta s}$$
 (B.1)

est alors calculée en mesurant l'angle $\delta \theta(s)$ formé par deux segments successifs (Fig. 2.4), et δs , le pas élémentaire séparant deux points successifs le long de la courbe.

La donnée de la courbure de chaque point du corps en fonction du temps, $\kappa(s,t)$ est ensuite utilisée pour tracer le graphique spatio-temporel de la courbure (Fig. B.5A), ce qui permet de visualiser l'information ainsi extraite du film. La valeur de la courbure est codée par la couleur (bleue pour les courbures négatives, rouge pour les courbures positives, l'échelle de couleur n'est pas montrée), et tracée en fonction de l'abscisse curviligne et du temps. Les valeurs de la courbure pour s < 0, 1 et s > 0, 9 ne sont pas prises en compte en raison du bruit causé aux extrémités par l'algorithme de lissage et ne sont donc pas tracées.

Le programme détecte les instants où la courbure est maximale en chaque point du ver (ronds bleus sur la Fig. B.5**B**). Un filtre est utilisé afin d'éliminer les maxima et minima locaux. Les points de courbure maximale sont ensuite reliés entre eux pour retracer la progression de la courbure depuis la tête vers la queue (Fig. B.5**C**) : à partir des maxima détectés au centre du ver (s = 0, 5), les points sont reliés de proche en proche. Finalement (Fig. B.5**D**) chaque ensemble de points correspondant à la propagation d'un maximum



FIGURE B.4 – **Traitement des images.** A L'image initiale est seuillée puis réduite à une seule ligne, le squelette, à partir duquel est obtenue une courbe lisse par un algorithme de lissage (*smoothing spline*). Les deux premières étapes utilisent ImageJ et la dernière GNU Octave. B La spline reflète la forme du ver. Elle est paramétrée par une abscisse curviligne qui vaut s = 0 à la tête et s = 1 à la queue. La courbure en chaque point est alors calculée en considérant l'angle formé par deux segments élémentaires successifs.

de courbure est ajusté par une droite dont on récupère les coefficients, ce qui permet de déterminer la période du mouvement et la vitesse de propagation de l'onde, et donc la longueur d'onde du mouvement.

Les moyennes des paramètres de la locomotion pour un confinement donné par ε_0 sont effectuées sur l'ensemble des films pour lesquels la valeur de ε est comprise entre $\varepsilon_0 - 0,05$ et $\varepsilon_0 + 0,05$.



FIGURE B.5 – **Extraction des paramètres du mouvement A.** Graphique spatiotemporel de la coubure. **B** Détection des maxima de courbure (points bleus). **C** Suivi au cours du temps de la propagation des maxima de courbure (lignes brisées bleues). **D** Ajustement par une droite (lignes vertes) des ondes de courbure.



FIGURE B.6 – **Préparation du gel d'électrotaxie – schéma en coupe. A.** Le moule en téflon (1) est fermé par du ruban adhésif (2). On y dépose un couvercle en Plexiglas $\mathbb{R}(3)$ sur lequel est collée une plaque de verre (4) qui sert à obtenir les murs sur le bord du gel. **B** Coulage du gel (5) dans le moule. **C** Le gel (5) est démoulé directement sur le support (6) qui sera ensuite placé dans la cuve.

B.3 Électrotaxie

Préparation du gel et du liquide d'électrotaxie

Il est recommandé de préparer le gel et la solution en quantité suffisante avant de débuter l'expérience. Celle-ci requiert au plus 100 mL de gel et 2 L de solution. La composition du gel et de la solution sont donnés ci-dessous.

Composition du gel (pour 500mL, à autoclaver) :

Glycerol dans H20 60% (Vol.)	3 mL
NaCl 1M	0,125 mL
Bacto Agar	12,5 g
H20	500 mL

Composition du la solution (pour 1 L, il est possible de la préparer immédiatement avant l'expérience) :

Glycerol dans H20 60% (Vol.)	6 mL
NaCl 1 M	0,25 mL
H20	1 L

Le gel est coulé dans un moule parallélépipédique en téflon dont deux des faces sont fermées par du ruban adhésif. Un couvercle en plexiglas sur lequel est collée une plaque de verre propre permet d'obtenir les murs empêchant l'inondation du gel par la solution d'électrotaxie (Fig. B.6). Il est recommandé de vérifier l'horizontalité du moule avant de procéder au coulage du gel. Le gel doit être assez mince, de façon à ce que sa résistance électrique soit suffisante pour ne pas dépasser la valeur maximale de l'intensité dans la cuve lorsque le champ sera établi.

La solidification du gel prend environ une heure à 20°C. Il est préférable de le prémunir des chocs et des poussières en le plaçant par exemple sous le PSM (Poste de sécurité microbiologique). Lorsque la solidification est complète, le gel est démoulé dans le PSM, directement sur le support amovible qui sera ensuite placé dans la cuve. En pratique, le ruban adhésif est retiré du moule, puis on fait glisser le gel depuis le moule sur le support. Le gel est ensuite laissé à sécher 15 min sous le PSM pour éliminer le film d'eau qui se forme à la surface après le démoulage. Le support et le gel sont ensuite transférés dans la cuve d'électrotaxie. La cuve est ensuite remplie avec la solution, jusqu'à ce que celle-ci affleure les bords du gel.

On enclenche le système de refroidissement (cryostat et pompe). On allume le boîtier de contrôle de la tension. On lance le logiciel de contrôle de la tension et de suivi du ver (sous LabVIEW). On peut attendre quelques minutes que la température dans la cuve s'équilibre. Il est possible d'établir la tension dans la cuve une fois que le couvercle est mis en place.

Allers-retours dans un champ alterné

Pour chaque nouvelle observation d'un ver dans le champ électrique, le ver est transféré depuis la boîte de Pétri où il est cultivé dans une nouvelle boîte contenant du M9. Afin que le ver n'adhère pas au fond de la boîte, il est possible d'utiliser une boîte où l'on a coulé au préalable du gel. Au bout d'une minute environ, le ver est transféré depuis le M9 vers le gel d'électrotaxie à l'aide d'un cil ou d'un cheveu monté sur une pipette Pasteur (*eyelash*). Le couvercle est ensuite replacé au-dessus de la cuve, mettre en place les électrodes de mesure de la tension dans le gel et positionner la caméra.

À l'aide des contrôles manuels de la platine XY, trouver le ver (lors de cette étape, il vaut mieux suspendre la tension dans la cuve, ce qui limite les déplacements du ver). Quand son image apparaît à l'écran, enclencher le suivi : la platine se déplace alors automatiquement avec le ver. Ajuster éventuellement le seuillage pour que seule la forme du ver apparaisse. Rétablir la tension et enclencher le programme d'allers-retours. Lorsque l'expérience est terminée, récupérer le ver en prenant garde à ne pas abîmer la surface du gel.

Traitement des données

Le traitement des trajectoires utilise un ensemble de programmes écrits pour GNU Octave. La séquence des déplacements de la platine est segmentée en *runs* correspondant à l'intervalle de temps séparant deux inversions du champ à partir du fichier des temps d'inversion du champ. À partir des cordonnées (x(t), y(t)) de la platine, qui sont aussi celles du centre de masse du ver, on calcule la vitesse instantanée,

$$\mathbf{v}(t) = (x(t+dt) - x(t), y(t+dt) - y(t)),$$
(B.2)

dt correspondant au pas de temps séparant deux déplacement de la platine (typiquement 0, 1 s).

Les vitesses instantanées sont ensuite comparées deux à deux en effectuant leur produit scalaire,

$$p(t) = \mathbf{v}(t) \cdot \mathbf{v}(t + \mathrm{d}t). \tag{B.3}$$

Quand p(t) est négatif, on considère que le ver est passé de la marche avant à la marche arrière, ou inversement. On obtient ainsi tous les instants correspondant à une inversion du sens de propagation de l'onde de courbure.

La *phase directionnelle* est définie comme la période de marche avant la plus longue observée au cours du *run*. La *phase de réorientation* est définie comme la période comprise entre l'inversion du champ et le début de la phase directionnelle. Elle contient donc éventuellement plusieurs changements du sens de progression du ver.

La distance parcourue durant la phase directionnelle est calculée comme

$$d_{dir} = \int_{t_1}^{t_2} dt \ \sqrt{dx^2 + dy^3},$$
 (B.4)

où t_1 et t_2 sont le début et la fin de la phase directionnelle, et la vitesse moyenne vaut donc

$$v_{dir} = \frac{d_{dir}}{t_2 - t_1}.\tag{B.5}$$

ANNEXE C Modélisation

C.1 Modèle de Gray et Alexander

Ce modèle permettant d'obtenir la vitesse de progression du ver à partir des paramètres de la locomotion et des coefficients de friction normal et longitudinal est dû à James Gray [76]. La forme du ver progressant sur une surface à l'instant t est décrite par une courbe paramétrée (Fig. C.1),

$$\begin{cases} x(s,t) \\ y(s,t) \end{cases}$$

de telle sorte qu'à l'abscisse curviligne s = 0 corresponde la tête de l'animal, et à s = 1 corresponde la queue. Le ver avance dans la direction des x croissants et dérape sur le substrat. À un point d'abscisse s on associe le repère de Frenet correspondant (\mathbf{l}, \mathbf{n}) et le segment de longueur δs . Le ver est en mouvement : chaque point du corps est animé d'une vitesse $\mathbf{V}(s,t)$ dont on notera V_l la composante longitudinale, suivant \mathbf{l} , et V_n la composante normale, suivant \mathbf{n} . Cette dernière n'est pas nulle si le ver dérape, ce qui est le cas généralement.

