

Résumé

Abstract

Table des matières

1 La cellule et son environnement mécanique	5
1.1 Organisation de la cellule eucaryote	5
1.1.1 L'énergie dans la cellule	6
1.1.2 Le noyau	7
1.1.3 La membrane plasmique	8
1.1.4 Cytosquelette	11
1.2 Expression du génome	16
1.2.1 Des gènes aux protéines	16
1.2.2 Régulation de l'expression du génome	17
2 L'actine	19
2.1 Actine G	19
2.1.1 Structure	20
2.1.2 L'actine est une ATPase	21
2.1.3 Localisation et transport	21
2.1.4 Oxydation de l'actine	21
2.1.5 Protéines interagissant avec l'actine G	21
2.2 Actine F	22
2.2.1 Le filament	23
2.2.2 L'équilibre de polymérisation	23
2.2.3 Organisation en réseau de filaments	25
2.3 Rôle mécanique de l'actine : du filament au cytosquelette	29
2.3.1 Mécanique du filament d'actine	29
2.3.2 Mécanique des adhésions focales	30
2.3.3 Mécanique du cytosquelette d'actine	31
2.4 Rôle régulateur de l'actine nucléaire	33
2.4.1 L'actine G nucléaire dans les complexes	34
2.4.2 Les filaments d'actine et la myosine nucléaires	34
3 MRTF-A	36
3.1 MRTF-A, cofacteur de Serum Response Factor	36
3.1.1 Serum Response Factor	36
3.1.2 Les cofacteurs de SRF : TCF et MRTF	37
3.2 MRTF-A, indépendamment de SRF	38

3.2.1	Transition épithélio-mésenchymateuse et domaine SAP	38
3.2.2	NF- κ B	38
3.3	Structure de MRTF-A	39
3.3.1	Les motifs RPEL	39
3.3.2	La région basique et SRF	40
3.3.3	Leucine zipper et oligomérisation	40
3.3.4	SAP	41
3.3.5	TAD	41
3.3.6	Phosphorylation	41
3.3.7	Isoformes	41
3.3.8	Conformations	42
3.4	En amont de MRTF-A : voie de signalisation et régulation de l'actine	42
3.4.1	Actines mutantes	43
3.4.2	Drogues agissant sur l'actine	43
3.4.3	Actin-Binding Proteins	44
3.4.4	La voie RhoA	44
3.4.5	Un cas particulier : MICAL2	44
3.5	Rôles de MRTF-A	45
3.5.1	Embryogenèse	45
3.5.2	Régulation de la masse musculaire	46
3.5.3	Transition épithéliale-mésenchymale	46
3.5.4	Différenciation des mégacaryocytes	47
3.5.5	Rythme circadien	47
3.5.6	MRTF-A et cancers	47
3.5.7	Réorganisation de la chromatine	48
4	De la cellule au muscle	49
4.1	Organisation du muscle squelettique	49
4.1.1	Du myoblaste au myocyte	49
4.1.2	Une organisation spécifique de l'actine	51
4.1.3	Rôle de la voie RhoA/MRTF-A/SRF	53
4.1.4	De la fibre au muscle	54
4.2	La contraction musculaire	55
4.2.1	Mécanismes moléculaires	55
4.2.2	Mécanique de la contraction musculaire	55
4.3	Les cellules satellites, MRTF-A et régulation de la masse musculaire	57
5	Méthodes et dispositifs expérimentaux	59
5.1	Culture cellulaire	59
5.1.1	Type cellulaire	59
5.1.2	Culture sur PDMS ou sur verre	60
5.1.3	Transfections	61
5.1.4	Marquage DAPI sur cellules vivantes	63
5.1.5	Fixation	63
5.1.6	Marquages sur cellules fixées	63

5.2	Pinces magnétiques	66
5.2.1	Description	67
5.2.2	Calibration	73
5.2.3	Protocole de renforcement	76
5.2.4	Dépouillement des vidéos	79
5.2.5	Fonction de fluage	79
5.3	Étirement	82
5.3.1	Description de l'étireur	82
5.3.2	Calibration de l'étireur	84
5.3.3	Le microscope confocal	85
5.3.4	Protocole d'étirement observé en direct	86
5.3.5	Protocole d'étirement fixé	87
5.3.6	Dépouillement des images	89
6	Rhéologie locale d'une cellule unique	91
6.1	Description	91
6.1.1	Séries d'expériences	91
6.1.2	Sélection préliminaire	92
6.1.3	Sélection a posteriori	92
6.1.4	Application de la force : la fonction de fluage	93
6.2	Résultats	95
6.2.1	Caractéristiques mécaniques des C2C12	95
6.2.2	Influence de l'enrobage des billes en fibronectine	97
6.2.3	Évolution des paramètres mécaniques	97
6.2.4	Classification des cellules selon leur évolution	100
6.2.5	Influence de la position de la bille sur la cellule sur l'évolution des propriétés mécaniques	100
7	Localisation de MRTF-A dans les cellules musculaires en réponse à une stimulation mécanique	103
7.1	À propos de la localisation de MRTF-A	103
7.1.1	Influence des moyens d'observation sur l'équilibre entre MRTF-A et l'actine G	104
7.2	Application d'une force locale avec les pinces magnétiques	105
7.3	Application d'une déformation globale avec l'étireur : Étude quantitative et dynamique	108
7.3.1	État de référence	108
7.3.2	Effet de la sur-expression d'actine mCherry	110
7.3.3	Effet du rinçage et du montage préalables	112
7.3.4	Résultats pour l'étirement 10%	112
7.3.5	Résultats pour l'étirement 30%	115
7.4	Application d'une déformation globale avec l'étireur : Étude quantitative sur cellules fixées	119
7.4.1	Résultats pour l'étirement 10%	119
7.4.2	Résultats pour l'étirement 30%	119

7.5 Application d'une déformation globale avec l'étireur : Étude quantitative dynamique	119
---	-----

Chapitre 1

La cellule et son environnement mécanique

La cellule est l'unité de base des êtres vivants. Elle peut extraire de l'énergie du milieu extérieur afin de se maintenir dans un état organisé et de se reproduire pour donner naissance à d'autres cellules par la division cellulaire.

Une cellule est séparée du milieu extérieur par une membrane. Elle contient son code génétique sous la forme d'ADN, elle le duplique et le transmet lors de ses divisions.

Les cellules sont séparées en deux grands groupes en fonction de l'état de leur ADN : les procaryotes et les eucaryotes. L'ADN des procaryotes est libre dans la cellule, il est souvent constitué d'un seul chromosome circulaire. Au contraire, l'ADN des eucaryotes est confiné dans un compartiment spécial, le noyau.

Chez les eucaryotes comme chez les procaryotes, il existe des organismes vivants pouvant être composés d'une ou de plusieurs cellules. Les plus grands organismes, comme les plantes ou les animaux, peuvent être composées d'un très grand nombre de cellules (de l'ordre de 10^{14}) qui possèdent le même génome mais ont des phénotypes très divers.

1.1 Organisation de la cellule eucaryote

Les cellules eucaryotes sont composées de plusieurs compartiments aux fonctions spécifiques à l'intérieur d'une membrane plasmique. Le noyau est le plus gros de ces compartiments, il renferme l'ADN organisé sous la forme de chromosomes et est le lieu de la transcription de l'ADN en ARN. Le réticulum endoplasmique rugueux est le siège de la traduction de l'ARN en protéines. L'appareil de Golgi est le lieu de transformation finale des protéines. Les mitochondries sont les unités de production d'énergie de la cellule : elles produisent l'Adénosine Triphosphate (ATP), qui sera transformée en Adénosine Diphosphate (ADP) en libérant de l'énergie. Les mitochondries sont d'anciennes bactéries devenues symbiotiques des cellules eucaryotes, elles possèdent leur propre ADN.

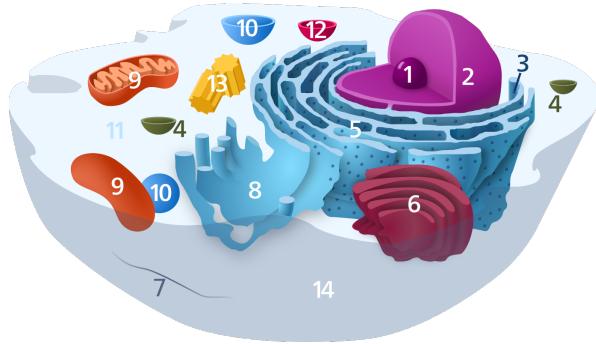


FIGURE 1.1 – La cellule eucaryote. 1. Nucléole 2. Noyau 3. Ribosome 4. Vésicule 5. Réticulum endoplasmique rugueux 6. Appareil de Golgi 7. Cytosquelette 8. Réticulum endoplasmique lisse 9. Mitochondrie 10. Vacuole (cellule végétale uniquement) 11. Cytosol 12. Lysosome 13. Centrosome 14. Membrane Plasmique
Figure par Kelvinsong (CC0)

1.1.1 L'énergie dans la cellule

Une cellule vivante est un système très éloigné de l'équilibre thermodynamique. Pour se maintenir en vie, elle utilise donc de l'énergie qu'elle va trouver dans le milieu extérieur.

À l'intérieur de la cellule, la source d'énergie utilisée dans les réactions enzymatiques est l'hydrolyse de nucléosides triphosphates. Il s'agit majoritairement d'Adénosine Triphosphate, qui est hydrolysée en Adénosine Diphosphate et un phosphate inorganique en libérant 30,5 kJ/mol d'énergie. Les protéines qui utilisent l'ATP comme source d'énergie sont des ATPases. C'est le cas par exemple de l'actine et de la myosine qui utilisent l'ATP pour contracter les muscles, dont nous ferons une description plus détaillée plus loin.

Certaines protéines utilisent à la place de l'ATP le Guanosine Triphosphate, fonctionnant de la même manière. C'est pas exemple le cas des microtubules ou des petites GTPases comme RhoA, dont nous parlerons également plus loin.

Le corps ne possède en permanence que des réserves d'ATP pour quelques secondes, car l'ATP ne peut pas être stockée telle quelle dans l'organisme.

L'ATP ne peut pas être puisée directement dans le milieu extérieur. Les sources d'énergie des cellules animales sont les glucides simples (comme les sucres) ou complexes (comme l'amidon) et les lipides ou les acides aminés lorsque les autres sources font défaut.

La cellule animale reçoit principalement son énergie sous forme de glucose par la circulation sanguine. Ce glucose est alors dégradé d'abord dans le cytoplasme, puis en présence de dioxygène dans la mitochondrie. Une molécule de glucose permet d'obtenir une trentaine d'ATP. Lorsque le dioxygène ne permet pas de fournir assez rapidement l'énergie nécessaire, par exemple lors d'effort musculaires intenses, la fermentation permet de produire de l'énergie en produisant de l'acide lactique.

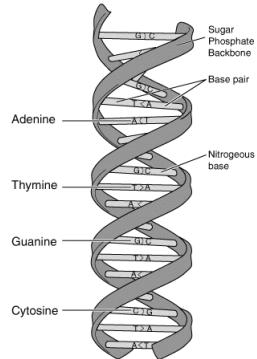


FIGURE 1.2 – Schéma de la structure de l'ADN, par Messer Woland CC-BY-SA-2.5

1.1.2 Le noyau

Le noyau sépare le matériel génétique du reste du milieu cellulaire. Cependant, bien d'autres molécules que l'ADN sont présentes dans le noyau, et il s'y passe d'autres choses que la transcription ou la duplication de l'ADN.

ADN

L'ADN est une molécule constituée d'un enchaînement de nucléotides composés d'une base azotée, d'un sucre et d'un groupement phosphates. Il existe quatre bases azotées possibles : Adénine, Thymine, Cytosine, Guanine. Leur enchaînement va être à la base du code génétique. L'enchaînement des nucléotides forme une double hélice dans laquelle les nucléotides se correspondent en deux paires : Adénine et Thymine, Cytosine et Guanine.

Le génome des êtres vivants peut comporter typiquement du million au milliard de paires de base d'ADN, la distance entre deux bases étant de 0,34nm. Chez l'homme, on compte environ 3,2 milliards de paires de bases, ce qui correspond à une longueur d'ADN de l'ordre du mètre, qui doit être stockée dans le noyau cellulaire d'un diamètre de 5 à 7 microns. On conçoit alors qu'une organisation spécifique de l'ADN dans le noyau soit nécessaire pour faire tenir une molécule aussi grande dans un compartiment aussi étroit.

L'ADN est enroulé autour de protéines appelées histones comme du fil autour d'une bobine, formant une structure appelée nucléosome. Ces nucléosomes empilés forment une structure bien plus compacte que l'ADN libre, appelée la chromatine. Certains acides aminés qui composent les histones peuvent subir des réactions chimiques comme l'acétylation ou la méthylation, qui ont un rôle dans la régulation de la transcription du génome. L'acétylation des histones détermine l'état de la chromatine : l'hétérochromatine est la forme compacte où l'ADN ne peut pas être transcrit, l'euchromatine est la forme plus étendue dans laquelle l'ADN est accessible pour la transcription.

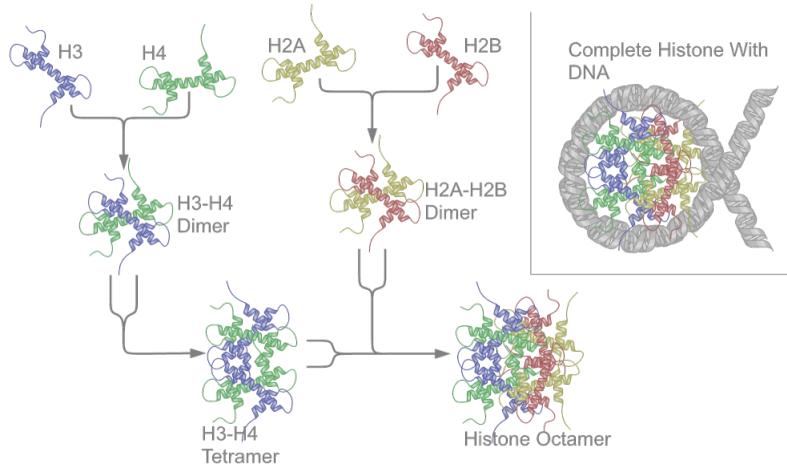


FIGURE 1.3 – Enroulement de l’ADN autour d’un complexe d’histones, illustré par richard wheeler (CC BY-SA 3.0)

Transport nucléo-cytoplasmique

Le noyau est séparé du reste du cytoplasme par une membrane formée de deux bicouches lipidiques. Elle est percée de trous appelés pores nucléaires, par lesquels les molécules peuvent entrer et sortir du noyau. Les protéines de taille inférieure à 40 kDa peuvent passer par diffusion passive par les pores nucléaires.

Les protéines de plus grande taille doivent faire appel à des transporteurs spécifiques pour aller d'un côté de la membrane à l'autre. Les importines vont localiser sur la protéine à importer un signal de localisation nucléaire (NLS) et se lier à elle par ce biais. Le couple importine-cargo va diffuser à travers le pore nucléaire. Une fois dans le noyau, l'importine va se lier à la RanGTP et se dissocier du cargo, qui est libéré dans le nucléoplasme. L'importine est alors à nouveau exportée du noyau et la GTP hydrolysée en GDP. De même, une protéine possédant une séquence d'export nucléaire (NES) sera liée à une exportine-GTP, et le couple diffusera vers le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, la GTP est hydrolysée en GDP et le cargo relargué. L'exportine revient dans le noyau par diffusion.

Par exemple, l'actine, bien que de taille 42kDa, à la limite de la diffusion passive, est importée de manière active par l'importine 9 et exportée par l'exportine 6.

1.1.3 La membrane plasmique

La membrane plasmique sépare le milieu intérieur de la cellule de l'extérieur. Elle est composée d'une bicouche de lipides amphiphiles dans laquelle sont encastrées des molécules transmembranaires qui permettent de réguler les

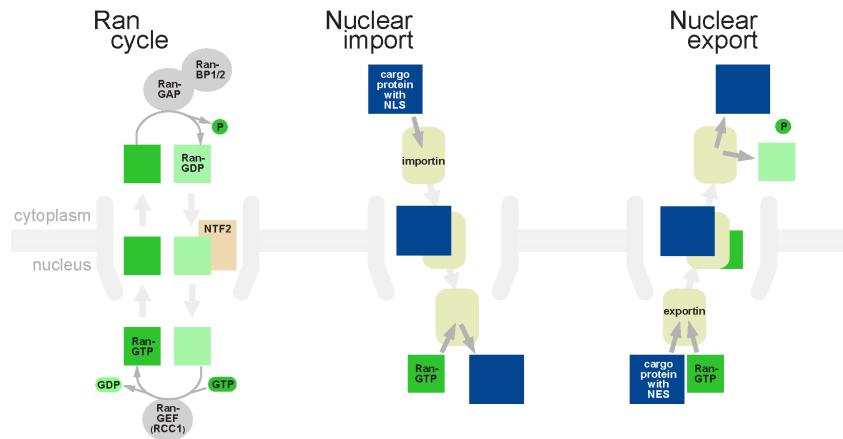


FIGURE 1.4 – Schéma du transport nucléo-cytoplasmique par les karyophérines.

échanges avec le milieu.

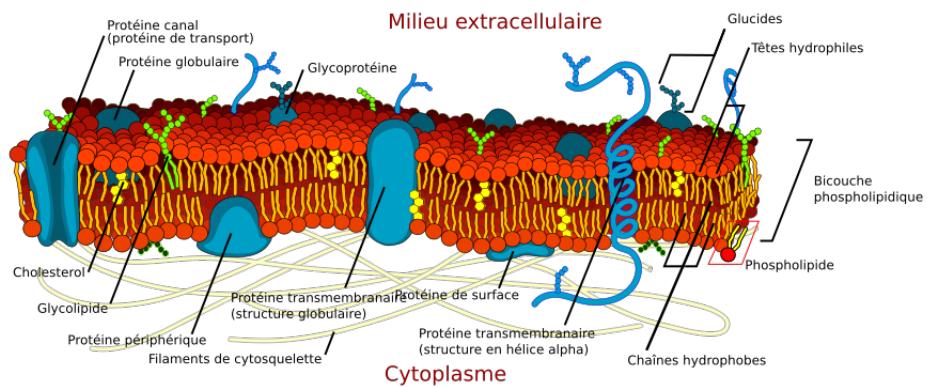


FIGURE 1.5 – Schéma de la membrane plasmique

Transport transmembranaire

La membrane assure le passage de molécules d'un côté à l'autre de manière active ou passive.

Les lipides peuvent passer par diffusion à travers la barrière, c'est le cas par exemple des hormones stéroïdiennes comme les androgènes ou les œstrogènes, dont les récepteurs sont à l'intérieur de la cellule et non sur la membrane.

Les ions comme le calcium, le potassium ou le magnésium sont transportés par des canaux spécifiques. Le mouvement des ions permet de polariser la membrane et de faire passer un signal électrique et est essentiel dans le fonctionnement du système nerveux et dans la contraction musculaire. Des canaux

spécialisés, les aquaporines, laissent passer l'eau pour moduler la pression osmotique. Il existe une très grande variété de transporteurs d'espèces chimiques à travers la membrane.

Des molécules peuvent également être transportées de l'intérieur vers l'extérieur par l'invagination d'une partie de la membrane en une petite bulle, la vésicule. Ce phénomène s'appelle l'endocytose. Inversement, des vésicules dans le milieu intracellulaire peuvent fusionner avec la membrane pour émettre leur contenu vers l'extérieur, c'est l'exocytose. Les cellules fabriquant la matrice extra-cellulaire utilisent l'exocytose pour excréter les protéines synthétisées.

Signalisation

La liaison d'un récepteur membranaire à un ligand peut déclencher une activité enzymatique, une ouverture de canaux ioniques ou l'activité des protéines G (dont les petites GTPases). La famille des protéines à 7 segments transmembranaires, par exemple, est responsable de la détection des signaux visuels, olfactifs, gustatifs, inflammatoires ...

Adhésion

La plupart des cellules font partie d'un tissu et adhèrent à d'autres cellules voisines et aux protéines de la matrice extra-cellulaire par l'intermédiaire de protéines transmembranaires.

Interactions cellules-cellules Les cellules se lient les unes aux autres pour se reconnaître, communiquer et former une structure complète.

La super famille des immunoglobulines comprend des molécules d'adhésion (IgCAM), souvent spécifiques à un type cellulaire. Elle comprend également les complexes majeurs d'histocompatibilité, qui permettent au système immunitaire de reconnaître les cellules de son propre organisme.

Les cellules échangent entre elles des espèces chimiques et des signaux électriques. Les jonctions communicantes permettent une communication directe entre deux cellules en contact. Les espèces chimiques peuvent passer librement de l'une à l'autre. Cela peut amplifier un signal hormonal, perçu par une cellule et transmis à travers ces jonctions aux voisines qui n'ont pas capté le signal directement. Elles peuvent également servir à transmettre très rapidement un signal électrique. Les synapses sont un système très élaboré de communication entre deux cellules par échange d'espèces chimiques (les neurotransmetteurs) par exocytose dans un espace inter-cellulaire réduit.

Les jonctions serrées permettent de créer une étanchéité de part et d'autre d'une monocouche cellulaire. Les cellules épithéliales forment un feillet continu lié par des jonctions serrées qui maintient la séparation entre le milieu extérieur (la lumière) et le milieu intérieur, par exemple au niveau de la peau, des muqueuses, de l'intérieur du tube digestif...

Les cadhérines forment une famille de protéines exprimées partout dans l'organisme à tous les stades de son développement. Il existe une trentaine de gènes

de cadhérines, et encore plus de protéines exprimées grâce à l'épissage. Ces différentes protéines sont spécifiques selon le type cellulaire. Les cadhérines de deux cellules voisines peuvent interagir par leur domaine extra-cellulaire pour former une jonction (interaction cis). Les cadhérines peuvent également interagir par leur domaine transmembranaire entre cadhérine d'une même membrane et former des amas (interaction trans). Les cadhérines permettent de maintenir l'intégrité mécanique d'un tissu de cellules en connectant les cytosquelettes de cellules voisines entre eux. Les cadhérines desmosomales lient les réseaux de filaments intermédiaires, alors que les cadhérines classiques lient les réseaux d'actine.

Interactions cellules-matrice La famille des intégrines est le principal médiateur des interactions cellule-substrat. Elles forment des hétérodimères entre une forme alpha (parmi 18) et une forme beta (parmi 8). Au total, les différentes combinaisons entre les unités alpha et beta forment 24 dimères qui sont exprimés dans différents types cellulaires et qui se lient à différentes protéines de la matrice extra-cellulaire comme le collagène ou la fibronectine. Les intégrines relient la matrice extra-cellulaire au cytosquelette d'actine sous la membrane plasmique. Du côté interne de la membrane, l'intégrine se lie à des protéines comme la vinculine, la paxilin, la zyxine, ou la taline pour former des complexes appelés adhésions focales. Les intégrines sont la porte d'entrée des signaux mécaniques de la MEC. La plupart des molécules qui s'associent aux intégrines sont impliquées dans la mécanotransduction car elles sont responsables du déclenchement de voies de signalisation en réponse aux signaux reçus par les intégrines.

1.1.4 Cytosquelette

Le cytosquelette est l'armature sur laquelle repose la cellule pour maintenir sa forme. Il lui permet d'exercer et de sentir des forces, de se déplacer, de gérer l'organisation interne de ses organites et le trafic entre elles. Il est composé de trois réseaux de protéines assemblées en filaments : les microtubules, les filaments intermédiaires et l'actine.

Les filaments du cytosquelette sont en réorganisation constante : la polymérisation¹ et la dépolymérisation ont lieu en permanence, à des rythmes qui sont étroitement régulés par la cellule. Des protéines de pontage peuvent lier ces filaments pour former un gel réticulé, tandis que d'autres protéines peuvent se lier aux extrémités pour contrôler la cinétique de polymérisation ou de dépolymérisation. Certaines des protéines de pontage sont des moteurs : elles peuvent convertir de l'énergie chimique en déplacement le long des filaments et mettre le gel de filaments sous tension.

1. Ici, il ne s'agit pas d'une polymérisation au sens chimique. La structure des filaments du cytosquelette est semblable à celle d'un polymère mais à une échelle différente, et les interactions chimiques en jeu sont tout à fait différentes. Par analogie, on parle de monomères, de polymérisation et de protéines de pontage.

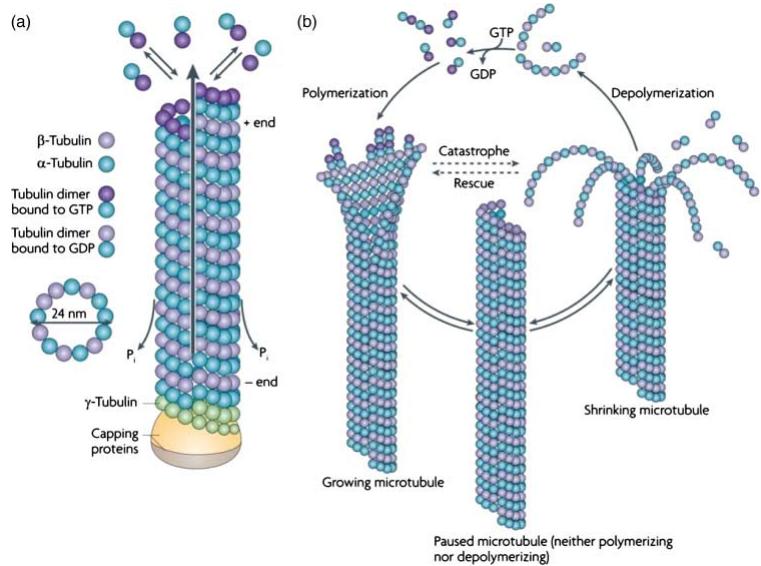


FIGURE 1.6 – Construction et destruction des microtubules.