L'environnement exerce sur le segment de longueur δs une force de friction $\delta \mathbf{F}$ qui s'oppose à son déplacement. On suppose dans la suite que les composantes longitudinale δF_l et normale δF_n de cette force sont proportionnelles aux composantes longitudinale et normale de la vitesse du segment. Il s'agit d'une approximation (*resistive force theory*), qui suppose que les seules forces s'appliquant au segment sont les forces de friction, et qui néglige la force exercée par les segments voisins comme les interaction hydrodynamiques entre segments élémentaires. La force $\delta \mathbf{F}$ s'exerçant sur un segment de longueur δs s'écrit donc

$$\delta \mathbf{F} = \left[\delta F_l \mathbf{l} + \delta F_n \mathbf{n} \right] \delta s. \tag{C.1}$$

Par construction,

$$V_l = V_x \cos \theta + V_y \sin \theta \tag{C.2}$$

$$V_n = -V_x \sin \theta + V_y \cos \theta. \tag{C.3}$$

Les composantes longitudinale et normale de la force qui s'oppose au mouvement sont



FIGURE C.1 – Description cinématique du ver progressant à deux dimensions. A Un point du ver est repéré par son abscisse curviligne *s*, variant entre 0 (tête) et 1 (queue). Sa position dans le référentiel du laboratoire est donnée par (x, y). On lui associe un segment élémentaire de longueur δs . B Décomposition de la vitesse d'un segment élémentaire (centre) et de la résultante de la force de friction (droite) sur le repère local (l, n) (gauche).

donc

$$\delta F_l = -C_l V_l \delta s \tag{C.4}$$

$$= -C_l \left[V_x \cos \theta + V_y \sin \theta \right] \delta s, \qquad (C.5)$$

et

$$\delta F_n = -C_n V_n \delta s \tag{C.6}$$

$$= C_n [V_x \sin \theta - V_y \cos \theta] \,\delta s. \tag{C.7}$$

La projection de (C.1) sur l'axe de progression donne alors

$$\delta F_x = \delta F_l \cos \theta - \delta F_n \sin \theta \tag{C.8}$$

$$= \left[\frac{-V_x \left(C_l + \tan^2 \theta C_n\right) + V_y \tan \theta \left(C_n - C_l\right)}{1 + \tan^2 \theta}\right] \delta s \qquad (C.9)$$

La courbe formée par le ver est décrite par ses coordonnées cartésiennes (x(t), y(t))dans le référentiel du laboratoire, ce qui fournit

$$V_y = \frac{\mathrm{d}y}{\mathrm{d}t} \tag{C.10}$$

et

$$\tan \theta = \tan(\theta - \pi) = \frac{\mathrm{d}y}{\mathrm{d}x}.$$
 (C.11)

Si l'amplitude des oscillations reste petite devant la longueur d'onde, alors $\theta \ll 1$. Nous suivons alors la démarche d'Alexander [80], qui consiste à négliger tan² θ devant 1, mais pas devant le rapport C_l/C_n , qui peut effectivement devenir très petit devant 1, et qui vaut 0,6 environ en milieu liquide. Au premier ordre en θ ,

$$\delta s = \frac{\delta x}{\cos \theta} = \delta x \tag{C.12}$$

et l'équation C.9, donnant la composante horizontale de la force s'exerçant sur un segment de longueur δs , s'écrit donc

$$\delta F_x = \left[-V_x \left(C_l + \tan^2 \theta C_n\right) + V_y \tan \theta \left(C_n - C_l\right)\right] \delta x.$$
 (C.13)

Dans l'hypothèse où le ver avance à vitesse V_x constante, aucune force ne s'exerce sur le ver. En particulier, la résultante horizontale des forces de friction agissant sur une portion du ver correspondant à une longueur d'onde est nulle,

$$\int_{x=0}^{x=\lambda} \delta F_x = 0. \tag{C.14}$$

Si la forme du ver peut être décrite par une onde sinusoïdale se propageant vers la gauche,

$$y(x,t) = A\sin(qx + \omega t), \qquad (C.15)$$

de nombre d'onde $q = 2\pi/\lambda$ et de pulsation $\omega = 2\pi/T$, alors

$$V_y = A\omega \cos(qx + \omega t)$$
(C.16)
$$\tan \theta = Aq \cos(qx + \omega t),$$
(C.17)

et l'équation (C.14) se réécrit

$$\int_{x=0}^{x=\lambda} \delta x \left[-V_x \left(C_l + C_n A^2 q^2 \cos^2(qx + \omega t) \right) + \omega A^2 q \cos^2(qx + \omega t) (C_n - C_l) \right] = 0. \quad (C.18)$$

Le calcul de l'intégrale donne, en définissant la vitesse de propagation de l'onde comme $V_w = \omega/q$ ou encore $V_w = \lambda/T$,

$$\frac{V_x}{V_w} = \frac{1 - C_l / C_n}{1 + \frac{2}{A^2 q^2} (C_l / C_n)}.$$
(C.19)



FIGURE C.2 – Deux descriptions équivalentes de la forme du ver. A Description de Gray. La forme du ver est décrite par une fonction sinusoïdale du type $y = A \sin(2\pi x/\lambda)$, d'amplitude A et de période spatiale λ . B Description par la donnée de la courbure maximale, κ_{max} , et de la longueur d'arc séparant deux maxima de courbure, λ_C . La vitesse mesurée lors de l'analyse d'images, V_w , est la vitesse de propagation des ondes de courbure le long du corps, et vaut donc $V_w = \lambda/T$ si T est la période du mouvement.

C.2 Équivalence des descriptions par (x(s,t), y(s,t)) et $\kappa(s,t)$

Supposons que la forme du ver à l'instant *t* peut être, moyennant un éventuel changement de repère, décrite par une sinusoïde

$$y(x) = A\sin(qx) \tag{C.20}$$

La courbure en tout point s'écrit

$$\kappa(x) = \frac{\frac{\mathrm{d}^2 y}{\mathrm{d}x^2}}{\left(1 + \left(\frac{\mathrm{d}y}{\mathrm{d}x}\right)^2\right)^{3/2}}$$
(C.21)

$$= \frac{-Aq^2 \sin(qx)}{(1+A^2q^2 \cos^2(qx))^{3/2}}$$
(C.22)

Le maximum est atteint, par exemple, pour $qx = 3\pi/2$

$$\kappa_{max} = \frac{Aq^2}{\left(1 + A^2 q^2\right)^{3/2}}$$
(C.23)

La longueur d'arc entre deux maxima de courbure est donnée par

$$\lambda_C = 4 \int_0^{\lambda/4} \sqrt{1 + \left(\frac{\mathrm{d}y}{\mathrm{d}x}\right)^2} \,\mathrm{d}x \tag{C.24}$$

En posant

$$B = Aq \tag{C.25}$$

et

$$u = \sin\left(qx\right) \tag{C.26}$$

on obtient

$$\lambda_C = \frac{2\lambda\sqrt{1+B^2}}{\pi} \int_0^1 \left(1-u^2\right)^{-1/2} \left(1-\frac{B^2}{1+B^2}u^2\right)^{1/2} du \qquad (C.27)$$

On reconnaît une intégrale elliptique de seconde espèce. Courbure maximale et longueur d'arc entre deux maxima de courbure se déduisent donc de l'amplitude et de la longueur d'onde par les relations

$$\kappa_{max} = \frac{B^2}{A(1+B^2)^{3/2}}$$
 (C.28)

$$\lambda_C = \frac{2\lambda\sqrt{1+B^2}}{\pi}E\left(\frac{B^2}{1+B^2}\right) \tag{C.29}$$

où *E* désigne l'intégrale elliptique complète de seconde espèce. Si *B* est petit devant 1 $(A \ll \lambda)$,

$$\kappa_{max} = \frac{B^2}{A} \tag{C.30}$$

$$\lambda_C = \lambda. \tag{C.31}$$

ANNEXE D Articles

Running worms : C. elegans self-sorting by electrotaxis

Xavier MANIÈRE, Félix LEBOIS, Ivan MATIC, Benoît LADOUX, Jean-Marc DI MEGLIO et Pascal HERSEN *PLoS One*, 6 :e16637, 2011.

Locomotion control of Caenorhabditis elegans through confinement

Félix LEBOIS, Pascal SAUVAGE, Charlotte PY, Olivier CARDOSO, Benoît LADOUX, Pascal HERSEN et Jean-Marc DI MEGLIO Soumis à *Biophysical Journal*, 2012.

Running Worms: C. elegans Self-Sorting by Electrotaxis

Xavier Manière¹, Félix Lebois², Ivan Matic¹, Benoit Ladoux², Jean-Marc Di Meglio², Pascal Hersen²*

1 Laboratoire TaMaRa, U1001 Université Paris Descartes and INSERM, Paris, France, 2 Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, UMR7057 Université Paris Diderot and CNRS, Bâtiment Condorcet, Paris, France

Abstract

The nematode *C. elegans* displays complex dynamical behaviors that are commonly used to identify relevant phenotypes. Although its maintenance is straightforward, sorting large populations of worms when looking for a behavioral phenotype is difficult, time consuming and hardly quantitative when done manually. Interestingly, when submitted to a moderate electric field, worms move steadily along straight trajectories. Here, we report an inexpensive method to measure worms crawling velocities and sort them within a few minutes by taking advantage of their electrotactic skills. This method allows to quantitatively measure the effect of mutations and aging on worm's crawling velocity. We also show that worms with different locomotory phenotypes can be spatially sorted, fast worms traveling away from slow ones. Group of nematodes with comparable locomotory fitness could then be isolated for further analysis. *C. elegans* is a growing model for neurodegenerative diseases and using electrotaxis for self-sorting can improve the high-throughput search of therapeutic bio-molecules.

Citation: Manière X, Lebois F, Matic I, Ladoux B, Di Meglio J-M, et al. (2011) Running Worms: C. elegans Self-Sorting by Electrotaxis. PLoS ONE 6(2): e16637. doi:10.1371/journal.pone.0016637

Editor: Pankaj Kapahi, Buck Institute for Age Research, United States of America

Received September 20, 2010; Accepted January 6, 2011; Published February 4, 2011

Copyright: © 2011 Manière et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Some nematode strains used in this work were provided by the Caenorhabditis Genetics Center, which is funded by the NIH National Center for Research Resources (NCRR). X.M. is supported by a PhD fellowship from the Laboratoire Servier. The ANR program is gratefully acknowledged for its financial support (ANR-06-BLAN-0406/AGING to I.M. and ANR JCh-DiSiP to P.H.). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: pascal.hersen@univ-paris-diderot.fr

Introduction

The nematode Caenorhabditis elegans [1] is routinely used as a model organism to investigate key biological processes including aging [2-4], functioning of the neural system [5], and muscle degeneration [6] to cite but a few. Its genetic and phenotypic traits are extremely well documented [1]. Moreover, a comprehensive library of mutants is available [7] and powerful tools, such as RNAi, allow manipulation of gene expression. The locomotion abilities and the dynamical behaviors of worms provide important displays of their phenotype/genotype and can thus be used as powerful proxies for quantitative analysis. For instance, multiple drugs - e.g. those affecting synaptic transporters such as serotonin [8] - and chemicals - e.g. those involved in chemotaxis [9] - are known to affect the behavior of worms. Morphological abnormalities - e.g. long, dumpy or roller mutants - and neural deficiency - e.g. uncoordinated mutants - also correlate with a more or less severely impaired locomotion [1,5]. In practice, screening for a phenotype of interest, such as abnormal locomotion, is done by visual scoring followed by manual selection. For example, behavioral classes of motility are still the standard way to evaluate the locomotor abilities of C. elegans. This is time consuming and hardly quantitative.

Several image-based tracking softwares have been developed to automatically extract locomotion properties of freely crawling worms [10–13]. However, freely moving worms have highly unsteady kinematics – worms typically switch between active foraging and resting periods – and their trajectories are complex, rendering a quantitative description difficult. Moreover, the number of analyzed worms cannot be too large to allow for unambiguous worm identification. Other devices, such as worm sorters, are dedicated to high-throughput screening. They are expensive and sort worms only according to a static phenotype (*e.g.* their shape or the expression level of a reporter gene). Recently, an *in vivo* high-throughput microfluidic worm sorter was designed by Rohde *et al.* [14]. Worms were sequentially immobilized one at a time thanks to a pressure controlled valve, analyzed by fluorescence microscopy, released and dispatched to the appropriate exit. Although such a worm sorter is an excellent strategy for high-throughput screening, it requires a high degree of expertise and is, unfortunately, not applicable to analyze locomotion patterns since it deals with mechanically immobilized worms. In this article, we describe an elementary method that combines a direct measurement of the velocity of single worms and the ability to sort multiple worms according to their locomotory skills.

Results

Our method is based on the electrotactic ability of *C. elegans* [15,16]. As first evidenced by Sukul *et al.* [15], *C. elegans* can detect the presence of an electric field. If this field is larger than typically 3 V/cm [16] worms move steadily in the direction of decreasing potentials (Fig. 1 and Fig. 2). Gabel *et al.* evidenced that mutations such as *che-13* and *che-2* and laser ablation that disrupt the functions of amphid sensory neurons also disrupt electrotaxis. Yet, *C. elegans* electro-sensory navigation is still not well understood. Nevertheless, such a robust behavior opens the possibility to sort population of worms. Here, we combined a classic DNA-electrophoresis box (see Fig. 1 and Methods) with a LED ring, for proper illumination, and a video camera to create an inexpensive worm-sorter platform. In a typical experiment, one or several worms are transferred on an agar



Figure 1. Experimental setup. (A) The setup combines a classic electrophoresis box (~20 cm long) with a video camera and a LED ring to record images of nematodes moving at the surface of an agar gel. The gel is flat and has walls (in grey) to prevent buffer inflow in the electrotaxis area. (B) Velocity distribution during an electrotactic event and evolution with time of the velocity and the orientation of the trajectory of a single worm performing electrotaxis. This shows that during electrotaxis, a single worm moves steadily in a relatively constant direction. (C) The corresponding trajectory is relatively straight and has an angle θ of 15° with the electric field orientation. The characteristic sinusoidal shape of the nematode crawling gait can be observed, indicating that the worm is moving by generating a rearward flexural wave on its body. doi:10.1371/journal.pone.0016637.g001

gel placed in the electrophoresis chamber which is filled with an electrophoresis buffer. The agar pad is typically ten centimeters long, flat and has walls to prevent buffer inflow. As we will discuss next, this elementary setup was sufficient to get reproducible electrotactic runs.

Quantitative electrotaxis

Figure 2 shows how a group of wild-type worms (N2 strain) spread over the gel surface in function of time with or without an electric stimulation. In absence of applied electric field, worms displayed complex locomotion patterns with reorientations, "omega" bends, reversals, backward motions and pauses. As shown on Figure 2, the resulting trajectories were not oriented (Fig. 2A). Worms only slowly invaded the surface of the agar gel (Fig. 2B), with no preferred movement orientations (Fig. 2C). This can also be seen on the histograms of the components of the velocity perpendicular, v_{\perp} , and parallel, $v_{\ell\ell}$, to the long axis of the elelectrophoresis chamber, which were found to be centred on 0 (Fig. 2D). In contrast, during an electrotactic run, a wild-type worm moved steadily in a well defined direction (Fig. 1B, 1C and Fig. 2; Movie S1). This is the signature of directed locomotion: there were very few events of slow, hesitating forward or backward motion. Repeating this experiment with several worms (>100) showed that all young adult worms were responsive to a difference of potential of 120 V applied to the electrophoresis box. They displayed straight trajectories oriented in average along the electric field direction (Fig. 1, Fig. 2A and 2C). For a given worm, the trajectory orientation remained surprisingly constant on the entire length of the gel (5 cm \sim 50 times a young adult worm length) (Fig. 1 and Fig. 2C). Accordingly, the histogram of v_{\perp} was centered on 0, while the histogram of the velocity component parallel to the electric field direction, v//, was shifted towards positive velocity, with an average value of 140 µm/s in good

agreement with previously reported measurements [10] (Fig. 2D). Only on rare occasions, worms got confused and operated an omega loop before resuming their motion (Movie S2). Increasing the difference of potential from 100 V to 250 V did not affect the worms speed. This means that worms are forced to move by the presence of an electric field but not moved by it, as DNA is by electrophoresis. When suddenly reversing the electric field intensity, worms display a typical omega loop (Movie S3) before they resume their trajectory, evidencing that worms are indeed sensing the existence of an electric field an adjusting its locomotion to it. However, as observed by Gabel et al. [16], the trajectories were inclined with respect to the electric field orientation. They reported that the larger the electric field, the larger the angle between the trajectory and the electric field orientation. In our setup, working with 120 V ensured almost parallel trajectories (Fig. 2C). Therefore, electrotaxis appears as an efficient way to quantitatively measure a worm (forced) velocity within a few minutes and a priori in a much more reproducible way than what can be achieved by observation of freely moving worms. Performing electrotactic runs with 2 or more worms should allow discriminating between slow and fast worms. Therefore, using such a simple electrotaxis apparatus gives an efficient way to serial sort worms based on their locomotor fitness.

In the following, we explore and validate this approach on three biologically relevant examples: (1) the quantitative comparison between wild-type and mutants displaying altered locomotion (Fig. 3, Fig. 4), (2) the effects of aging on the locomotory rate of worms (Fig. 3) and (3) the actual separation of a mix of two worm strains (Fig. 4, Fig. 5). We then discuss the potential of this method.

Wild-type vs slow worms

C. elegans body wall muscles have two functional acetylcholine receptors activated by levamisole and nicotine respectively. UNC-



Figure 2. Electrotaxis and directed locomotion. (A) Trajectories obtained from several distinct experiments done with 10–15 worms are displayed on the same graph. Directed locomotion by electrotaxis (orange, N = 130) is observed for a difference of potential of 120 V, while without any electric field, trajectories are randomly oriented (blue, N = 146). (B) From those trajectories, one can extract a spatio-temporal diagram of the density of nematode (graded in orange or blue intensity) at the surface of the gel. Electrotaxis leads to a directed spreading at the surface of the gel. Note that even in a synchronized population of worms there is a large variability in velocity. (C) Orientations of the trajectory are mostly parallel to the electric field (orange), though they vary from one worm to another. It is not known yet how the electrotaxis orientation is set by worms without electrotaxis, trajectories do not exhibit any preferred orientation (blue). (D) The histograms of parallel and perpendicular velocity with (orange, $v_{//} = 140\pm90 \mu m/s$) or without (blue, $v_{//} = 1\pm70 \mu m/s$) an electric field. The measured velocities may depend on environmental conditions such as the presence of nutrients. This is why worms were systematically rinsed in M9 buffer before their transfer. Similarly, the poro-elastic properties and humidity of the agar gel can affect the worms velocity. It is therefore recommended to run a control with wild-type worms to set a reference speed.

doi:10.1371/journal.pone.0016637.g002

29 is a subunit of the levamisole sensitive receptor [17,18] and ACR-16 is a subunit of the nicotine sensitive receptor [19]. Both *unc-29* and *unc-29;acr-16* mutants have been shown to move at a slower rate with uncoordinated phenotype, the double mutant being less active [19]. However, it is difficult to quantitatively measure the velocity of such phenotypes because they only move occasionally. We conducted several electrotaxis runs on wild-type *C. elegans*, the single mutants *unc-29* and *acr-16*, and the double mutant *unc-29;acr-16*. All mutant strains were reactive to the presence of an electric field. They showed a directed locomotion allowing us to measure their velocity precisely. Wild-type worms were the fastest worms ($v_{1/2} = 110 \ \mu m/s$), followed by *acr-16*

 $(v_{1/2} = 80 \ \mu\text{m/s})$, unc-29 $(v_{1/2} = 35 \ \mu\text{m/s})$ and finally unc-29;acr-16 mutants $(v_{1/2} = 15 \ \mu\text{m/s})$. This simple experiment confirms that the double mutant has a much more pronounced phenotype, in good agreement with the fact that unc-29 and acr-16 mutations impair both acetylcholine receptors. Moreover, we were able to discriminate between acr-16, unc-29 and wild-type worms on the sole base of their velocities difference.

Quantitative influence of aging on locomotion

Locomotion has been proposed as a qualitative way to score for aging [20,21]. The worm electro-tactic abilities relationship with age has not been studied in details yet, but a recent experiment



Figure 3. Comparative analysis of mutant worms and chronological aging effects on forced locomotory abilities. (A) *acr-16* ($v_{1/2}$ =80 µm/s±40 µm/s, N=28), *unc-29* ($v_{1/2}$ =35 µm/s±34 µm/s, N=26) and *unc-29;acr-16* mutants ($v_{1/2}$ =15 µm/s±19 µm/s, N=22) exhibit reduced velocity when compared to the control population (N2, $v_{1/2}$ =110 µm/s±50 µm/s, N=28) in successive electrotactic runs. Errors are computed as standard deviations. (B) Velocity histograms for aging populations (cf. D). (C) The histograms of $v_{1/2}$ for mutant worms are significantly different (p<0.05, Fisher test). (D) Populations of worms show a decrease of the average velocity as they get older, from the 1st day (D1) to the 8th day (D8). Here, the average parallel velocity at Day 1, $<v_{D1}$ > =120 µm/s is taken as a reference. Number of worms: D1/N=17; D3/N=15; D7/N=6. The normalized average velocity is indicated by a vertical line on the histograms (B, C). doi:10.1371/journal.pone.0016637.g003

suggested that all larvae stages and young adult worms were responsive to an electric field [22]. Here, we subjected worms of increasing ages, from young adult at day 1 (*DI*) to older worms at day 8 (*D8*), to electrotaxis trials. Worms of all ages were responsive and run directionally, although older worms tend to follow less straight trajectories. The average worm velocity decreased with age by 70% between day 1 and day 7 (Fig. 3). Hence, directed locomotion by electrotaxis gives a quantitative, user-independent indicator of physiological aging. An interesting follow-up, would be to test whether this physiological aging is related to lifespan and how it correlates with aging-related muscle degeneration.

The two previous examples evidence how electrotaxis can be used to perform quantitative measurements of single worm velocity. Such measurements can then be used to identify a given phenotype or to get a quantitative estimate of a worm physiological state. Although it is a quantitative method, it remains time consuming to perform such experiments using one worm at a time. An alternative approach is to force many worms to race against each other.