Microtubules

La tubuline, composée de deux sous-unité (alpha et bêta), s'associe en un protofilament de treize monomères, qui vont s'additionner pour former de longs filaments creux de diamètre 25nm. Ces filaments sont polarisés, une extrémité ne comportant que des sous-unités beta (notée +) et l'autre que des alpha (notée -), la polymérisation ayant lieu à l'extrémité + et la dépolymérisation à l'extrémité -. Le microtubule est le filament le plus rigide du cytosquelette, sa longueur de persistance est de l'ordre du millimètre, bien plus que la taille d'une cellule.

Les microtubules sont organisés autour d'un élément central : le centrosome. À partir de cet élément central, les microtubules irradient vers la périphérie cellulaire. Sur les microtubules, deux moteurs moléculaires se déplacent, les dynéines et les kinésines, respectivement de l'extrémité + vers - et de - vers +.

Les microtubules organisent les éléments de la cellule et assurent le transport entre les organites, en particulier par le déplacement des vésicules. Les moteurs moléculaires conduisent les vésicules d'un organite à l'autre, par exemple les protéines nouvellement synthétisées vers l'appareil de Golgi, ou les protéines de la matrice extra-cellulaire vers la membrane.

Les microtubules jouent un rôle prépondérant lors de la mitose. Ils s'assemblent en un fuseau à la pointe duquel se trouve les centrosomes. Au centre s'alignent les paires de chromosomes, qui sont séparés et emmenés vers les centrosomes. La plupart des drogues perturbant les microtubules bloquent la mitose et sont utilisées pour cette raison dans les traitements anti-cancéreux.

Les flagelles et les cils, par exemple le flagelle du spermatozoïde, sont com-

posés d'un faisceau de microtubules animé par les moteurs moléculaires.

Filaments intermédiaires

Contrairement à l'actine et à la tubuline, qui sont conservées et exprimées dans tous les types cellulaires, les filaments intermédiaires sont une famille de protéines dont l'expression dépend du type cellulaire (à l'exception de la lamine). Leur assemblage ne nécessite pas non plus l'hydrolyse d'ATP ou de GTP, il est spontané, et il n'existe pas de moteurs moléculaires se déplaçant sur ces filaments.

Les réseaux de filaments intermédiaires sont liés aux protéines transmembranaires (cadhéries, intégrines) au niveau de structures appelées desmosomes (nom qui vient de la desmine) qui participent à l'intégrité mécanique des tissus.

Le réseau de filaments intermédiaires est beaucoup plus stable que les deux autres réseaux du cytosquelette, qui sont en construction et destruction permanentes. Leur rôle est principalement d'ancrer les différents organites dans la cellule.

Les plus connus des filaments intermédiaires sont sans doute les kératines, exprimées dans les cellules épithéliales et qui sont le constituant principal des poils et des ongles des mammifères (la kératine des reptiles et des oiseaux ne présente pas d'homologie avec celle des mammifères).

La vimentine est exprimée dans toutes les cellules d'origine mésenchymateuse. Elle joue un rôle dans la localisation des vésicules bien que ne participant pas directement à leur transport : le réseau de vimentine interagit avec celui des microtubules. Elle est également impliquée dans la régulation de l'adhésion et de la migration cellulaire. L'expression de vimentine est souvent un marqueur de la transition épithélio-mésenchymateuse.

Plusieurs types de filaments intermédiaires sont exprimés dans les neurones, et deux types sont spécifiquement responsables de la transparence du cristallin.

Les lamines

Les lamines diffèrent des autres filaments intermédiaires sur plusieurs points. Elles ne forment pas un réseau dans toute la cellule mais sont localisées à la membrane nucléaire, et elles sont exprimées dans tous les types cellulaires.

Les lamines forment un réseau soutenant la membrane nucléaire interne, dans lequel sont ancrés les pores nucléaires. Par l'intermédiaire de protéines comme la nesprine, le réseau laminaire est couplé mécaniquement au cytosquelette d'actine de la cellule et il est couplé au réseau interne par l'émerine, protéine qui coiffe la pointe des filaments d'actine et augmente leur polymérisation. Le réseau de lamines doit maintenir l'intégrité du noyau et définit ses propriétés mécaniques. Les lamines organisent également la chromatine à l'intérieur du noyau et contribuent à réguler l'expression du génome.

La progéria et le syndrome de dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss sont liés à des mutations sur le gène de la lamine A (ou sur celui de l'émerine dans ce deuxième cas).

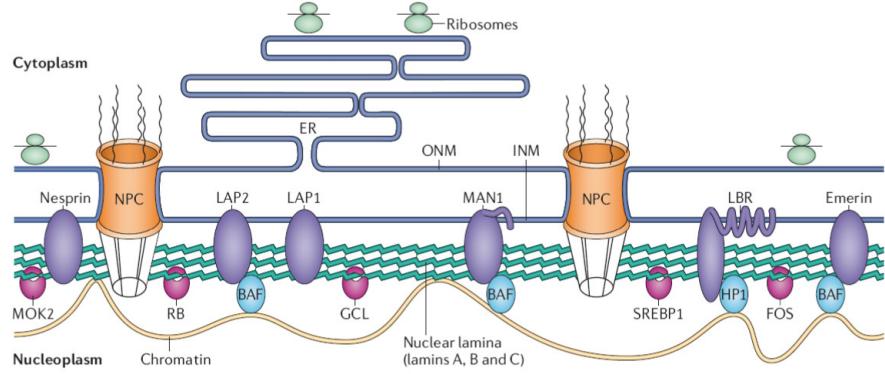


FIGURE 1.7 – Les lamines soutiennent l’organisation de la membrane nucléaire.
Illustration par Coutinho et al. *Immunity and Ageing* 2009

Filaments intermédiaires dans les cellules musculaires

Quatre types de filaments intermédiaires sont exprimés dans la cellule musculaire : la desmine, la vimentine, la lamine et la synésine. La desmine et la vimentine ont des structures suffisamment proches pour pouvoir former des hétéro-dimères et s’associer dans des filaments. La synésine ne peut former que des hétéro-dimères avec les autres filaments intermédiaires. Elle permet de lier le réseau de desmine au disque Z.

Le réseau de desmine du muscle squelettique est principalement localisé au niveau des disques Z et organise leur alignement. Dans les desminopathies, les mutations de la desmine désorganisent les myofibrilles et causent une myopathie. Le réseau de desmine s’étend à travers toute la cellule musculaire et couple mécaniquement les différents organites. Les perturbations du réseau de desmine ne désorganisent pas le réseau de microtubules ni celui d’actine, mais il existe des liens entre les trois réseaux du cytosquelette.

Dans les myoblastes (cellules précurseurs du muscle squelettique), la desmine participe aux propriétés mécaniques de la cellule : la surexpression de desmine sauvage augmente la rigidité cellulaire.

Actine

L’actine constitue le réseau du cytosquelette le plus versatile et le plus dynamique. Son réseau est constamment réorganisé, et elle est le composant essentiel de la motilité cellulaire.

Toutes les cellules eucaryotes expriment des actines, qui sont hautement conservées de la levure jusqu’à l’humain. Ce sont également des protéines très exprimées, et l’actine peut représenter jusqu’à 15% de la masse de protéines

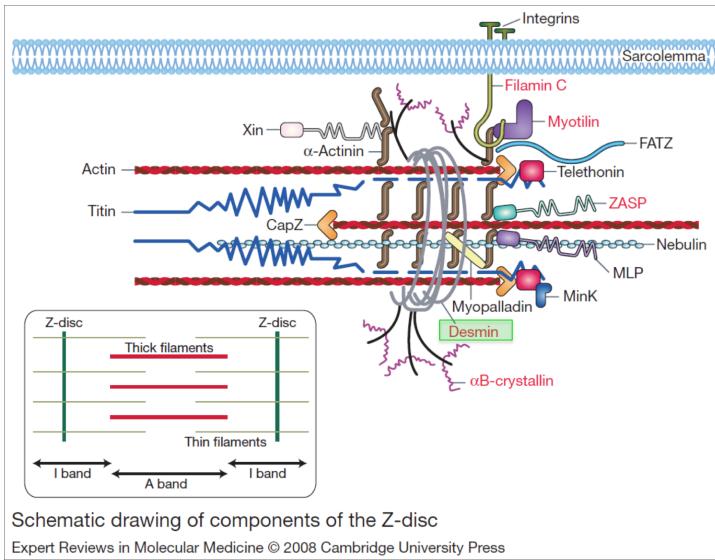


FIGURE 1.8 – Rôle de la desmine dans l’organisation des fibres musculaires.

dans une cellule.

La membrane plasmique est une bicouche lipide qui n'a pas de résistance mécanique propre. Un réseau dense et très branché d'actine forme une couche rigide sous la membrane et confère sa forme à la cellule : le cortex d'actine. Ses propriétés sont essentielles dans les déformations des cellules et dans l'interaction de celles-ci avec un substrat. Dans le volume de la cellule, l'actine forme un réseau moins dense, caractérisé par des faisceaux de filaments appelés fibres de stress. Dans le muscle, l'actine et ses moteurs associés (les myosines) forment une organisation spécialisée responsable de la contraction musculaire, appelée sarcomère.

Lors de la division cellulaire, le réseau d'actine est dépolymérisé. À la fin de la séparation des chromosomes, l'actine corticale forme un anneau contractile qui va se refermer pour séparer le corps cellulaire en deux cellules filles distinctes.

Un grand nombre de protéines interagissent avec l'actine (Actin-Binding Proteins). Concernant le cytosquelette d'actine, il s'agit de facteurs de polymérisation ou de dépolymérisation, de moteurs (les myosines) ou de protéines qui ancrent le réseau d'actine aux protéines transmembranaires (comme les cadhéries ou les intégrines) ou au réseau de lamines du noyau.

L'actine n'est pas limitée à un rôle mécanique, elle a également des rôles de régulation de l'expression du génome et d'organisation de l'ADN.

Le couplage entre le rôle mécanique de l'actine et son rôle transcriptionnel est au cœur de ce travail de thèse, c'est pourquoi l'actine sera présentée en détail dans un chapitre dédié.

1.2 Expression du génome

Le génome d'un organisme contient toute l'information nécessaire à la reconstitution de l'organisme entier. Cependant, il est évident dans un organisme pluricellulaire que si toutes les cellules contiennent le même génome, elles ne l'expriment pas de la même manière. C'est également le cas chez des êtres unicellulaires : des bactéries ou des levures ayant le même génome ne vont pas l'exprimer de la même manière selon les conditions extérieures.

Les parties codant directement pour des protéines ne représentent qu'une toute petite partie de l'ADN. Autour des séquences codantes, le reste du génome permet de déterminer quelles protéines doivent être synthétisées, et dans quelles quantités.

1.2.1 Des gènes aux protéines

Le chemin d'un gène à une protéine fonctionnelle passe par trois étapes principales : la transcription de l'ADN en ARN, la maturation de l'ARN et la traduction de l'ARN en protéine

La transcription

L'information génétique est stockée dans l'ADN, pour y être protégée et transmise d'une génération à l'autre. Les quatre bases de l'ADN fonctionnent par paires, et grâce à ce mécanisme un brin d'ADN peut être complété par sa séquence miroir.

Lorsque toutes les conditions d'expression sont réunies, l'ARN polymérase peut se fixer sur l'ADN au site de début de transcription. Le complexe ouvre l'ADN, et permet aux bases de l'ARN, Adénine, Uracile, Guanine et Cytosine, de compléter les bases de l'ADN, respectivement Thymosine, Adénine, Cytosine et Guanine. L'ARN polymérase progresse ainsi jusqu'à rencontrer une séquence terminatrice sur l'ADN.

À l'issue de cette étape, un ARN a été transcrit directement à partir de la séquence codante.