Worms self-sorting

If all worms do not move at the exact same speed, the population will spread on the gel, creating a phenotypical gradient from slow to fast worms (Fig. 4a). In other words, electrotaxis could be used to spatially sort worms according to their velocity, very much like DNA is sorted by molecular weight during electrophoresis. Sorted population of worms can be recovered after the trial by selecting worms at a given distance from the original starting point. As a proof of concept, we tested this method on a population mix of wild-type worms and dbl-1 mutants (Movie S4). DBL-1 is the TGF-β-related ligand for the Sma/Mab pathway [22]. Loss of DBL-1 activity results in smaller animals which makes them easy to distinguish from wild-type animals. Interestingly those worms turned out to be slower than wild-type worms. Figure 4b shows the number of wild-type and *dbl-1* worms at different time and position along the gel. All worms that have traveled at least 4 cm after 8 min were wild-type worms, thus demonstrating in practice the efficiency of self sorting by electrotaxis. We therefore achieve to sort the initially mixed population. Since population separation is the result of differential locomotory rate between the worms, the variability of velocities within a population can affect the sorting process. We checked numerically that indeed the sorting efficiency is decreased by increasing the velocity variability between worms of the same population as shown in figures 5a and 5b. Finally, to try realistic velocities distribution, we used our experimental data on mutants (reported on Fig. 3) and analyzed how a 50/50 mix of two



Figure 4. Population sorting I. (A) Principle of population sorting. (B) Sorting in action. We conducted a sorting experiment with a mix of 15 wild-type and 15 *dbl-1* worms. The number of wild-type worms (orange) and *dbl-1* mutant worms (blue) are shown as a function of time and space. We divided the observed area into 5 slices of equal size and computed the number of worms of each strain at different time points (every 2 minutes). Progressively, the wild-type worms separate from the initial mix. The final strip contains only wild-type worms, while, the 2nd and 3rd stripes contain only *dbl-1* mutant. The experiment was repeated three times. See also Movie S4. doi:10.1371/journal.pone.0016637.q004

populations of such worms would self-sort. We computed the relative enrichment in fast worms (wild-type) as a function of the distance at which worms would be captured after a given fixed time (Fig. 5c–f). In every case, populations were quickly enriched into the fastest worm (wild-type, WT).

Discussion

Taken together, our experiments show that electrotaxis can be used to quantitatively measure the speed of single worms and to sort a population based on its worms' velocities within only a few minutes. Physical sorting only depends on the distance worms are able to crawl in a given amount of time. Whereas, it is possible to design complex electrotaxis setup [16,23], we shall insist that a simple, commercial electrophoresis system is sufficient to physically sort the faster worms from a population. A vision system placed above the electrophoresis box is only needed to get quantitative measurements.

A recent study proposed a micro-fluidic approach to sort worms by electrotaxis according to their swimming speed differences [23]. Although this approach was interesting it suffered from two intrinsic limitations: (i) the difficulty to use it with a very large number of worms – high throughput micro-fluidics are highly demanding – and (ii) its small dimensions, since it is always more efficient – and easier – to use a large device for sorting. Indeed, the spatial resolution increases with the length on which worms are allowed to run. Finally, it is important to note that catching the worms back from the micro-fluidic channel was an apparently

unsolved challenge. Our elementary method overpasses those limitations. In particular, using a macroscopic electrophoresis setup increases the resolution of the sorting process. The sorting resolution is limited by the size of the electrotaxis gel and by the number of worms. As a matter of fact, two (populations of) worms with well defined velocity (Fig. 5a) are separable if the length of the gel is longer than $\delta v_{max}/\Delta v$, where Δv is the relative difference of their average speed, $v_{\rm max}$ the velocity of the fastest worm and δ the typical size on which worms are captured afterwards. With δ = 1 cm, v_{max} = 150 μ m/s and a gel of 10 cm, the speed resolution is $\Delta v = 15 \,\mu$ m/s, which is smaller than the velocity standard deviation within a population. However, the effective resolution is lowered by the variability of velocities within a population (Fig. 5a,b). If the two populations are not well separated after one run, isolating a sub-population and performing another electrotaxis race will allow further separation of this subpopulation. Iterating this process will increase the degree of sorting of the sub-population and remove almost all the slow worms (mutants) after a few trials. This method allows increasing the resolution but at the expense of decreasing the number of worms that can be sorted and collected. Since even isogenic population exhibits a rather large variability of their navigation velocity, this method could be used to prepare population samples with well defined locomotion abilities and presumably similar physiological state. Uncoordinated worms or worms defective in sensing the field should also be separable from wild-type worms since they will remain near the starting area.

We demonstrated here the practical potential of our method in separating a large number of worms to select for the desired phenotype as long as it is related to locomotion, which is very quite often the case for nematodes [1]. It may be efficiently combined with a worm sorter, transcriptomics, RNAi, or biochemical analysis, to correlate the physiological state of the worms with the expression level of specific genes. We also showed how gelelectrotaxis assay can be used to get quantitative data of the dynamical behavior of worms within a few minutes only. *C. elegans* is a growing model for neurodegenerative diseases and diseases linked with muscle degeneration. These dysfunctions affect locomotory behavior. We anticipate that gel-electrotaxis serial sorting combined with high-throughput screening of bioactive molecules could help to find innovative therapeutic strategies to these diseases.

Methods

Strains

We used wild-type strain (N2), *dbl-1* mutants and the mutants *acr-16(ok789)*, *unc-29(x29)*, *unc-29(x29)*; *acr-16(ok789)* obtained from the laboratory of J.-L. Bessereau (ENS, INSERM U 789). *C. elegans* worms were developed at 15°C and then at 25°C during adulthood. They grew on NGM plates seeded with *E. coli* OP50.

Electrotaxis assay

In each experiment approximately 10–15 worms were selected from a cultivation plate of a synchronized population of adults and rinsed with M9 buffer solution. They were then transferred on an agar gel in a drop of M9. The agar gel was composed of: deionized water, 2% of Bacto-Agar, glycerol (3.7 mL of glycerol 60% for 1 L), NaCl (0.250 mmol/L) as previously described in [16]. The gel was cast by pouring a first layer of agar and adding a PDMS (polydimethylsiloxane) block onto it so that it will shape the future cavity where nematodes will crawl (6×8 cm). A second layer of gel was then poured around the PDMS block. Once solidified the PDMS block was removed. The resulting agar pad was then



Figure 5. Population sorting II. (A) We numerically computed the histograms of the distance traveled by a fictitious population of 1000 worms assuming a Gaussian velocity distribution for each worm with an average parallel velocity given by $v_0(1+gnoise(\mu))$ and a standard deviation of 50 μ m/s. The resulting population has 1000 worms with normally distributed averaged velocity and displays larger intra-population variability for larger μ . We then compared two populations with different v_0 , Wild-type worms (orange) are moving at $\langle v^+ \rangle = 200 \ \mu$ m/s and slow worms (blue) are moving at $\langle v^- \rangle = 100 \ \mu$ m/s. (B) The same principle allows to compute the proportion of wild-type worms ($v = 200 \ \mu$ m/s) in the collect area ($24 \ cm$ from start) as a function of the ratio of the average velocity of the two populations. As expected, population with similar dynamics and intra population variability of velocities (larger μ) decrease the sorting efficiency. (C) Using the experimental data displayed on Fig. 3 we computed the distribution of worms position at time $\tau = 100s$. Calling $f_1(x)$ and $f_2(x)$ the two position distributions, the fraction of population 1 over population 2 as

a function of the distance traveled is given by q(d) =

 $f_2(x)dx$. When starting from a fictitious 50% mix of wild-

type and any of the mutant strains *acr-16*, *unc-29* or *unc-29;acr-16* (see text), the sub-population is quickly enriched in wild-type worms (faster worms) as the distance of capture increases. Ideally, capturing worms as far as possible from the starting point ensure a perfect sorting. (D,E,F) However, since not all worms move at their maximum velocity during electrotaxis, there is a tradeoff between the degree of separation and the total number of worms that can be captured. Population densities decrease with the distance to start. doi:10.1371/journal.pone.0016637.g005

 $f_1(x)dx +$

 $f_1(x)dx$

placed in an electrophoresis box filled with a buffer. It was composed of de-ionized water, glycerol (3.7 mL of glycerol 60% for 1 L) and NaCl (0.250 mmol/L) as previously described in [16]. We used a PS305 electrophoresis power supply (APELEX, France) and the Wide Mini-Subtm Cell electrophoresis box (Biorad, USA).

Image analysis

Experiments were imaged with a 6.6 Mpixels CMOS monochrome camera (Pixelink) with a close focus zoom lens 10X (13×130 mm FL, Edmund Optics Ltd, UK). We used a white, bright field/dark field ring light (Edmund Optics Ltd), to enhance the contrast. Since the worm trajectories are ideally straight, image analysis was straightforward. Trajectories of worms were computed from images by using successively ImageJ http:// rsbweb.nih.gov/ij/[24] and its *analyze particles* plug-in to detect worms position at every time step (1 frame per second), the GNU Octave software (http://www.gnu.org/software/octave/) and finally Igor Pro (Wavemetrics, USA) to construct trajectories, perform data manipulation and compute statistical tests. Velocities were computed by averaging the displacement of the center of mass of nematodes over 10 frames (10 s).

Numerical analysis

The histograms and enrichment proportion displayed in Figure 5a and 5b were numerically computed. We computed

the evolution with time of the position of 1000, worms assuming that every worm has a speed set by a Gaussian distribution with a standard deviation of 50 μ m/s (Fig. 4c and 4d). Positions were updated every second during 240 s. To increase the variability of the total population, we allowed the average velocity of single worms, v_s, to vary from one worm to another by adding a Gaussian noise: v_s = v₀(1+g(μ)), where g is a function that returns a random value from a Gaussian distribution of standard deviation μ . The resulting population has1000 worms, with normally distributed averaged velocity and display larger variability for larger μ .

Supporting Information

Movie S1 Worms performing electrotaxis. Worms randomly placed at the surface of an agar gel are able to sense the presence of an electric field. They crawl with straight trajectories, punctuated by collisions, reversals and other rare navigation behaviors. This figure displays the trajectories of 14 worms during a short electrotactic run. Red circles indicate the worms' starting positions. (WMV)

Movie S2 Reorientation during electrotaxis. Worms sometimes display a reorientation behavior, with omega-like reversal before

resuming their trajectory. On this specific example, it takes a few seconds for the worm to reorient itself. Such behavior occurs rarely in the presence of an electric field.

 $\left(WMV \right)$

Movie S3 Sudden reversal of the electric field. Just after a sudden decrease of the electric field, worm abruptly stop its motion, and makes a few omegas reversals. When the electric field is reversed, worms move also in a reversed direction. The worm has been colored in red, green or blue to illustrate the different phase of its adaptation to an electric field reversal. The scale is given by the size of the worm (typically 1 mm) and there are 10 seconds between each picture. This suggests that variable electric field (in time and direction) could also be used to serial sort population of worms based on their electrotactic dynamics. (WMV)

Movie S4 Worms sorting: proof of concept. This movie illustrates the separation of a population composed of a mix of

References

- Wormbook. The C. elegans research community, WormBook, doi/10.1895/ wormbook.1.130.1, http://www.wormbook.org.
- Johnson TE, Wood WB (1982) Genetic analysis of life-span in *Caenorhabditis* elegans. Proc Natl Acad Sci USA 79: 6603–6607.
- Augustin H, Partridge L (2009) Biochimica et Biophysica Acta 1790: 1084–1094.
 Herndon LA, Schmeissner PJ, Dudaronek JM, Brown PA, Listner KM, et al. (2002) Stochastic and genetic factors influence tissue specific decline in ageing C.
- elegans. Nature 419: 808–814.
 5. Gray JM, Hill JJ, Bargmann CI (2005) A circuit for navigation in *Caenorhabditis*
- elegans. Proc Natl Acad Sci USA 102: 3184–3191.
 6. Gieseler K, Grisoni K, Mariol MC, Ségalat L (2002) Overexpression of dystrobrevin delays locomotion defects and muscle degeneration in a dystrophindeficient *Caenorhabditis elegans*. Neuromuscul Disord 12: 371–377.
- Caenorhabditis Genetics Center, http://www.cbs.umn.edu/CGC/strains/ acknowledge.html.
- Horvitz HR, Chalfie M, Trent C, Sulston JE, Evans PD (1982) Serotonin and octopamine in the nematode. Science 216: 1012–1014.
- octopamine in the nematode. Science 216: 1012–1014.
 Saeki S, Yamamoto M, Jino Y (2001) Plasticity of chemotaxis revealed by paired presentation of a chemoattractant and starvation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. J Exp Biol 204: 1757–1764.
- Ramot D, Johnson BE, Berry TL, Carnell L, Goodman MB (2008) The parallel worm tracker: a platform for measuring average speed and drug-induced paralysis in nematodes. PLoS ONE 3: e2208.
- Cronin CJ, Mendel JE, Mukhtar S, Kim YM, Stirbl RC, Cronin CJ, et al. (2005) An automated system for measuring parameters of nematode sinusoidal movement. BMC Genetics 6: 5.
- Burns AR, Kwok TCY, Howard A, Houston E, Johanson K, et al. (2006) Highthroughput screening of small molecules for bioactivity and target identification in *Caenorhabditis elegans*. Nature Protocols 1: 1906–1914.
- Hsua AL, Feng Z, Hsieh MY, Shawn Xua XZ (2009) Identification by machine vision of the rate of motor activity decline as a lifespan predictor in *C. elegans*. Neurobiology of Aging 30: 1498–1503.

15 wild-type worms and 15 *dbl-1* mutants which are smaller and slower (see also Fig. 4b) than wild-type. Wild-type worms (larger ones) are faster and progressively separate away from the *dbl-1* mutants. The field of view is typically 5 cm long and the movie lasts for \sim 4 minutes. (WMV)

Acknowledgments

We thank J.-L. Bessereau for providing us with *acr-16(ok789)*, *unc-29(x29)*, *unc-29(x29)*, *acr-16(ok789)* strains. The authors thank Ariel Lindner for critical reading of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PH. Performed the experiments: XM. Analyzed the data: FL PH. Contributed reagents/materials/analysis tools: FL. Wrote the paper: XM FL IM BL JMDM PH. Contributed numerical codes for image analysis: FL.

- Rohde CB, Zeng F, Gonzalez-Rubio R, Angel M, Yanik MF (2007) Microfluidic system for on-chip high-throughput whole-animal sorting and screening at subcellular resolution. Proc Natl Acad Sci USA 104: 13891–13895.
- Sukul NC, Croll NA (1978) Influence of potential difference and current on the electrotaxis of *Caenorhaditis elegans*. J Nematol 10: 314–317.
- Gabel CV, Gabel H, Pavlichin D, Kao A, Clark DA, et al. (2007) Neural circuits mediate electrosensory behavior in *Caenorhabditis elegans*. J Neurosci 27: 7586–96.
- Richmond JE, Jorgensen EM (1999) One GABA and two acetylcholine receptors function at the *C. elegans* neuromuscular junction. Nat Neurosci 2: 791–797.
- Fleming JT, Squire MD, Barnes TM, Tornoe C, Matsuda K, et al. (1997) Caenorhabditis elegans levamisole resistance genes lev-1, unc-29, and unc-38 encode functional nicotinic acetylcholine receptor subunits. J Neurosci 17: 5843–5857.
- Francis MM, Evans SP, Jensen M, Madsen DM, Mancuso J, et al. (2005) The Ror receptor tyrosine kinase CAM-1 is required for ACR-16-mediated synaptic transmission at the *C. elegans* neuromuscular junction. Neuron 46: 581–94.
- Duhon SA, Johnson TE (1995) Movement as an index of vitality: comparing wild-type and the age-1 mutant of *Caenorhabditis elegans*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 50A: B254–B261.
- Hosono R, Sato Y, Aizawa S-I, Mitsui Y (1980) Age-dependent changes in mobility and separation of the nematode *Caenorhabditis Elegans*. Exp Geront 15: 285–289.
- Suzuki Y, Morris GA, Han M, Wood WB (2002) A cuticle collagen encoded by the lon-3 gene may be a target of TGF-beta signaling in determining *Caenorhabditis elegans* body shape. Genetics 162: 1631–1639.
- Rezai P, Siddiqui A, Selvaganapathy PR, Gupta BP (2010) Electrotaxis of Caenorhabditis elegans in a microfluidic environment. Lab On a Chip 10: 220–226.
- Rasband WS, Image J U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://rsb.info.nih.gov/ij/, 1997–2009.

DLoS ONE | www.plosone.org

Locomotion control of *Caenorhabditis elegans* through confinement

Félix Lebois¹, Pascal Sauvage¹, Charlotte Py¹, Olivier Cardoso¹, Benoît Ladoux^{1,2}, Pascal Hersen^{1,2}, Jean-Marc Di Meglio^{1*}

¹Matière et Systèmes Complexes UMR 7057 CNRS and University Paris Diderot 75013 Paris, France

> ²Mechanobiology Institute, Singapore National University of Singapore T-Lab, 5A Engineering Drive 1 Singapore, 117411

*Correspondence: jean-marc.dimeglio@univ-paris-diderot.fr

Abstract

The model organism *Caenorhabditis elegans* shows two distinct locomotion patterns in laboratory situations: it swims in low viscosity liquid and it crawls on the surface of an agar gel. This provides a unique opportunity to discern the respective roles of mechanosensation (perception and proprioception) and mechanics in the regulation of locomotion and in the gait selection. Using an original device, we present new experiments where the confinement of a worm between a glass plate and a soft agar gel is controlled while recording the worm's motion. We observed that the worm *continuously* varied its locomotion characteristics from free swimming to slow crawling with increasing confinement so that it was not possible to discriminate between two distinct intrinsic gaits. This unicity of the gait is also proved by the fact that wild type worms immediately adapted their motion when the imposed confinement was changed with time. We then studied locomotory deficient mutants which also exhibited one single gait and showed that the light touch response was needed for the undulation propagation and that the ciliated sensory neurons participated to the joint selection of motion period and undulation wave velocity. Our results reveal that the control of maximum curvature, at a sensory or mechanical level, is a key ingredient of the locomotion regulation.

Key words: C. elegans; locomotion; gait; confinement

INTRODUCTION

Numerous limbless organisms, from small nematodes (18) to eels (15) use oscillatory body deformations for propulsion; snakes undulate on solid surfaces (16); sandfish lizards even move through granular materials without the aid of their limbs (25). In most cases, forward propulsion is achieved through the backward propagation of a flexural wave generated by muscular contraction (17). The simplicity and the robustness of undulatory locomotion have inspired the design of robotic devices which are able to cope with complex environments (9) and open new possibilities for the propulsion of micro-swimmers for medical applications (11).

The *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) nematode is a model organism whose main phenotype is locomotion (6). Ventral cord motor neurons innervate two dorsal and two ventral rows of 23 muscular cells which give the worm the ability to locally and periodically deform its elastic cuticle, hence generating flexural waves that propagate from head to tail (for forward locomotion) (41).

C. elegans locomotion is usually observed made in two very different experimental situations in research laboratories. Totally immersed worms *swim* with a characteristic bending frequency of about 2 Hz and exhibit a typical C-shape; on the wet surface of a plane agar gel, C. elegans crawls, the worm body is pinned on the gel by capillarity and with a characteristic S-shape and the bending frequency is reduced to approximatively 0.5 Hz. It is then interesting to investigate whether these two different locomotory behaviours correspond to two different gaits (as for instance walking and running for humans) and use the extensive accumulated knowledge of the neural system of the worm to identify different neural command systems. Another interesting issue, if the existence of two different gaits is proved true, is to understand how a particular gait is selected: is it the result of energy optimisation (like for human gaits (3, 10) or the response of the neural system of the worm to perception or proprioception sensors? In any case, it should be kept in mind that the natural habitat of C. elegans is not very well known. The strains studied by biologists were isolated in composts and in garden soils, i.e. moist 3D environments (22) with very different geometries and topologies compared to bulk liquid or planar surfaces: any conclusion drawn from lab experiments involving the adaptation of the worm to its environment should be made with caution. New studies have recently been published for locomotion in granular media (19, 38) which provide a more natural environment for the worm.

Insights into the control of undulations can be provided through mechanical perturbations of *C. elegans* locomotion. A first and simple method is to modify the viscosity of the liquid: Berri et al (4) recorded the motion of worms in aqueous solutions of gelatine at different concentrations and showed that the frequency, the wavelength and the amplitude of the flexural wave decreased continuously as the medium becomes non-newtonian. They concluded that swimming and crawling are modulations of the same gait. Similarly Korta et al. (23) studied the effect of increasing the viscosity of the liquid: the worm shape is preserved whereas the frequency decreases by 20% for a 1000-fold increase in viscosity. They further showed that mutations affecting mechanosensation or the killing of touch receptor neurons slightly increase the frequency of the swimming gait, suggesting a modulation through mechanosensory inputs. Fang-Yen et al. (13) also reached to the conclusion of a continuously monitored single gait from studies where the viscosity is changed by addition of a polysaccharide to water and discussed the worm adaptation to the mechanical load. Recently Shen (34) showed that *C. elegans* could swim in a viscoelastic liquid with a reduced velocity. However, Pierce-Shimomura et al. (32) maintained the swimming/crawling partition, evidenced by calcium imaging of the

C. elegans locomotion control

muscular activity and the report of mutants which could not rapidly switch from crawling to swimming (*unc-79*, *unc-80*) or which showed transient crawling-like behaviour in liquid (*che-3*). They also showed very recently that these putative two gaits could be selected via dopamine or serotonin (26, 40). The existence of different gaits and their selection is then not a closed problem (5) and raises exciting issues about decision making by animals.