La maturation de l'ARN

À l'issue de sa transcription, l'ARN subit plusieurs transformations. Des éléments sont ajoutés à ses deux extrémités, pour sa stabilité et sa reconnaissance par les ribosomes. L'ARN transcript comprend deux types de séquences, les introns et les exons. Seuls les exons contiennent l'information des acides aminés pour coder la protéine. L'ARN va subir une étape d'épissage : les introns sont retirés de l'ARN jusqu'à ce qu'il ne reste que l'enchaînement des exons. Lors de cette étape, tous les exons peuvent être réassemblés, ou seulement une partie d'entre eux. Les protéines synthétisées par ces reconstitutions différentes seront différentes : on parle d'épissage alternatif. Un même gène peut donc coder pour des protéines différentes grâce au jeu de l'épissage. Chez la drosophile par

exemple, un unique gène code pour autant de protéines différentes que tout le reste du génome.

Après sa maturation, l'ARN messager est exporté du noyau pour se diriger vers le réticulum endoplasmique.

Tous les ARN n'ont pas vocation à être traduits en protéines : certains vont accomplir leur fonction sous cette forme. C'est le cas des éléments de la machine de traduction (ARN de transfert et ARN du ribosome), ou des micro-ARN, qui vont participer à la régulation de l'expression des gènes en aval de la transcription.

La traduction

Le code génétique est la correspondance entre des triplets de nucléotides et les acides aminés qui composent les protéines. Dans le cytoplasme, les ribosomes et les ARN de transfert vont faire la correspondance entre les nucléotides de l'ARN messager et les acides aminés, et assembler la suite des acides aminés jusqu'à atteindre un codon stop.

1.2.2 Régulation de l'expression du génome

Réorganisation de la chromatine

L'ADN est stocké dans la cellule sous une forme condensée, la chromatine. Il est enroulé autour de complexes de protéines appelées les histones. Selon leur état biochimique (acétylation, méthylation) les histones forment un enroulement plus ou moins compact de l'ADN. Sous sa forme la plus condensée, l'hétérochromatine, l'ADN n'est pas accessible pour être lu par les ARN polymérase, il ne peut pas être transcrit. Par exemple, chez les femelles mammifères, l'un des deux chromosomes X est désactivé afin de ne pas avoir deux fois plus de transcription des gènes portés par ce chromosome qu'un organisme mâle. Il est condensé définitivement sous forme d'hétérochromatine.

La compaction de l'ADN dans l'hétérochromatine ou dans l'euchromatine détermine donc quels gènes sont accessibles pour être transcrits et quels gènes sont désactivés dans l'hétérochromatine. La régulation de cette organisation par la modification chimique des histones est donc la première étape de la régulation transcriptionnelle du génome.

Les facteurs de transcription

L'ARN polymérase ne peut pas se lier seule de manière stable sur l'ADN pour initier la transcription. Les facteurs de transcription sont une famille de protéines qui ont pour rôle de se fixer sur l'ADN en amont de la séquence à transcrire pour contribuer à l'expression du gène ou au contraire pour la réprimer.

Un facteur de transcription reconnaît une séquence spécifique sur l'ADN en amont du gène régulé, le promoteur. Les promoteurs en amont d'un gène vont déterminer quels facteurs de transcription vont être capables d'activer la

transcription. Des gènes partageant le même promoteur vont être activés par les mêmes facteurs de transcription et répondre aux mêmes stimuli.

Dans le développement des êtres pluricellulaires, la différenciation des cellules souches totipotentes de l'embryon en différents types de tissus va être orchestrée par l'activation de nombreux facteurs de transcription.

Les facteurs de transcription vont également être impliqués dans les réponses d'une cellule ou d'un organisme à des signaux biologiques provenant de cellules voisines (par l'intermédiaire des liaisons transmembranaires entre deux cellules, par une structure spécialisée comme un synapse ou par un signal paracrine) ou des tissus éloignés (hormones circulant dans le corps), mais aussi à des signaux environnementaux comme la température, le choc osmotique, les contraintes mécaniques, l'exposition à la lumière du soleil ...

Un facteur de transcription peut recruter d'autres protéines, comme des coactivateurs (ou des corépresseurs), ou des protéines qui vont changer localement l'état de compacité de la chromatine, afin de rendre le gène plus facilement ou plus difficilement accessible.

Un facteur de transcription ou ses coactivateurs doivent être présents dans le noyau pour accomplir leur fonction. Le contrôle de leur localisation dans la cellule permet d'activer ou de désactiver un facteur de transcription. Par exemple, le récepteur des œstrogènes est principalement présent dans le cytoplasme en l'absence d'hormone. En présence d'hormones, il est transporté dans le noyau où il peut se lier à l'ADN et activer la transcription de ses gènes cibles.

Un facteur de transcription peut également être régulé par la phosphorylation ou celle de ses cofacteurs, ou par la présence d'un ligand.

Chapitre 2

L'actine

L'actine est une protéine ubiquitaire conservée chez tous les eucaryotes, exprimée dans tous les types cellulaires. Ses fonctions sont multiples et variées et se divisent en deux catégories principales, les fonctions mécaniques et les fonctions régulatrices.

Elle se présente dans la cellule sous deux formes principales : en monomères (Actine G pour globulaire) ou en filaments (Actine F). Elle interagit avec un grand nombre de protéines (certains pensent même qu'il s'agit de la protéine interagissant avec le plus grand nombre d'autres protéines) appelées Actin-Binding Proteins.

L'actine est un composant du cytosquelette sous forme d'un réseau de filaments très dynamique. La rigidité d'une cellule et sa motilité sont majoritairement contrôlées par l'organisation du cytosquelette d'actine.

Mais l'actine est également un composant des trois ARN Polymérases PolI, PolII et PolIII, qui transcrivent l'ADN en ARN pendant la première étape de l'expression du génome. Elle est indispensable à la réorganisation de la chromatine qui précède l'expression mais aussi à l'export de l'ARN.

L'association de ces rôles mécaniques et biologiques fait de l'actine un acteur de choix dans l'interface entre les signaux mécaniques et les signaux biologiques.

Dans le corps, l'actine a des fonctions spécifiques dans un grand nombre d'organes, comme la contraction des muscles, l'organisation des dendrites et des axones des neurones, le fonctionnement des plaquettes ou de l'appareil auditif.

2.1 Actine G

Chez les mammifères, l'actine est codée par 6 gènes qui peuvent donner une trentaine de molécules différentes par le jeu de l'épissage. Elles sont divisées en trois familles : les actines α qui sont exprimées dans les muscles cardiaques, lisses et squelettiques, les actines β et γ exprimées dans les autres types cellulaires. Les différentes formes d'actine sont très proches en séquence, mais ne peuvent pas complètement se substituer les unes aux autres. Toutes les formes peuvent



FIGURE 2.1 – Cristallisation d'un monomère d'actine ADP, d'après OTTERBEIN 2001

s'incorporer dans les filaments.

La protéine transcrit à un poids moléculaire de 42 kDa, et est produite en grande quantité dans les cellules, où elle pèse environ pour 1 à 5 % de la masse protéique.

2.1.1 Structure

La structure moléculaire de l'actine a été observée un grand nombre de fois, en cristallisation avec différents ABP comme la Dnase, la latrunculine ou la profiline.

Elle est composée de 4 sous-domaines organisés en deux lobes. Les sous-domaines 2 et 4 forment l'extrémité - du filament, les sous-domaines 1 et 3 forment l'extrémité +. Entre les deux lobes se trouve le site de liaison à l'ATP. À côté de ce site se trouve une zone d'interaction avec les cations divalents (Ca^{2+} ou Mg^{2+}).

Dans le sous-domaine 2 se trouve une structure de 8 acides aminés appelée Dnase binding loop, désorganisée dans la plupart des cristallisations de l'actine mais organisée en feuillet β lorsqu'elle est liée à la Dnase. Au centre de cet élément se trouve une méthionine en position 44 qui peut être oxydée par la protéine MICAL.

2.1.2 L'actine est une ATPase

L'actine, après sa fabrication, n'est prête à jouer son rôle qu'avec l'ajout d'une ATP au centre de sa structure. En plus de ses deux formes, globulaire ou filamenteuse, l'actine a donc également deux états énergétiques : ATP ou ADP.

Les deux formes d'actine, ATP et ADP sont capables de former des filaments et de s'incorporer à des filaments. Cependant, l'actine ATP est plus facilement polymérisée alors que l'actine ADP est plus facilement dépolymérisée. Les actines ATP incorporées dans un filament sont ensuite hydrolysées, et deviennent donc plus facilement dépolymérisables, ce qui donne lieu à un tapis roulant : les monomères s'ajoutent à un bout et s'enlèvent à l'autre.

2.1.3 Localisation et transport

L'actine a longtemps été étudiée pour son rôle dans le cytoplasme, en tant que composant du cytosquelette. Cependant de l'actine est également présente dans le noyau de la cellule, où elle a des rôles essentiels. L'actine peut polymériser dans les deux compartiments, bien que l'on ne trouve pas de grands filaments organisés dans le noyau.

L'actine est à une taille intermédiaire pour les pores nucléaires : elle n'est pas tout à fait assez petite pour diffuser facilement à travers. Elle est donc transportée activement entre le noyau et le cytoplasme. Son import nécessite la liaison à la cofiline, et est médiée par l'importine 9. Son export nécessite la profiline et est médiée par l'exportine 6.

2.1.4 Oxydation de l'actine

Les protéines MICAL sont capables d'ajouter deux atomes d'oxygène sur la Met44 de l'actine. Cet acide aminé est au centre d'une zone de la protéine qui relie les monomères dans un filament. L'oxydation spécifique de cet acide aminé déstabilise les filaments et l'actine oxydée est incapable de se lier à d'autres actines pour former de nouveaux filaments.

MICAL2 est une version de cette protéine localisée dans le noyau. L'actine qu'elle oxyde, en plus d'être dépolymérisée, est expulsée du noyau et ne peut plus y entrer. MICAL2 organise donc la régulation de l'actine nucléaire en appauvrissant le réservoir d'actine nucléaire en filaments et en monomères.

2.1.5 Protéines interagissant avec l'actine G

La profiline est une petite protéine (autour de 15kDa) qui peut se lier à l'actine G par son extrémité +, l'empêchant de former un nouveau filament ou de se lier à l'extrémité - d'un filament existant. Bien qu'elle se lie au monomère, son action est globalement favorable à la croissance des filaments. La profiline facilite le remplacement d'une ADP par une ATP dans le monomère auquel elle est attaché. Or l'actine ATP polymérisé mieux que l'actine ADP, l'action de la profiline va donc recycler l'actine ADP dépolymérisée des anciens filaments en

actine ATP prête à allonger de nouveaux filaments. De plus, les élongateurs de filaments comme les formines et VASP vont préférentiellement utiliser de l'actine liée à la profiline pour faire croître les filaments. La profiline joue également un rôle dans la localisation de l'actine : l'exportine 6 va se lier spécifiquement au complexe actine-profiline et le faire passer de l'intérieur vers l'extérieur du noyau.

Les thymosines β 4 sont de toutes petites protéines d'environ 5kDa dont le rôle principal est de maintenir un réservoir d'actine monomérique. Elles se lient principalement aux actines ATP et les empêchent de polymériser.

Les CAP (Adenylate Cyclase Associated Protein) sont également des catalyseurs de l'échange une ADP contre une ATP dans les monomères d'actine.

Les cofilines sont une famille de petites protéines qui lient à l'actine G et à l'actine F. Elles ont une préférence pour l'actine ADP. Le complexe cofiline-actine est plus facilement recruté par les CAP, qui vont dissocier le complexe et remplacer l'ADP par une ATP sur l'actine. Les cofilines sont suffisamment petites pour passer par les pores nucléaires par diffusion, elles sont cependant dotées d'un signal de localisation nucléaire. Cela leur permet d'être importées dans le noyau lorsqu'elles sont liées à d'autres protéines plus massives. Ainsi, le complexe cofiline-actine est importé dans le noyau par l'importine 9.

L'actine bloque l'activité de la DNase I, une enzyme qui coupe l'ADN en fragments de 4 paires de bases de manière non spécifique. La DNase I se lie à l'actine globulaire avec une grande affinité, alors qu'elle ne se lie que très peu à l'actine F, c'est pourquoi elle est souvent utilisée pour la détection de l'actine G en immunofluorescence.

Les Myocardin-Related Transcription Factors sont des cofacteurs de transcriptions qui peuvent former des complexes avec trois ou cinq monomères d'actine. Leur rôle n'est pas de réguler l'équilibre dynamique de l'actine mais d'agir comme un détecteur de la concentration de monomères d'actine disponibles. En fonction de l'état de polymérisation du cytosquelette, les MRTF vont réguler l'activité d'un facteur de transcription contrôlant les gènes de l'actine et d'un grand nombre d'ABP qui régulent sa dynamique. Les MRTF sont un maillon d'une boucle de rétro-action qui contrôle la dynamique de l'actine à long terme par l'expression des gènes. Les mécanismes détaillés de ce contrôle et ses conséquences seront décrits dans un chapitre dédié.

2.2 Actine F

La principale fonction de l'actine chez les eucaryote est sa capacité à former un réseau de filaments branchés, connecté par des moteurs moléculaires. La formation de filaments d'actine est régulée par de très nombreuses protéines qui vont se lier aux monomères ou aux filaments.

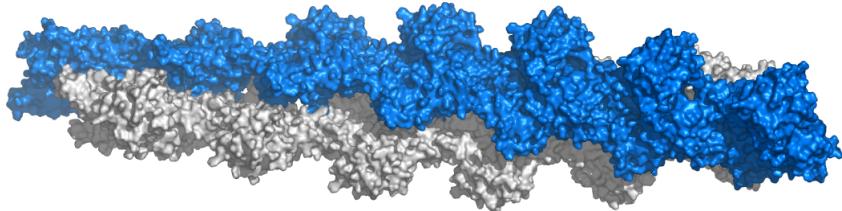


FIGURE 2.2 – Structure d'un filament d'actine basée sur le modèle de Ken Holmes, illustré par Thomas Splettstoesser

2.2.1 Le filament

Les filaments d'actine sont très dynamiques, et ont une structure changeante. Ils ont un diamètre de 6nm et une longueur de persistance de l'ordre de la dizaine de microns, donc du même ordre de grandeur que la taille typique cellulaire.

Les monomères d'actine s'associent les unes à la suite des autres, l'extrémité pointue d'un monomère se liant à l'extrémité barbée de l'autre, avec une rotation entre un monomère et l'autre. Le filament est alors polarisé, avec une extrémité pointue notée également - et une extrémité barbée notée +.

Les deux bouts du filaments ont des affinités différentes pour les monomères. En présence d'une grande quantité de monomères disponibles, le filament peut croître par les deux bouts, mais dans une concentration intermédiaire, le filament va croître par ajout de monomères à son extrémité + et décroître par dépolymérisation à l'extrémité -. L'équilibre entre les deux cinétiques de réaction détermine si la taille du filament croît ou non.

Cet équilibre est connu comme le "tapis roulant" de l'actine : lorsque les deux cinétiques sont égales, le filament avance par remplacement des monomères en gardant une longueur constante.

Bien que cet assemblage puisse avoir lieu spontanément en présence d'actine, de nombreuses protéines aident à la nucléation des filaments, à leur stabilité ou à leur déstabilisation.

2.2.2 L'équilibre de polymérisation

Des protéines vont réguler toute l'existence d'un filament d'actine : la nucléation, la croissance, la stabilisation et la dissociation.

Les nucléateurs

Les dimères et les trimères d'actine sont des structures peu stables, à la durée de vie assez courte. C'est à partir du tétramère que la structure devient suffisamment stable pour créer un nouveau filament d'actine.

Afin de dépasser cette barrière, d'autres protéines jouent le rôle de nucléateurs. Le complexe Arp2/3 (Arp pour Actin Related Protein) est le plus connu

de ces nucléateurs. Il se lie au côté d'un filament et Arp2 et Arp3 miment un dimère d'actine. D'autres monomères peuvent alors se fixer sur cette base et un nouveau filament peut croître. Ce nouveau filament est de plus attaché avec un angle fixé au filament initial, créant un réseau branché.

Les formines se fixent à l'extrémité barbée d'un filament et y ajoutent successivement des monomères d'actine. Les formines peuvent nucléer un nouveau filament en stabilisant un dimère et en y ajoutant d'autres monomères.

Les élongateurs

Une fois les filaments formés, des facteurs d'élongation comme les formines ou Ena/VASP, peuvent ajouter des monomères liés à la profiline à l'extrémité barbée du filament. Certaines formines avancent le long du filament tout en le construisant à partir de complexes actine-profiline.

Protéines de coiffage (capping proteins)

Il existe deux sortes de protéines de coiffage : celles qui se lient à l'extrémité barbée et contribuent donc à réduire la polymérisation (comme CapZ, la gelsolin ou la tensine), et celles qui se lient à l'extrémité pointue, empêchant la dépolymérisation (comme la tropomoduline).

Protéines de fragmentation (severing proteins)

Les protéines de fragmentation découpent et dépolymérisent les filaments d'actine.

La cofilin se lie aux filaments d'actine ADP et entraîne une configuration où la rotation des monomères les uns par rapport aux autres est plus grande. Cela déstabilise les filaments et les casse.

La gelsoline et la famille des villines et la fragmine sont également des facteurs de dépolymérisation des filaments d'actine.

À première vue, on peut voir l'impression que ces protéines vont avoir tendance à diminuer le nombre et la longueur des filaments et participer à la destruction du cytosquelette. Cela peut être le cas, mais pas toujours : la fragmentation d'un long filament en de nombreux filaments courts fait apparaître de nombreuses extrémité barbées là où il n'y en avait qu'une seule. Selon les conditions, en particulier l'activation de facteurs d'élongation et la disponibilité des monomères, la fragmentation peut donc agir en faveur de la polymérisation, en particulier lors du remplacement d'un réseau à longs filaments par un réseau très dense et réticulé.

Les protéines MICAL sont une nouvelle famille de protéines dépolymérisant l'actine, découvertes dans les neurones. En oxydant l'actine des filaments, elle les dépolymérisent. Comme l'actine oxydée ne peut plus former de nouveaux filaments, la destruction du cytosquelette par MICAL ne peut pas promouvoir la croissance du réseau.

Stabilisateurs des filaments

Les tropomyosines sont des protéines qui vont former également des filaments. Ces filaments vont s'enrouler autour des filaments d'actine et les protéger : ils bloquent l'activité des cofilines et avec la troponine ils promeuvent l'association avec les myosines.

Les nébulines sont des protéines stabilisantes dont le but est de fixer la longueur du filament d'actine auquel elles vont se lier, à la manière d'un étalon de mesure.

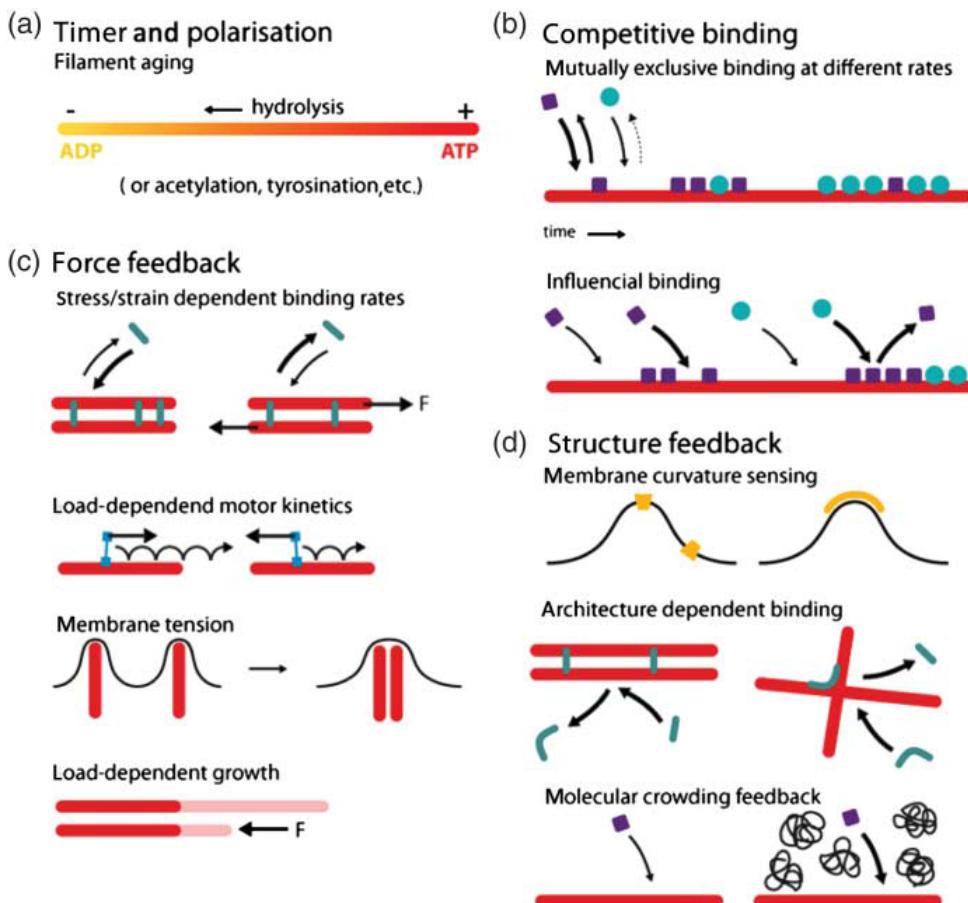


FIGURE 2.3 – •

2.2.3 Organisation en réseau de filaments

Les filaments d'actine en évolution permanente sont liés entre eux par des protéines de pontage, liés à la membrane plasmique et liés aux autres filaments

du cytosquelette (microtubules et filaments intermédiaires).

Ancrage à la membrane

Les cellules sont liées mécaniquement entre elles par les cadhérines qui relient leur réseau d'actine. Les caténines font la liaison entre les cadhérines et les filaments d'actine.

L'ancre du cytosquelette à la matrice extra-cellulaire se fait par l'intermédiaire d'une structure extraordinairement complexe, les adhésions focales. Au niveau des adhésions focales, des dizaines de protéines interagissent entre elles pour relier les intégrines encastrées dans la membrane et les filaments d'actine. Il serait impossible de faire ici l'inventaire des protéines impliquées dans ces adhésions. À l'intérieur des adhésions focales, une signalisation complexe est à l'œuvre qui permet, en réponse à des forces extérieures, de construire une structure mécanosensible capable de déclencher des cascades de signalisation dans toute la cellule. En particulier, les petites GTPases Rac, Rho et Ras sont activées par les adhésions focales soumises à des signaux mécaniques et régulent l'architecture du cytosquelette.

Protéines de pontage

Les filaments d'actine sont organisés en réseau par des protéines comme la filamine, la spectrine ou la transgeline.

La filamine est un homodimère qui lie deux filaments d'actine. Elle peut se déformer sous la contrainte, ce qui permet d'orienter le réseau d'actine à la fois d'une élasticité et d'une mécanosensibilité supplémentaire. La filamine peut également se lier à la membrane pour y ancrer le réseau d'actine.

Les tétramères de spectrine s'associent à l'actine pour former un réseau hexagonal soutenant la membrane plasmique.

Lorsque son interaction avec les filaments est forte, l' α -actinine peut lier des filaments en réseaux, alors que lorsque sa vitesse de dissociation est grande elle forme plutôt des faisceaux.

Protéines de faisceau

Ces protéines permettent de rassembler les filaments d'actine en faisceaux parallèles ou anti-parallèles. Cette architecture est retrouvée dans les filopodes, dans les fibres de stress ou dans les microvillosités.

Il peut y avoir deux domaines de liaison à l'actine sur la même protéine, comme c'est le cas pour la fimbriate, l'écart entre deux filaments est alors faible et le faisceau maintenu serré. Des protéines se liant à l'actine peuvent également former des dimères ou des multimères où chaque sous-unité lie un filament. L' α -actinine permet ainsi de former des fibres de filaments anti-parallèles. La jonction entre les filaments est plus souple et moins serrée.

Lien avec les autres filaments du cytosquelette

Le cytosquelette d'actine est relié aux réseaux de filaments intermédiaires et aux microtubules par des protéines capables de se lier aux trois types de filaments. Par exemple, la plectine et les nesprines permettent de connecter les microtubules et les filaments d'actine au réseau de lamines de la membrane nucléaire, et donc de transmettre les contraintes jusqu'au noyau. Les WHAMM se lient aux microtubules et à la membrane et nucléent des filaments d'actine.

Moteurs moléculaires : myosines

Les myosines sont des moteurs moléculaires qui se déplacent sur l'actine en consommant de l'ATP. Il en existe chez tous les eucaryotes, mais leur homologie n'est pas aussi grande que celle de l'actine, car elles ont des fonctions différentes. Dans le génome humain, on dénombre une quarantaine de gènes pour la myosine.