In this article we present a totally new experiment where the environment of a single worm can be continuously varied between the common laboratory experimental situations where swimming and crawling are observed. The principle of the experiment is to squeeze a worm between a glass plate and an agar gel (Fig. 1a). When the gap is larger than the worm diameter, the experimental situation corresponds to a worm in bulk liquid while for gaps smaller than the worm diameter, the confinement mimics the situation of Petri dishes where the worm is pinned by surface tension and deforms the gel (Fig. 1b). Our original set-up modulates the worm environment in a novel way as compared to previous studies where the viscoelastic properties of the surrounding fluid are varied: in particular, we can reasonably assume than the mechanical receptors of a squeezed worm are excited in a similar way than a worm confined by capillarity. The set-up imposes a geometrical confinement and is not equipped to measure the pressure applied on the worm. Nevertheless an estimate of this pressure could be derived as follows (33). For small deformations of the gel, the elastic stress σ is given by:

$$\sigma \simeq E \frac{h}{\sqrt{Rh}} \sim E \epsilon^{1/2} \tag{1}$$

with E the Young modulus of the gel, R the worm radius, h the gel indentation depth and $\epsilon = h/(2R)$ the relative confinement (see the Materials and Methods section). $E \simeq 5.10^5$ Pa (27) for a 2% gel, we could then apply a confinement pressure between 0 and 10⁵ Pa on the worm. This has to be compared to the situation where the worm is pinned by capillarity on an agar gel (the confinement pressure can be estimated by $\gamma/R \simeq 10^3$ Pa with γ the surface tension of the wetting film on the gel) and to the situation of a worm in bulk liquid where the hydrodynamic stress is given by $\eta V/R$ (with η the liquid viscosity): increasing the viscosity of the surrounding liquid through polymer addition was used to vary the viscous stress between 0.01 and 100 Pa (13). Our set-up then allows to investigate situations that encompass most lab situations experienced by the worm, and beyond.

MATERIALS AND METHODS

Strains

Wild type (WT) C. elegans (N2) and the mutant strains mec-4(e1611), unc-79(e1068), trp-4(sy695) and che-3(e1124) were obtained from the C. elegans Genetics Center (Minneapolis, MN). Worms were grown at 16°C on NGM plates seeded with E. coli OP50. A standard small-scale synchronisation procedure (36) was used to obtain young adults: worms were imaged 96 hours after the transfer of starved L1 to a fresh plate with food. They were then washed in M9 buffer before being transferred to the acquisition setup.

Experimental set-up

To observe the transition from swimming to crawling, a single worm was placed into M9 liquid buffer and gradually confined between a glass plate and the surface of a planar, soft,

deformable aqueous gel (2% agar gel) (Fig. 1a). The glass plate and its support were held by a rod whose vertical position was controlled with a motorised linear actuator coupled to a motion controller (Newport NSA12 and NSC200, Irvine, CA), operated with LabVIEW (National Instruments, Austin, TX). The vertical position of the glass plate was controlled with an accuracy of less than 1 micrometer. The gel was prepared as follows: an agar solution heated above the gel temperature (about 35° C) was poured in a large Petri dish (110 mm diameter); a large glass plate was fixed on the confinement upper plate and put in contact with the agar solution. This large plate was removed after the gelation of the agar solution occurred on cooling. This process ensured a perfect parallelism of the two confinement surfaces of the set-up. In order to maintain a constant temperature of the bath of 20° C, the setup was placed upon a transparent cell through which temperature-controlled water flowed. The whole was placed under a stereo microscope (SZX10, Olympus) and observations were made in transmitted light. We observed one single worm at a time. The worm motion was recorded through the microscope at 18 frames per second using a CCD camera (PL-B741F, PixeLINK, Ottawa, Canada, 1280 x 1024 resolution). This frequency was sufficient to capture the worm essential features. At each position of the glass plate, 30 to 60 s-long movies were acquired. Observation of a single worm lasted no more than 30 min, in order to avoid episodes of quiescence (14) or effects of exhaustion. About 12 worms were submitted to confinements ranging from $\epsilon = -0.8$ to $\epsilon = 1$ for each strain (see Section 1 in the Supporting Material for a description of the data analysis).

Confinement parameter ϵ

After insertion of a new individual inside the setup, the glass plate was lowered down until the worm touched both the plate and the gel ; this defined the reference position h = 0 that was easily detected from the immobilisation of the centre of the worm (see the superposition of the midlines of the worm, Fig. 1b centre); the gap distance between the gel and the glass plate was then equal to 2R with R the maximum radius of the worm at its centre (*C. elegans* can be considered as a cylinder with tapered ends, 2R was measured using an optical microscope). The glass plate vertical position h was counted algebraically from this reference position, so to have positive values of h for smaller gaps, negative values otherwise. The non-dimensional confinement parameter ϵ is defined $\epsilon = h/(2R)$. Positive values of ϵ thus corresponded to situations where the gel was indented by the worm ($\epsilon = 1$ was the situation where the gel is in full contact with the upper glass plate), while negative values described situations where the studied confinements ($\epsilon > -1$), the trajectory of the worm was directed by the walls and remained planar, in the focusing plane of the microscope.

A typical experiment was run as follows: we first sought the position h = 0 as described above and the upper plate was then displaced to obtain the desired confinement ϵ . The trajectory of the worm was recorded and the worm was then released by shifting up the upper plate. This protocol was repeated for a range of confinement rates. We also studied experimental situations in which initially squeezed worms ($\epsilon = 0.41$) were progressively released, for two different release rates: $\frac{d\epsilon}{dt} = -0.07$ (slow release) or 0.7 s⁻¹ (fast release), see Figure 4.

Image processing

Movies of the worm were analysed using an image processing software (ImageJ (2)). After background correction, the images were smoothed and thresholded (Fig. 1c). The worm body was reduced to a single continuous line using the skeletonisation function of ImageJ. The coordinates over time of the midline of the worm were then saved for motion analysis. Computation of the characteristics of motion of the worm was done with GNU Octave (12), following a similar approach to previous studies (4, 23). For each frame, the body coordinates were first fitted with a cubic smoothing spline with 100 points evenly distributed along the worm length. The curvature of the body at a given point \mathbf{x}_i was computed from the angle between the vectors $(\mathbf{x}_{i+1} - \mathbf{x}_i)$ and $(\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_{i-1})$. Curvature was plotted against time and curvilinear non-dimensional coordinate ℓ/L_{worm} to highlight its propagation along the worm body from head to tail (Fig. 1d) (ℓ is the curvilinear abscissa taken from the head and L_{worm} is the length of the worm). The accuracy of the determination of the curvature at the extremities was very low so that we limited the spatiotemporal graphs to $0.1 \leq \ell/L_{worm} \leq 0.9$. Linear fits of the oblique red-yellow (positive curvature) and blue (negative curvature) stripes on the spatiotemporal graph were used to measure the period of motion, T, and the phase velocity of the curvature, V_w (Fig. 1d): all reported results are averages obtained with a collection of 12 individual worms. For the sake of illustration of the variability of the worm behaviours, Fig. S1 in the Supporting Material compares, for wild type worms, the dependence of the period T and the wave velocity V_w on the confinement of 4 individual worms (among the studied population of 12 worms) with the average dependence of the studied population. These dependences are identical within the error bars and then do not depend on worm sampling: this proves the robustness of the worm behaviours vs confinement. The worm displacement velocity V was measured as the velocity of its centroid in the main direction of the motion averaged over 20 frames.

RESULTS AND DISCUSSION

Wild type worms

First we investigated the behaviour of wild type (WT) worms (N2 strains) when the confinement gap was gradually reduced (Movie S1) in a quasi-static way. As long as the worm did not touch the glass plate and the gel ($\epsilon < 0$), the period T and the wave velocity V_w remained constant (Fig. 2, a and b), and the worms exhibited the typical C-shape of a swimming worm in liquid (Fig. 2e). The swimming velocity increase on approaching $\epsilon = 0$ (Fig. 2d) can be ascribed to a purely hydrodynamical effect: the transverse friction coefficient increases faster than the longitudinal friction coefficient as the gap narrows (see Section 3 in the Supporting Material). For $\epsilon = 0$ the worm touched both the glass plate and the gel at its centre (wider part of its body) while its head and tail could still oscillate; in this particular situation, the friction forces generated by the motions of the body in the liquid were smaller than the friction force between the worm and the gel and the worm could barely move forward. The body shape then gradually turns into a S-shape as ϵ increased (Fig. 2e), adopting a similar shape to what it would be on an agar gel in a Petri dish, a situation corresponding to $\epsilon \simeq 0.5$ (see Section 4 in the Supporting Material). Both the period T and the wave velocity V_w evolved continuously with the confinement, T showing a ten-fold increase while V_w drops from 3 to 0.1 mm.s^{-1} (Fig. 2, a and b).

The maximum curvature measured at different parts of the body remained very much constant, with the exception of the head, the oscillations of which became larger as the confinement was increased (Fig. 2c). This conservation of curvature is also observed in the episodes of backward locomotion (Fig. S2 in the Supporting Material). We emphasise that in the crawling regimes, the friction experienced by the worm is much greater than the friction in liquid and the difference in friction coefficient is drastically enhanced as shown in a previous study (33). Another set of experiments investigating the behaviour of worms confined in a channel revealed the robustness of the conservation of the maximal curvature. A single wild-type worm was placed on an agar gel between two rigid walls (made out of cured SU8 photoresist) (Fig. 3a), delimiting a channel. Capillary forces confined the worm inside this channel. The width of the channel could be modified, thus restricting the amplitude A of the movement to half of the channel width. Values of the wavelength λ were measured for about ten individuals placed in channels of variable width or allowed to crawl on agar without walls. The wavelength λ was found to decrease with the width of the channel, as shown in (Fig. 3b). A very simple model can enlighten these observations. For the sake of simplicity, we consider the radius R of the worm negligible compared to the width of the channel. The maximal curvature (in absolute value) is then given by

$$C_{max} \sim \frac{A}{\lambda^2}.$$
 (2)

If the maximal curvature is an invariant of the locomotion, we should have:

$$\lambda \sim A^{1/2}.\tag{3}$$

A linear fit on the logarithmic plot of the experimental data (Fig. 3b) gives $\lambda \sim A^{0.55}$, thus compatible with the constancy of the maximal curvature.

The gradual change of shape observed when varying ϵ can be evidenced by using the approach of Stephens et al. (35) to compute the first four *eigenworms* using Principal Component Analysis (see Section 5 in the Supporting Material). The weighted average of these *eigenworms* can be considered as a typical but fictitious shape which captured the essential features of the body posture and reflects its continuity in the space of shapes as the degree of confinement is varied (Fig. 2e).

Our observations did not reveal any discontinuity between the two modes of locomotion for WT worms and therefore support the conclusion of Berri et al. (4) that swimming and crawling are two samples of the same gait modulated by the mechanical environment.