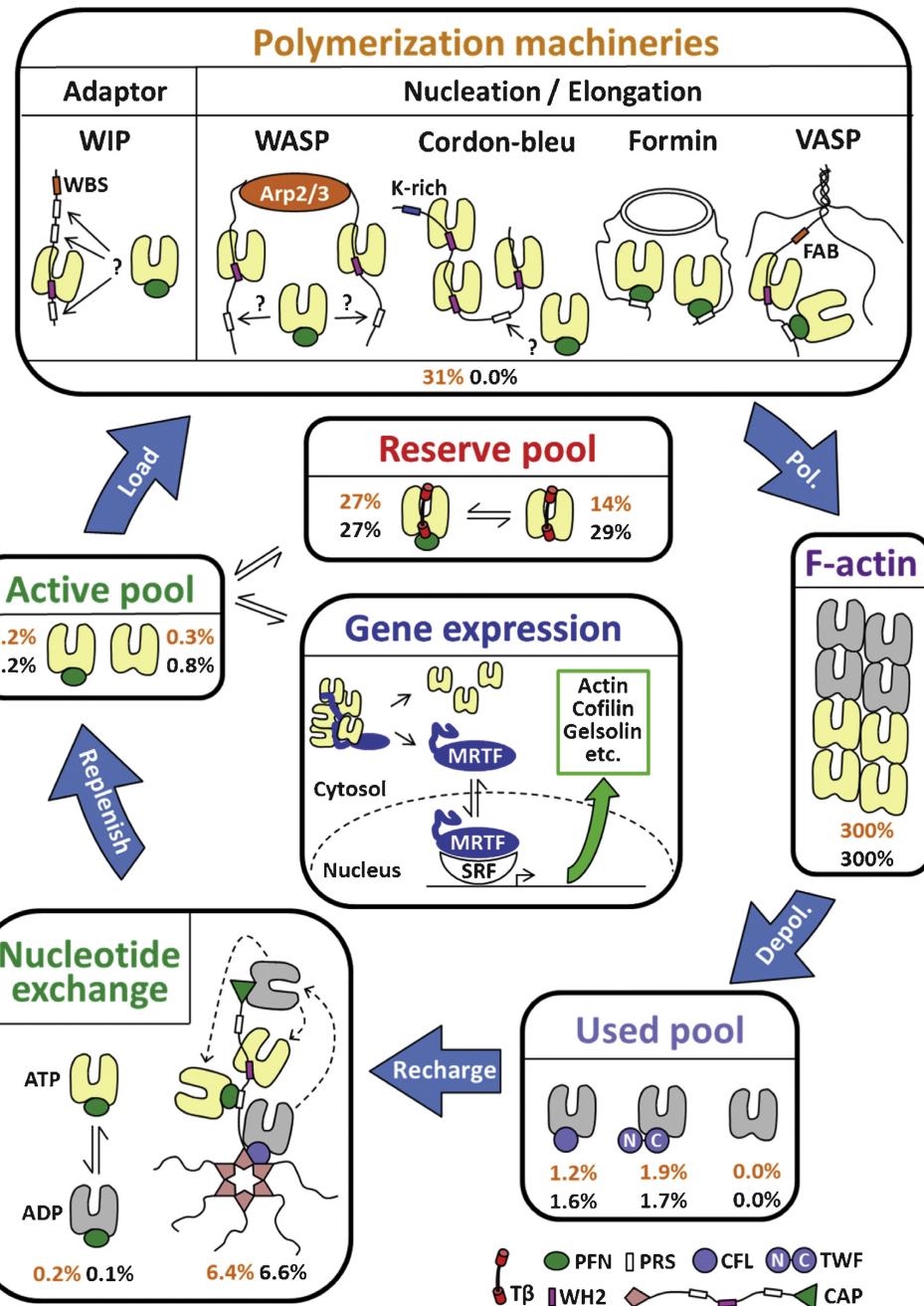
La myosine II, aussi appelée "conventionnelle" est la plus étudiée. Elle est présente en quantité importante dans le muscle, car avec l'actine elle permet la contraction musculaire.

Les myosines ont une tête qui peut se lier à l'actine en filament, un cou qui sert de levier et de régulateur, et une queue qui sert souvent à former un dimère, et éventuellement à se lier à un cargo. On les appelle "chaînes lourdes" par opposition aux "chaînes légères", qui ne sont pas à proprement parler des myosines mais qui sont des protéines qui vont se lier au cou des "chaînes lourdes" pour les réguler.

Par exemple, pour la contraction musculaire, deux chaînes lourdes de myosine II s'associent en dimère par leur queue, et quatre chaînes légères s'ajoutent au niveau des deux cou. Le dimère a alors deux têtes pouvant se lier à l'actine, et va s'en servir comme de deux jambes pour avancer le long du filament. La myosine est une ATPase, lors de l'hydrolyse de l'ATP qui lui est attachée, sa tête va changer de conformation et se détacher de l'actine. L'ADP sera alors libérée, et remplacée par une nouvelle ATP. La tête reprend alors sa conformation initiale, et peu se rattacher au filament. Dans le dimère, chaque tête va faire ainsi un pas successivement et faire avancer le moteur sur le filament en consommant de l'ATP.

Certaines myosines ont un rôle analogue à celui des moteurs moléculaires associés aux microtubules et transportent des molécules le long des filaments, en général en direction de l'extrémité + (seule la myosine VI se déplace en sens inverse).

Les faiseaux anti-parallèles peuvent être liés par des paires de dimères, qui vont marcher en sens opposé sur les deux filaments, et donc les déplacer l'un par rapport à l'autre. Si les deux filaments sont liés par ailleurs dans le réseau, il va être mis sous tension par ces moteurs moléculaires.



2.3 Rôle mécanique de l'actine : du filament au cytosquelette

Le cytosquelette est une structure multi-échelle, allant de l'échelle des moteurs moléculaires et des nucléateurs, à l'échelle de la cellule toute entière, en passant par l'échelle des filaments et des réseaux de filaments. Il peut ressentir et exercer des forces à toutes les échelles.

Dans cette partie, il ne s'agit pas de parler des propriétés mécaniques du cytosol ou de la cellule, mais d'expliquer comment les filaments peuvent générer des forces et comment il réagissent à des forces.

2.3.1 Mécanique du filament d'actine

Le filament d'actine en lui-même est à la fois générateur et senseur de forces.

Longueur de persistance

La longueur de persistance est un moyen de quantifier la corrélation entre l'orientation des différents segments d'un polymère soumis aux fluctuations thermiques. Si l'on considère un polymère de longueur L auquel on attribue une abscisse curviligne s , avec \vec{t}_s la tangente au polymère en s , alors on a la relation :

$$\langle \vec{t}_0 \cdot \vec{t}_s \rangle_L \propto e^{L/\ell_p}$$

Au bout de quelques longueurs de persistance, l'information de l'orientation du polymère en $s = 0$ est perdue.

La longueur de persistance dépend de l'énergie thermique disponible pour agiter le filament. Une manière de définir la rigidité d'un polymère indépendamment de la température consiste à définir un module de courbure comme le produit de la longueur de persistance et de l'énergie thermique :

$$\kappa = \ell_p k_B T$$

Le filament d'actine subit un vieillissement par l'hydrolyse de l'ATP des monomères qui le composent. Le changement de conformation induit par l'hydrolyse de l'actine a des conséquences sur les propriétés mécaniques du filament. Un filament d'actine ATP a une longueur de persistance de 15 micromètres, contre 9 micromètres pour un filament d'actine ADP. Le vieillissement du filament le rend donc plus déformable et plus souple. Les protéines attachées au filament peuvent également, en stabilisant une conformation, changer sa rigidité. Un filament stabilisé par la phalloïdine ou par la tropomyosine voit sa longueur de persistance augmentée à 18 et 20 microns respectivement. Au contraire, la conformation stabilisée par la cofilin n'a qu'une longueur de persistance de 2,2 microns.

Un même filament d'actine peut évidemment être le lieu de toutes ces modifications en même temps. Souvent l'extrémité + des filaments est riche en actine ATP alors que l'extrémité - est riche en actine ADP, ce qui crée un filament plus rigide d'un côté et plus flexible de l'autre.

Couplage traction-torsion

L'hélice que forme le filament peut adopter des conformations différentes, en particulier en ce qui concerne l'angle de rotation entre les monomères successifs. Une force tirant sur le filament va alors favoriser une conformation à faible torsion, ce qui va rendre la fixation de la cofilane, qui stabilise le filament dans une conformation à grande rotation, beaucoup plus difficile. Il en résulte que la cofilane est moins efficace sur les filaments qui sont en tension, induisant une préservation automatique des filaments sous contrainte par rapport aux filaments libres. Au contraire, mDial et la profiline sont plus efficaces sur les filaments soumis à une tension. La conformation de l'actine est alors un senseur de contrainte qui va encourager la préservation et l'élongation des filaments qui ressentent une force de traction.

Les filaments d'actine semi-flexibles peuvent également être courbés, en particulier au voisinage de la membrane. À cause de l'organisation hélicoïdale des monomères, la courbure d'un filament d'actine exerce également une torsion sur ce filament, ce qui rend la modélisation des filaments encore plus complexe. Le facteur de nucléation Arp2/3 se lie plus facilement au côté convexe d'un filament d'actine courbé.

Les myosines

L'action mécanique de la tête de myosine sur le filament d'actine se fait par un changement de conformation à l'échelle de la protéine. La myosine ayant hydrolysé son ATP en ADP + phosphate s'est liée à l'actine. Elle va alors changer de conformation en libérant le phosphate puis l'ADP. Cette dernière étape transforme l'énergie chimique de l'ATP en déplacement mécanique sur le filament d'actine. À l'ajout d'une nouvelle ATP, la myosine se détache.

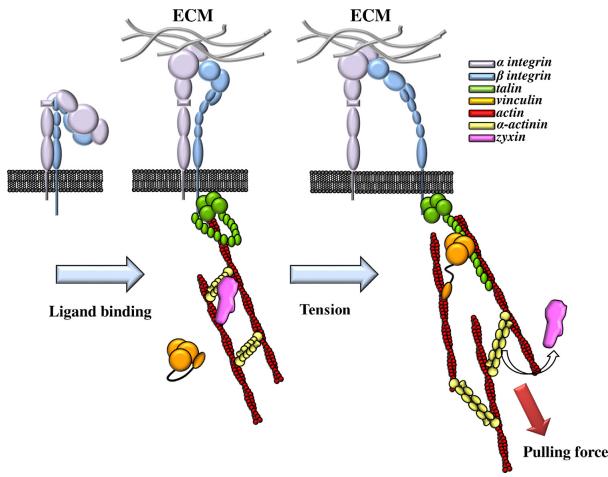
Ces événements sont eux-même dépendant des contraintes qui peuvent être appliqués à la myosine. L'application d'une force de 1,6pN poussant la myosine vers sa conformation finale divise par deux la durée que la myosine va passer attachée au filament en facilitant le changement de conformation. Inversement, l'application de la même force en sens opposé multiplie par deux la durée d'attachement. En fait, la durée que la myosine passe attachée au filament d'actine dépend exponentiellement de la force exercée, dans la gamme -2pN – 2pN.

La croissance du filament comme source de force

2.3.2 Mécanique des adhésions focales

Les sites d'ancre de la cellule dans la matrice extra-cellulaire sont la porte d'entrée des signaux mécaniques dans la cellule. Parmi les molécules qui constituent les adhésions focales, certaines réagissent directement lorsqu'elles sont soumises à des stimulations mécaniques.

Lorsque la transmission des forces est coupée dans la cellule (par l'ajout de drogues qui inhibe la contractilité du cytosquelette), les adhésions focales disparaissent : la tension est nécessaire non seulement à leur constitution, mais



également à leur maintien. Ces contraintes peuvent provenir de forces extérieures mais aussi de la contraction du cytosquelette sous l'action des moteurs moléculaires.

En présence d'une force, les intégrines forment des agrégats et leur affinité pour le ligand augmente grâce à un changement de conformation. La taline relie les intégrines aux filaments d'actine. Dans la conformation initiale, elle est repliée sur elle-même. Lorsqu'elle est mise sous tension entre les intégrines et l'actine, elle se déplie, laissant apparaître des domaines de liaisons à la vinculine qui n'étaient pas précédemment accessibles. La vinculine peut alors recruter d'autres protéines dans les adhésions focales, comme l'α-actinine, qui connecte les filaments d'actine en faisceaux. L'étirement de l'α-actinine change sa configuration et pourrait être à l'origine de la relocalisation de la zyxine en réponse aux contraintes mécaniques.

La filamine, qui lie entre eux des filaments d'actine, peut être dépliée lors de tensions sur les filaments. Son domaine de liaison aux intégrines devient alors accessible, et la filamine ancre alors le cytosquelette à la matrice extra-cellulaire par l'intermédiaire des intégrines. De plus, cela cause un changement de conformation des intégrines qui favorise la formation d'agrégats, renforçant l'adhésion.

Ce ne sont là que quelques exemples de protéines impliquées dans les adhésions focales, il en existe des centaines. Leur exemple montre qu'au premier niveau de contact avec l'environnement mécanique extérieur, les forces sont transmises en signal biologique au niveau de la molécule individuelle, en changeant la conformation des protéines.