In addition, the response to the confinement modulation occurred progressively, without intermediate posture or adaptation behaviour: an initially confined worm at $\epsilon = 0.41$ was released by lifting up the glass plate until $\epsilon = -1$ (Fig. 4, a and b, Movie S2). The spatiotemporal graph shows how the worm constantly adapted its shape and frequency to the decreasing confinement and eventually recovered its swimming pattern. The results of suddenly lifting the glass plate are shown in Fig. 4c: the worm instantaneously adapted to the new environment (Movie S3); instantaneously means that no arrest time larger than the acquisition time of the camera (1/18 s) could be distinguished (we also performed experiments at the maximal frame rate of 27 fps with similar results). The existence of a time lag would have been indeed the signature of a switching process in the neuronal processing of the mechanical information and the muscles control. We performed similar experiments in compression (Fig. S7 in the Supporting Material) that lead to the same observations and conclusions. We did not observe
arrest times as reported in (40) for crawling worms suddenly put in water, but this constitutes a very different experimental situation.

Mutant worms

To gain more insight into the regulation of the undulations, we studied mutants with very different locomotion phenotypes: mec-4(e1611) which is insensitive to light touch (8); trp-4 which cannot control its curvature (24); unc-79 which exhibits abnormal swimming (1); and finally che-3 which was described as spontaneously switching between swimming and crawling in bulk liquid (32).

mec-4 (Movie S4) MEC-4 along with MEC-10 is part of the mechanotransduction complex of the six touch receptor neurons (29, 30) and mec-4 mutants do not response to light touch. We were expecting a very different behaviour from WT worms, specially when the worm was barely in contact with the two confinement surfaces (i.e. when $\epsilon \geq 0$, in a situation corresponding to light touch). When unconfined (i.e. when $\epsilon < 0$), the worm swam slower than WT worms (Fig. 2d), in spite of a larger wave velocity (Fig. 2b) which should have led to an enhanced velocity according to slender body locomotion models (18). The undulations period behaved very much like the period of WT worms (Fig. 2a) but mec-4 worms also crawled slower than WT worms (Fig. 2d). Although mec-4 worms could adapt their gait to the degree of confinement, they did it inefficiently probably because of a poor propagation of the curvature wave as evidenced on Fig. 5. When $\epsilon > 0.5$, successive curvature waves might have different velocities and might even fuse before reaching the tail end. The head motions did not seem altered; the locomotion defect introduced by the mec-4 mutation thus mainly affects the curvature propagation. Our findings are in contradiction with the results of (23) which showed an increase of the beating frequency of swimming worms for null-mutants mec-4(d) (1.8 Hz vs 1.5 Hz for the WT strain), with a preserved shape. They conversely agreed with observations made with a less severe mutant mec-4(e1339) (31). Our set of experiments shows that mechanosensation is required for a complete propagation of the bending wave along the worm body. More specifically, since we observe a reduced velocity (as compared to WT worms) even for weak confinement ($\epsilon < 0$), we might suppose that the six light touch receptors participate to the worm proprioception and regulate the worm undulations (since these receptors are attached to the cuticle). Our results also show that the wave velocity of WT worms is not an upper limit and could be overpassed. This might indicate that WT worms could give a velocity boost in escape situations for instance.

trp-4 Another control of the locomotion might be provided by an internal measure of the body response to the combined forces provided by the muscular contraction and the resistance of the environment, namely proprioception. Since the maximal curvature of the body of WT worms remains constant during motion (Fig. 2c), we studied the response of trp-4: TRP-4 acts in the stretch-sensitive neuron DVA to regulate the amplitude of body bending during locomotion (24) (it is also present in ciliated neurons such as CEP, ADE, PDE (20)). trp-4 mutants indeed exhibit an increased bending phenotype (higher maximal curvature) for all degrees of confinement (Fig. 2c, Movie S5), but their kinetic parameters remained very close to WT ones (Fig. 2a, b, d).

unc-79 Fainter mutants unc-79 (Movie S6) have been described as unable to switch to swimming when immersed into liquid (32). Our experimental results show that the defective locomotion of swimming unc-79 worms is due to a slower propagation of the flexural wave (Fig. 2b) and a decrease of its intensity as it reaches the tail, thus explaining the S-shape of swimming mutant worms. Moreover, in contrast with WT worms which adapt their locomotion immediately after release, unc-79 mutants remain immobile during a short period (5 s on Fig. 4d) before starting to swim. Interestingly, this arrest time is similar to the one observed by Vidal et al. (40) but for WT worms. It could be interpreted as the time needed to switch to a different gait but also to the time needed for the initiation of a new undulation wave. Our results confirm that, as hypothesised by Pierce-Shimomura et al. (32), UNC-79 could have a role in the dynamics of the motor neurons involved in the propagation of the curvature.

che-3 Finally, we studied che-3 worms which are defective in the development of ciliated sensory neurons but conserve the light touch response. These mutants crawl like WT worms on gels (with a smaller velocity) but switch between swimming and crawling-like patterns in liquid (32). We report in Fig. 6 the evolution of the period of the undulations and the wave velocity versus the confinement parameter. Interestingly, we did not observe the bimodal distribution of gaits for unconfined worms as noticed in (32) and the (T, V_w) values did not seem to correlate with the confinement ϵ . Nevertheless, it is remarkable that the WT provides a lower bound for the period T (Fig. 6a) and an upper bound for the wave velocity V_w (Fig. 6b); these two bounds nevertheless do not represent the mechanical limits of the worm since the V_w bound is overpassed by mec-4. This suggests that the presence of the ciliated sensory neuron are essential to determine the worm locomotion pattern that is thus not only determined by the mechanical environment of the worm.

Even though we could distinguish in our experiments the different locomotion phenotypes, the mutants showed the same behaviour with respect to confinement experiments (except for *che-3* worms which do not adapt to their environment). Importantly, with the exception of the head, the maximal curvature for a given part of the body was constant in the various explored environments (Fig. 2c). This does not originate from a physiological limit: for instance, WT worms move backward with enhanced body curvature (Fig. S2). The control of curvature is thus a key ingredient of the modulation of the locomotion in *C. elegans* at a neural level using mechanical receptors (39) or at a mechanical level (37).

CONCLUSION

In this article we report new experimental results where the mechanical environment of the nematode C. elegans is varied by confining a single worm between a glass plate and a planar agar gel. An interesting feature of our experimental set-up was the opportunity to dynamically change the confinement while directly recording the worm response. We found that wild type (WT) worms are able to continuously adapt their locomotion pattern to the confinement geometry, that would imply that WT worms have a *single* gait. We also found that the light touch response is necessary to a proper propagation of the curvature waves along the worm body. An important result of our study is that the control of curvature might be an intrinsic feature of undulation locomotion. Our data should be confronted with existing models of C.

elegans locomotion which rely on such feedback mechanisms (7, 21, 28) and to experiments with other undulating animals.

SUPPORTING MATERIAL

An online supplement to this article can be found by visiting BJ Online at http://www.biophysj.org.

Section 1 - Data statistics (Figure S1 and Table S1) Section 2 - Backward locomotion (Figure S2)

Section 3 - Effect of confinement on the worm hydrodynamics (Figure S3)

Section 4 - Worms crawling on agar gels (Figure S4)

Section 5 - Principal Component Analysis and eigenworms (Figure S5 and S6)

Section 6 - Continuous compression of WT worms (Figure S7)

Movie S1: Step-by-step confinement of a wild type (WT) worm.

Movie S2: Progressive release $\left(\frac{d\epsilon}{dt} = -0.07 \,\mathrm{s}^{-1}\right)$ of a WT worm.

Movie S3: Sudden release $\left(\frac{d\epsilon}{dt} = -0.7 \,\mathrm{s}^{-1}\right)$ of a WT worm.

Movie S4: Step-by-step confinements of a *mec-4* worm.

Movie S5: Step-by-step confinements of a *trp-4* worm.

Movie S6: Step-by-step confinements of a *unc-79* worm.

The authors thank Dr. Jean-Louis Bessereau (ENS, Paris) for illuminating discussions and advice and Prof. Tim Senden (ANU, Canberra) for a critical reading of the manuscript. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (Grant Locomelegans NT05-3_41923).

References

- 1. Wormbase.
- MD Abràmoff and PJ Magalhães. Image processing with ImageJ. Biophotonics International, 11:36–42, 2004.
- 3. R McNeill Alexander. *Principles of animal locomotion*. Princeton University Press, Princeton, 2002.
- Stefano Berri, Jordan H Boyle, Manlio Tassieri, Ian A Hope, and Netta Cohen. Forward locomotion of the nematode *C. elegans* is achieved through modulation of a single gait. *HFSP Journal*, 3(3):186, 2009.
- 5. JH Boyle, S Berri, M Tassieri, IA Hope, and N Cohen. Gait modulation in *c. elegans*: it's not a choice, it's a reflex! *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5, 2011.
- 6. S Brenner. The genetics of caenorhabditis elegans. Genetics, pages 71–94, 1974.
- John Bryden and Netta Cohen. Neural control of *Caenorhabditis elegans* forward locomotion: the role of sensory feedback. *Biological Cybernetics*, 98(4):339–351, 2008.

- 8. M Chalfie and Sulston J. Developmental genetics of the mechanosensory neurons of caenorhabditis elegans. Developmental Biology, 82(2):358–370, 1981.
- 9. A Crespi, A Badertscher, and A Guignard. Amphibot i: an amphibious snake-like robot. Robotics and Autonomous Systems, 50:163–175, 2005.
- F J Diedrich and W H Warren. Why change gaits? Dynamics of the walk-run transition. Journal of experimental psychology. Human perception and performance, 21(1):183–202, 1995.
- Rémi Dreyfus, Jean Baudry, Marcus L Roper, Marc Fermigier, Howard A Stone, and Jérôme Bibette. Microscopic artificial swimmers. *Nature cell biology*, 437(7060):862–865, 2005.
- 12. John W Eaton, David Bateman, and Soren Hauberg. Gnu Octave Manual. Network Theory Ltd, Bristol, 2009.
- 13. Christopher Fang-Yen, Matthieu Wyart, Julie Xie, Risa Kawai, Tom Kodger, Sway Chen, Quan Wen, and Aravinthan D. T. Samuel. Biomechanical analysis of gait adaptation in the nematode caenorhabditis elegans. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(47):20323–20328, 2010.
- 14. R Ghosh and S W Emmons. Episodic swimming behavior in the nematode c. elegans. Journal of Experimental Biology, 211(23):3703–3711, 2008.
- 15. GB Gillis. Neuromuscular control of anguilliform locomotion: patterns of red and white muscle activity during swimming in the american eel anguilla rostrata. Journal of Experimental Biology, 201(23):3245–3256, 1998.
- 16. J Gray. The mechanism of locomotion in snakes. *Journal of Experimental Biology*, 23(2):101–120, 1946.
- J Gray. Undulatory propulsion. Quarterly Journal of Microscopical Science, 94:551–578, 1953.
- J Gray and HW Lissmann. The locomotion of nematodes. Journal of Experimental Biology, 41:135–154, 1964.
- 19. G Juarez, K Lu, J Sznitman, and P. E. Arratia. Motility of small nematodes in wet granular media. *Europhysics Letters*, 92(4):44002, 2010.
- 20. Lijun Kang, Jingwei Gao, William R Schafer, Zhixiong Xie, and X Z Shawn Xu. *C. elegans* trp family protein trp-4 is a pore-forming subunit of a native mechanotransduction channel. *Neuron*, 67(3):381–391, 2010.
- Jan Karbowski, Gary Schindelman, Christopher J Cronin, Adeline Seah, and Paul W Sternberg. Systems level circuit model of *C. elegans* undulatory locomotion: mathematical modeling and molecular genetics. *Journal of Computational Neuroscience*, 24(3):253–276, 2007.
- 22. Karin Kiontke and Walter Sudhaus. Ecology of *caenorhabditis* species. In *Wormbook*. The *C. elegans* Research Community, 2006.