2.3.3 Mécanique du cytosquelette d'actine

Les protéines organisant les filaments d'actine vont construire des structures à l'échelle de la cellule spécialisées dans l'exploration, le mouvement, le maintien ou le changement de forme ...

Le cytosquelette a principalement été étudié par la motilité sur des surfaces planes et rigides de cellules comme les fibroblastes et les kératocytes. Cependant, d'autres types cellulaires peuvent s'engager dans des mouvements ou des organisations du cytosquelette très différentes. C'est le cas par exemple des cellules du système immunitaire : les lymphocytes T patrouillant dans le système sanguin sont dotées d'un uropode qui leur permet de s'orienter à contre-courant, la phagocytose requiert une réorganisation locale rapide du cytosquelette à l'échelle de la cellule... C'est également le cas des cellules musculaires différenciées en myofibres, qui ont une organisation du cytosquelette extrêmement spécialisée pour la contraction musculaire, et qui seront décrites plus loin.

Si les organisations décrites ici ont été particulièrement étudiées dans le cadre des fibroblastes et des kératocytes, elles font partie des mécanismes de migration de la plupart des cellules.

Le cortex

La membrane plasmique est soutenue par un réseau d'actine de quelques centaines de nanomètres d'épaisseur appelée le cortex.

Le cortex est constitué d'un mélange entre un réseau ramifié par Arp2/3 et des faisceaux de filaments alignés. Il est attaché à la membrane plasmique par des protéines comme celles de la famille ERM (ezrine, radixine, moesine).

Il contient également des myosines qui mettent le réseau sous tension. Cette tension crée une pression vers l'intérieur de la cellule contrée par la pression osmotique. Lorsque le cortex d'actine est brisé ou détaché de la membrane localement, cette pression interne de la cellule provoque la formation d'un bleb.

Les blebs sont un moyen qu'a la cellule d'explorer l'espace. La protrusion de membrane est alors complétée par un réseau d'actine et des adhésions à partir desquels la cellule va pouvoir se tracter vers l'avant. Ce mode de déplacement a été particulièrement étudié chez les amibes comme *Dictyostelium*.

Le cortex et la membrane sont intimement couplés mécaniquement, au point qu'il est souvent difficile de séparer l'influence mécanique de la tension de la membrane de celle du cortex. En aspirant le cortex dans une micropipette il est possible de tester la résistance mécanique du cortex, et de constater qu'elle dépend de l'activité des myosines.

Le lamellipode

Le lamellipode est une structure plane à l'avant d'une cellule en mouvement, prenant la plupart du temps une forme en croissant.

Sous la membrane, la GTPase Rac active Arp2/3 par l'intermédiaire du complexe WAVE, formant un réseau ramifié. La croissance des filaments pousse alors le bord de la cellule vers l'avant, en s'appuyant sur les adhésions focales à l'arrière du lamellipode. La croissance du réseau ramifié créé par Arp2/3 est maintenu sous contrôle par les protéines de coiffage qui bloquent l'élongation excessive des filaments.

Le flux rétrograde de l'actine entraîne les filaments vers l'arrière de la cellule où ils sont fragmentés et dépolymérisés. Certains sont assemblés en faisceaux contractiles par les myosines.

À l'arrière de la cellule, le réseau d'actine est détruit et les adhésions disparaissent afin de permettre à la cellule d'avancer.

Le lamellipode est principalement lié aux déplacements sur une surface plane, comme en culture cellulaire ou à la surface d'un épithélium.

Les filopodes

Les filopodes sont des protrusions constituées d'un faisceau d'actine dont les extrémités sont pointées vers l'extérieur. La croissance du filopode est principalement liée à celle des filaments du faisceau grâce à l'action des formines ou de Ena/VASP.

Un filopode peut se former à partir de la convergence de filaments provenant d'un réseau branché au bord de la cellule. Des protéines comme la fascine associent alors ces filaments en faisceau rigide, dont la croissance déforme la membrane plasmique.

Les filopodes servent à explorer l'espace, initiant le contact avec d'autres cellules voisines. Certaines bactéries exploitent ce comportement pour être capturées et internalisées par la cellule. Après contact avec la bactérie, le filopode se rétracte rapidement, ramenant la bactérie vers sa cible. La force exercée par un filopode en rétraction peut atteindre 10pN, à des vitesses de l'ordre de 100nm/s.

Fibres de stress et arcs de traction

Les fibres contractiles sont constituées de faisceaux de filaments anti-parallèles associées à des myosines. Les fibres de stress sont des structures qui apparaissent essentiellement dans les cellules étalées sur un substrat plan, beaucoup plus rarement dans une matrice à trois dimensions.

2.4 Rôle régulateur de l'actine nucléaire

L'actine nucléaire est plus difficile à observer que l'actine cytoplasmique, c'est pourquoi son existence et son rôle ont été ignorés pendant longtemps. Aujourd'hui, l'amélioration des techniques de microscopie et le développement de techniques spécifiques (comme des sondes dotées d'un NLS) permettent de confirmer l'existence d'actine nucléaires tant en monomères qu'en filaments. De plus, un grand nombre de protéines liées à l'actine, comme la profilin, la cofilin, Arp2/3, N-WASP, les formines, MICAL et des myosines, sont également présentes dans le noyau, créant toutes les conditions pour qu'un véritable nucléosquelette soit constitué dans la cellule. La profilin et la cofilin aident respectivement à l'export et à l'import des monomères d'actine par les pores nucléaires, jouant ainsi un double rôle de régulation de l'actine nucléaire.

2.4.1 L'actine G nucléaire dans les complexes

80% de l'actine nucléaire est sous forme de monomères. Ces monomères vont d'incorporer dans un grand nombre de complexes indispensables à la transcription de l'ADN en ARN et à la maturation de l'ARN.

Chez les eucaryotes, la transcription de l'ADN en ARN est effectuée par trois ARN Polymérases. Il a été montré que l'actine est nécessaire à l'activité des trois ARN Polymérases. Elle fait partie du complexe pré-initiation de l'ARN Poymérase II qui transcrit les gènes codant pour des protéines en pré-ARN messagers.

L'actine est également liée aux ribonucléoprotéines hétérogènes (hnRNP) présentes sur les pré-ARN messagers pendant et après leur transcription. Les hnRNP empêchent ces ARN messagers qui doivent encore subir des étapes de maturation de se replier sur eux-mêmes (ce qui pourrait interférer avec leur traitement) ou d'être exportés avant d'avoir été traités. Elles peuvent également se lier à la machinerie d'épissage.

Les complexes de remodelage de la chromatine font passer la chromatine d'un état très compact impossible à transcrire à un état où l'expression des gènes devient possible. L'actine fait partie de plusieurs types de complexes de remodelage de la chromatine comme SWI/SNF, RSC et BAF.

L'actine monomérique bloque également l'activité de la DNase I dans le noyau et l'empêche de couper l'ADN en petits morceaux.

2.4.2 Les filaments d'actine et la myosine nucléaires

20% de l'actine nucléaire est présente sous la forme de filaments. Les nucléateurs comme Arp2/3 et les formines sont présents dans le noyau, aux côtés d'elongateurs spécifiques comme l'émerine. Des myosines, comme la Nuclear Myosin 1 (NM1) et la myosine VI sont présentes dans le noyau et ont un rôle essentiel dans la transcription.

L'actine, mais également N-WASP et Arp2/3 sont nécessaires à la transcription efficace par l'ARN Polymérase II. Les drogues empêchant la formation de filaments comme la latrunculine ou la cytochalasine D perturbent la transcription par PolII. La myosine VI s'associe également à PolII.

La NM1 et l'actine se lient à PolII pour la transcription des gènes ribosomaux. La NM1 remodèle localement la chromatine dans une conformation favorable à la transcription.

L'émerine, qui relie des filaments d'actine aux lamines qui enveloppent le noyau, joue un rôle essentiel dans l'organisation de l'hétérochromatine.

Les myosines nucléaires sur le réseau d'actine sont capables de réorganiser les locus de gènes présents sur des chromosomes différents mais partageant un même promoteur. Par exemple, la translocation dans le noyau des récepteurs des hormones stéroïdiennes androgènes et œstrogènes provoque le regroupement des sites des gènes cibles d'une manière active et dépendante de l'activité de l'actine et de la myosine nucléaire 1.

Le noyau contient tous les éléments nécessaires à la formation d'un nucléosquelette mécaniquement fonctionnel : nucléateurs, élongateurs, protéines de pontages et moteurs moléculaires. Ce nucléosquelette est relié au cytosquelette par différentes protéines de la membrane nucléaire qui lient l'actine F, les filaments intermédiaires, les microtubules et les centrosomes. Dans le cas de l'actine, les nesprines et SUN font la liaison entre les filaments d'actine du cytoplasme et les lamines, qui font la liaison avec les filaments nucléaires et la chromatine grâce à l'émerine.

Chapitre 3

MRTF-A

En 2001, MERCHER, BUSSON-LE CONIAT et al. 2001 décrivent une translocation impliquée dans les leucémies aigües mégacaryocytiques. Il s'agit de la translocation d'un gène du chromosome 1 sur le chromosome 22, le gène fusion est nommé One-Twenty-Two-Megakaryocytic-Acute-Leukemia (OTT-MAL). Les fonctions des deux gènes qui ont fusionné sont alors inconnues.

En 2002, deux homologues de la myocardine sont identifiés dans le génome humain par D.-Z. WANG et al. 2002 et sont nommés Myocardin-Related Transcription Factor A et B (MRTF-A/B). MRTF-A correspond au gène du chromosome 22 MAL (ou MKL1) et MRTF-B à un gène du chromosome 16 (MAL16 ou MKL2). Un homologue est également découvert chez la souris et nommé Basic, SAP et Coil-coil (BSAC) (SASAZUKI 2002).

Alors que cette protéine sera appelée dans la suite de cette thèse MRTF-A, elle pourra être identifiée indifféremment comme MAL, MKL1 ou BSAC dans la bibliographie.

3.1 MRTF-A, cofacteur de Serum Response Factor

La fonction principale des protéines de la famille des myocardines est l'activation du facteur de transcription Serum Response Factor.

3.1.1 Serum Response Factor

Serum Response Factor est un facteur de transcription qui fait partie de la famille MADS (MCM-1, Agamous, Deficiens, SRF). SRF est présent en un seul exemplaire dans le génome humain mais peut être transcrit en 4 isoformes. La protéine SRF comprend un signal de localisation nucléaire (NLS), une boîte MADS composée du site de liaison à l'ADN et d'un domaine de dimérisation, et d'un domaine de transactivation auquel se fixent ses cofacteurs.

Un dimère SRF se fixe sur une séquence consensus de nucléotides sur l'ADN appelée boîte CArG : CC(A/T)₆GG, ou sur une séquence CArG-like, qui diffère du consensus d'une seule base, avec une affinité plus faible. Le gène srf contenant lui-même deux boîtes CArG, il est sa propre cible, dans une boucle de rétro-action positive.

3.1.2 Les cofacteurs de SRF : TCF et MRTF

Serum Response Factor n'est lui-même qu'un transactivateur faible, mais il peut être activé par deux grandes familles de cofacteurs : les Ternary Complex Factors, et les Myocardin-Related Transcription Factors.

Les deux familles ne sont pas concurrentes pour se lier à SRF : la plupart des sites sur l'ADN sont spécifiques de l'une ou l'autre des familles de cofacteurs (ESNAULT et al. 2014). Même lorsque les MRTF sont séquestrées dans le cytoplasme, les TCF ne les remplacent pas sur les sites de liaison à SRF.

Un ChIP-seq sur des fibroblastes 3T3 a estimé que 921 gènes sont susceptibles d'être régulés par MRTF/SRF en réponse au sérum, et 76 gènes par TCF/SRF (ESNAULT et al. 2014), ce qui représente entre 3 et 4% du génome. Les MRTF sont donc un élément important de la régulation transcriptionnelle, et l'acteur principal de la régulation de SRF.

Les autres cofacteurs de SRF ?

Ternary Complex Factors

Elk1, Net et SAP-1 sont trois coactivateurs de SRF de la même famille, les TCF. Ils possèdent un domaine qui leur permet de se lier à des sites spécifiques sur l'ADN (Ets Binding Sites). Lorsqu'un site Ets et une boîte CArG sont adjacents, ils forment un Serum Response Element (SRE). La formation d'un complexe TCF-SRF sur un SRE déclenche la transcription du gène cible.

Les TCF sont phosphorylées et activées par les MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases).

La famille Myocardine

Cette famille de cofacteurs de SRF comprend la myocardine, MRTF-A et MRTF-B.

La myocardine se présente sous deux isoformes, une forme cardiaque et une forme spécifique au muscle lisse. Les deux sont exclusivement localisées dans le noyau et sont constitutivement actives, en raison de motifs RPEL déficients ou incomplets.