C. elegans locomotion control

- J Korta, D A Clark, C V Gabel, L Mahadevan, and A D T Samuel. Mechanosensation and mechanical load modulate the locomotory gait of swimming *c. elegans. Journal of Experimental Biology*, 210(13):2383–2389, 2007.
- 24. Wei Li, Zhaoyang Feng, Paul W Sternberg, and X Z Shawn Xu. A c. elegans stretch receptor neuron revealed by a mechanosensitive trp channel homologue. Nature cell biology, 440(7084):684–687, March 2006.
- 25. Ryan D Maladen, Yang Ding, Chen Li, and Daniel I Goldman. Undulatory swimming in sand: subsurface locomotion of the sandfish lizard. *Science*, 325(5938):314–318, 2009.
- 26. Karen A Mesce and Jonathan T Pierce-Shimomura. Shared strategies for behavioral switching: understanding how locomotor patterns are turned on and off. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 4:49, 2010.
- V T Nayar, J D Weiland, C S Nelson, and A M Hodge. Elastic and viscoelastic characterization of agar. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, pages 1–9, 2011.
- 28. E Niebur and P Erdös. Theory of the locomotion of nematodes: Dynamics of undulatory progression on a surface. *Biophysical journal*, 60(5):1132–1146, 1991.
- 29. R O'Hagan and M Chalfie. Mechanosensation in *caenorhabditis elegans*. International Review of Neurobiology, 69:169–203, 2005.
- Robert O'Hagan, Martin Chalfie, and Miriam B Goodman. The mec-4 deg/enac channel of *caenorhabditis elegans* touch receptor neurons transduces mechanical signals. *Nature Neuroscience*, 8(1):43–50, 2004.
- Sungsu Park, Hyejin Hwang, Seong-Won Nam, Fernando Martinez, Robert H. Austin, and William S Ryu. Enhanced *Caenorhabditis elegans* locomotion in a structured microfluidic environment. *PLoS ONE*, 3(6):e2550, 2008.
- 32. Jonathan T Pierce-Shimomura, Beth L. Chen, James J. Mun, Raymond Ho, Raman Sarkis, and Steven L. McIntire. Genetic analysis of crawling and swimming locomotory patterns in c. elegans. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(52):20982–20987, 2008.
- 33. P Sauvage, M Argentina, J Drappier, T Senden, J Siméon, and J M Di Meglio. An elastohydrodynamical model of friction for the locomotion of *caenorhabditis elegans*. Journal of Biomechanics, 44(6):1117–1122, 2011.
- X. N. Shen and P. E. Arratia. Undulatory Swimming in Viscoelastic Fluids. *Physical Review Letters*, 106(20), 2011.
- 35. Greg J Stephens, Bethany Johnson-Kerner, William Bialek, and William S Ryu. Dimensionality and dynamics in the behavior of *c. elegans. PLoS Computational Biology*, 4(4):e1000028, 2008.
- 36. Theresa Stiernagle. Maintenance of *c. elegans*. In *WormBook*. The C. elegans Research Community, 2006.

- J Sznitman, Prashant K Purohit, P Krajacic, T Lamitina, and P. E. Arratia. Material properties of *Caenorhabditis elegans* swimming at low Reynolds number. *Biophysical journal*, 98(4):617–626, 2010.
- J Sznitman, X Shen, R Sznitman, and P. E. Arratia. Propulsive force measurements and flow behavior of undulatory swimmers at low Reynolds number. *Physics of Fluids*, 22(12):121901, 2010.
- N Tavernarakis, W Shreffler, SL Wang, and M Driscoll. unc-8, a deg/enac family member, encodes a subunit of a candidate mechanically gated channel that modulates c. elegans locomotion. Neuron, 18(1):107–119, 1997.
- 40. Andrés Vidal-Gadea, Stephen Topper, Layla Young, Ashley Crisp, Leah Kressin, Erin Elbel, Thomas Maples, Martin Brauner, Karen Erbguth, Abram Axelrod, Alexander Gottschalk, Dionicio Siegel, and Jonathan T Pierce-Shimomura. *Caenorhabditis elegans* selects distinct crawling and swimming gaits via dopamine and serotonin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(42):17504–17509, 2011.
- SE Von Stetina, M Treinin, and DM Miller. The motor circuit. International Review of Neurobiology, 69:125–167, 2006.

Figures



FIGURE 1 Experimental framework. (a) Setup. A worm is confined between an agar gel and a glass plate which can be moved vertically. Movies are recorded with a CCD camera through a stereo microscope (Materials and Methods). (b) Left : cross-sections of the confined worm, for different values of ϵ ; right: corresponding superpositions of the worm midline over 2 s. (c) Image analysis. Top: raw image (scale bar 0.5 mm); centre: thresholded image (gray) and skeletonisation (red line); bottom: the body curvature is computed as $\kappa = \theta/a$. (d) Spatiotemporal plots of the curvature vs a non-dimensional curvilinear coordinate from head to tail (ℓ/L_{worm}) .



FIGURE 2 Evolution of the kinematic parameters with confinement for wild type (WT) and mutant worms. (a) Period. For *mec-4* and *unc-79* mutants only the period of head oscillations is measured, as these oscillations do not correctly propagate along the body. (c) Maximum curvature for the head region (top), at mid body (center) and for the tail (bottom). (b) Propagation velocity. (d) Displacement velocity. (e) The weighted average of the first four *eigenworms* reflects the continuous transition in the space of shapes for WT worms.



FIGURE 3 Crawling between rigid walls. (a) a single WT worm is allowed to crawl between two rigid walls; the gap between the walls can be modified. The photographs correspond to two values of the channel width: 0.09 mm (top) and 0.06 mm (bottom). The width of the channel constrains the amplitude A of the movement, and consequently the wavelength λ . Scale bar represents 0.25 mm. (b) evolution of the wavelength λ as a function of the amplitude A (logarithmic scale), for confined worms (black dots) and for free crawling worms (red dots). A linear fit on confined worms data gives $\lambda \sim A^{0.6}$.



FIGURE 4 Dynamical variation of the confinement parameter ϵ . (a-b) Spatiotemporal dynamics of a WT individual progressively released ($\frac{d\epsilon}{dt} = -0.07 \text{ s}^{-1}$) from its initial confinement. (a) Spatiotemporal graph of the curvature and corresponding evolution of ϵ (red) and of the curvature at mid-body κ_{mid} (blue). (b) Projection over time of the successive skeletonised shapes of a WT worm during its release, from crawling (grey) to swimming (black). (c-d) Spatiotemporal graphs of the curvature for a sudden release ($\frac{d\epsilon}{dt} = -0.7 \text{ s}^{-1}$) for WT (c) and unc-79 mutant (d).



FIGURE 5 Typical spatiotemporal plots of the curvature for mec-4 for $\epsilon = -0.5$ (A), $\epsilon = 0.2$ (B), $\epsilon = 0.7$ (C).



FIGURE 6 Locomotion of *che-3* as a function of confinement. Measurements collected on five different worms along with the average behaviour of WT worms for sake of comparison: period (A), wave velocity (B).

Titre de la thèse : Modulation de la locomotion de *Caenorhabditis elegans* induite par l'environnement mécanique.

Résumé : Caenorhabditis elegans, nématode non parasitaire d'un millimètre de long, se déplace grâce à la propagation d'une onde de flexion le long de son corps. Nous décrivons un dispositif permettant le contrôle de l'environnement mécanique d'un individu unique par son confinement, en milieu liquide, entre une plaque de verre et la surface d'un gel d'agar. Nous suivons ainsi l'évolution des paramètres de la locomotion en fonction des modifications dynamiques ou graduelles du confinement. Il est possible de reproduire les deux modes de locomotion connus du ver (nage et reptation). La transition d'un mode à l'autre montre une adaptation progressive de la locomotion, qui suggère que les différents modes de locomotion consistent en des dynamiques différentes d'un même schéma d'excitation musculaire plutôt qu'en plusieurs allures distinctes. La part du toucher et de la proprioception dans la régulation de la locomotion est explorée lors de l'observation d'animaux mutants. Nous proposons un mécanisme expliquant la sélection du mode de locomotion en fonction de l'environnement mécanique, qui s'appuie sur l'observation d'une relation de dispersion liant vitesse et période des ondes de courbure et postule le maintien de la puissance maximale instantanée développée en un point du corps. Nous présentons par ailleurs un dispositif expérimental pour l'observation du comportement dans un champ électrique dont le sens est périodiquement alterné. Dans ce cas, C. elegans alterne des phases de réorientation et des phases directionnelles durant lesquelles il descend les potentiels de manière reproductible.

Title : Modulation of the locomotion of *Caenorhabditis elegans* induced by the mechanical environment.

Abstract : Caenorhabditis elegans, a one-millimetre long, free-living nematode, moves by propagating a flexural wave along its body. Here we describe an experimental setup to control the mechanical environment of a single individual. The worm is immersed in a liquid and confined between a glass plate and the surface of an agar gel. We monitor the evolution of the locomotion parameters as a function of dynamical or gradual modifications of the confinement. We are able to reproduce the two modes of locomotion (swimming and crawling). The transition from one mode to another shows a continuous adaptation, suggesting that the different modes of locomotion are actually different dynamics of the same pattern of muscular excitation rather than distinct gaits. The role of touch and proprioception in the regulation of the locomotion is investigated by looking at mutants. We suggest a mechanism for the selection of the mode of locomotion as a function of the mechanical environment. This model is based on the observation of a dispersion relation linking the wave speed and the period of undulations and on the assumption that the maximal instantaneous muscle power used at a given point of the body is kept constant. In addition, we introduce an experimental setup for the observation of a single worm in a periodically alternated electric field. In this case, the worm alternates between reorientation phases and directional phases during which it crawls towards the cathode in a reproducible way.