Les Myocardin-Related Transcription Factors A et B sont exprimées dans un grand nombre de tissus : muscles cardiaques, lisses et squelettiques, neurones, cellules épithéliales, mégacaryocytes ... Contrairement à la myocardine, les MRTF peuvent être séquestrées dans le cytoplasme, ce qui les empêche d'activer SRF et la transcription. La régulation de la localisation de MRTF est

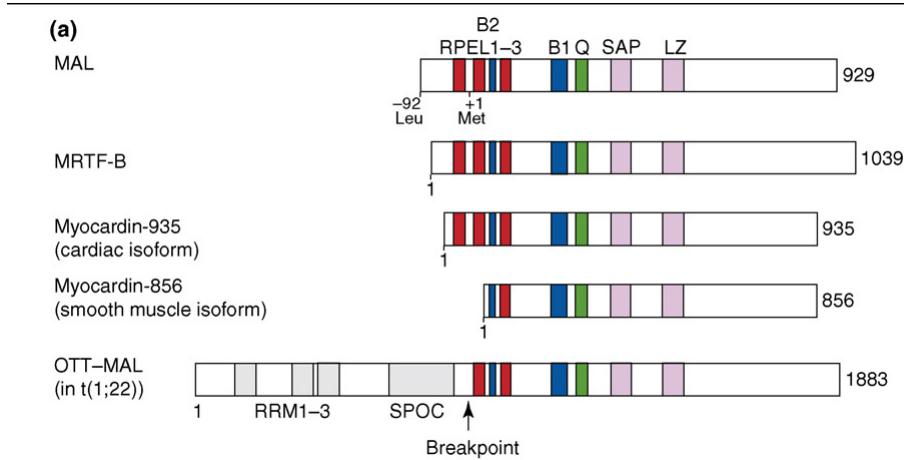


FIGURE 3.1 – La famille de la myocardine d’après POSERN et TREISMAN 2006

assurée par l’actine, qui peut former un complexe avec la partie N-terminale des MRTF.

One-Twenty-Two-Megakaryocytic-Acute-Leukemia (OTT-MAL) est la protéine résultant d’une translocation d’un gène du chromosome 1 à côté du gène MRTF-A. La protéine fusion comprend presque toute la protéine MRTF-A excepté la partie N-terminale.

3.2 MRTF-A, indépendamment de SRF

3.2.1 Transition épithélio-mésenchymateuse et domaine SAP

L’activation de la transcription de la tenascine C en réponse à une stimulation mécanique et à TGF β a été liée à MRTF-A (MAIER et al. 2008). Cependant, cette réponse est indépendante de SRF, ou du domaine liant MRTF-A à SRF (ASPARUHOVA et al. 2011), elle dépend du domaine SAP. S’il est possible que SAP soit capable de lier MRTF-A à l’ADN (ARAVIND et KOONIN 2000), savoir si MRTF-A est capable d’être un facteur de transcription à lui seul, ou s’il a un partenaire facteur de transcription encore inconnu est une question ouverte.

3.2.2 NF- κ B

NF- κ B est un facteur de transcription impliqué dans les voies de signalisation de l’inflammation. MRTF-A et NF- κ B peuvent se lier dans le noyau, et s’empêcher l’un l’autre d’activer leurs promoteurs respectifs sur l’ADN (D. WANG et al. 2012). Cette activité dépend uniquement du domaine C-terminal de MRTF-A, où se trouve le domaine TAD. Ainsi l’activation de la voie TNF α /NF- κ B peut être empêchée par l’activation de BMP4/MRTF-A et inversement.

3.3 Structure de MRTF-A

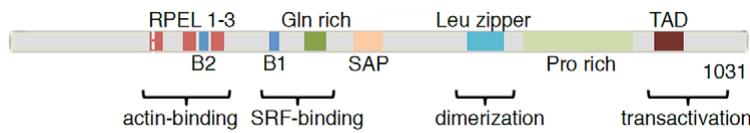


FIGURE 3.2 – Structure de MRTF-A (SCHARENBERG et al. 2014)

3.3.1 Les motifs RPEL

La partie N-terminale de MRTF-A contient trois motifs RPEL consécutifs, qui peuvent se lier aux monomères d'actine (POSERN, MIRALLES et al. 2004, MOUILLERON et al. 2008) avec des affinités variables, les deux premiers motifs se liant plus fortement que le troisième (GUETTLER et al. 2008). La structure détaillée du complexe montre que les trois motifs RPEL se lient à 3 à 5 monomères d'actine selon la concentration en monomères d'actine. (HIRANO et MATSUURA 2011, TREISMAN et al. 2011).

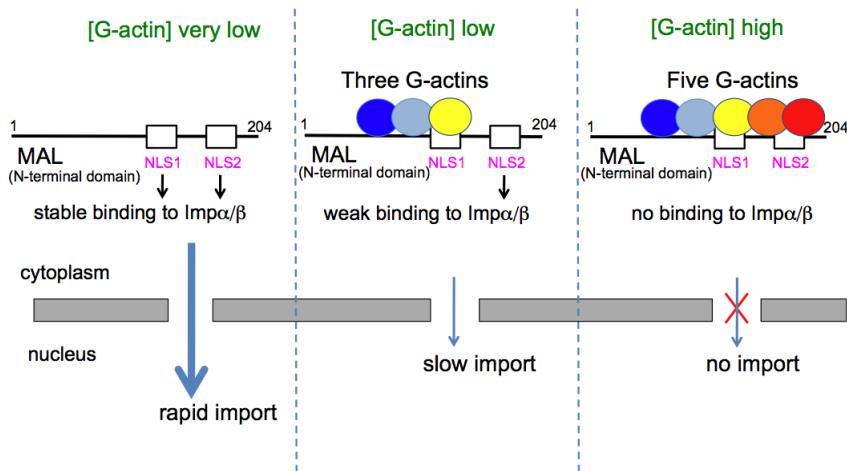


FIGURE 3.3 – D'après HIRANO et MATSUURA 2011

Deux domaines basiques, B2 et B3 sont inclus dans les motifs RPEL et forment un signal de localisation nucléaire (NLS) bipartite (RAJAKYLÄ, Maria K. VARTIAINEN et TREISMAN 2010). Lorsqu'il n'y a pas d'actine sur les motifs RPEL, ce NLS peut se lier au complexe Importine α/β (HIRANO et MATSUURA 2011, RAJAKYLÄ, Maria K. VARTIAINEN et TREISMAN 2010) et MRTF-A est importée dans le noyau de la cellule, où se trouve SRF. En présence de suffisamment de monomères, le NLS est recouvert par l'actine liée aux RPEL, MRTF-A

reste cytoplasmique (Posern 2002, MIRALLES et al. 2003, POSERN, MIRALLES et al. 2004).

MRTF-A est exportée du noyau par Crm1 (M. K. VARTAINEN et al. 2007, K. HAYASHI et T. MORITA 2013). Ces deux articles se contredisent sur la question de la liaison à l'actine : le premier prétend qu'elle est indispensable, le second qu'elle empêche l'export.

Les motifs RPEL sont donc la clé de la régulation de MRTF-A par l'actine : selon la concentration en monomères d'actine, MRTF-A est localisée dans le cytoplasme en cas d'excès et dans le noyau, où se trouve SRF, en cas de manque. Lorsque le domaine RPEL est muté ou absent, la protéine est constitutivement nucléaire (MIRALLES et al. 2003), comme la myocardine, dont les motifs RPEL ne sont plus fonctionnels (GUETTLER et al. 2008).

3.3.2 La région basique et SRF

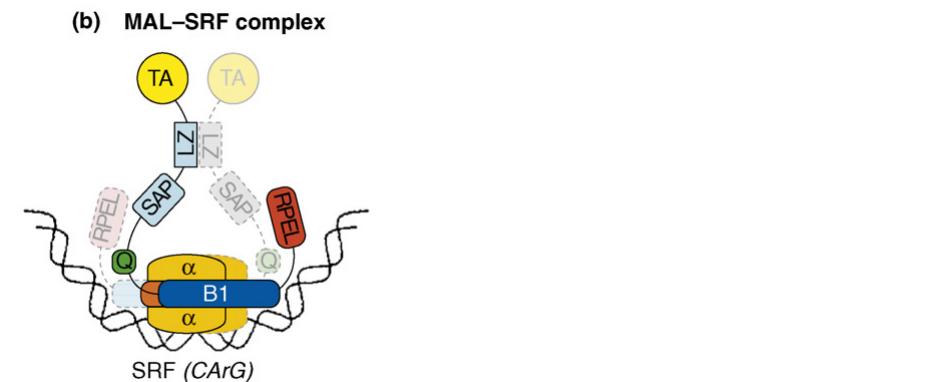


FIGURE 3.4 – D'après POSERN et TREISMAN 2006

La région B1 est le site de liaison de MRTF-A à SRF. MRTF-A s'attache préférentiellement à SRF en dimère (MIRALLES et al. 2003). Le complexe MRTF-A-5actines ne peut pas se lier à SRF et l'activer, la présence de MRTF-A dans le noyau n'est donc pas suffisante pour activer SRF, il faut également que la concentration en G-actine dissocie le complexe (M. K. VARTAINEN et al. 2007).

3.3.3 Leucine zipper et oligomérisation

MRTF-A/B peuvent former des homo ou des hétérodimères (MIRALLES et al. 2003). Un dominant négatif pourra ainsi bloquer une protéine WT dans un hétérodimère non fonctionnel (A. SELVARAJ et R. PRYWES 2003, Bo CEN, Ahalya SELVARAJ et Ron PRYWES 2004, Shijie LI et al. 2005, RAJAKYLÄ, Maria K. VARTAINEN et TREISMAN 2010). La formation des dimères n'est pas indispensable à la fonctionnalité de MRTF-A, les mutations dans cette région

réduisent son efficacité sans l'inhiber totalement (A. SELVARAJ et R. PRYWES 2003). OTT-MAL est également capable de former des hétérodimères avec les MRTF, et donc de perturber leur équilibre.

3.3.4 SAP

Dans les cellules épithéliales, il a été montré qu'un groupe de gènes est activé par MRTF-A et nécessite particulièrement la zone SAP, tout en étant indépendant de SRF (ASPARUHOVA et al. 2011, GURBUZ et al. 2014).

3.3.5 TAD

3.3.6 Phosphorylation

MRTF-A peut être phosphorylée (MIRALLES et al. 2003, Bo CEN, Ahalya SELVARAJ et Ron PRYWES 2004). Dans les neurones, la phosphorylation de MRTF-A par ERK1/2 est même la voie principale de régulation de son activité, car la protéine est toujours nucléaire, mais elle n'active SRF qu'une fois phosphorylée (K. KALITA et al. 2006). Il existe donc au moins une voie d'activation de MRTF indépendante de la régulation de l'actine.

3.3.7 Isoformes

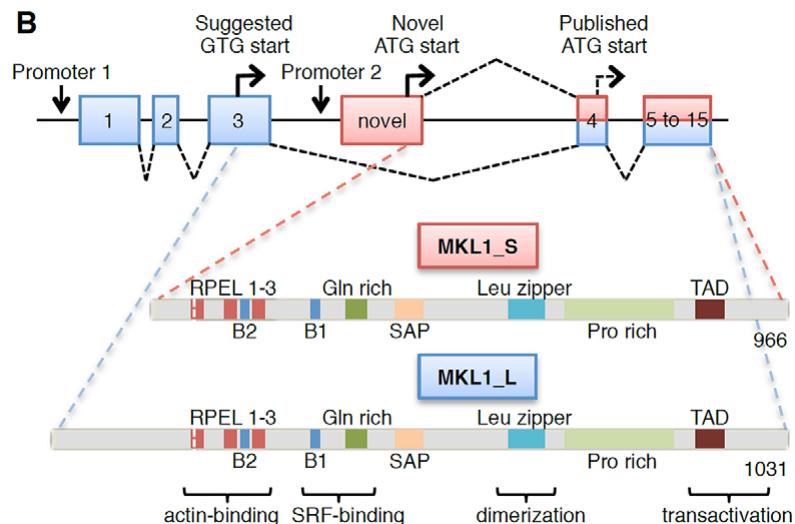


FIGURE 3.5 – D'après SCHARENBERG et al. 2014 : les deux isoformes de MRTF-A

D'après SCHARENBERG et al. 2014, il existe 2 isoformes de MRTF-A chez l'humain, une version longue (MRTF-A_L) et une courte (MRTF-A_S). La

version longue présente 80 acides aminés avant le premier motif RPEL, contre 15 seulement pour la version courte. Cette dernière contient deux TAD de 9 acides aminés (9aaTAD), un à l'extrémité C-terminale, et un à l'extrémité N-terminale spécifique à cet isoforme. Une surexpression de MRTF-A_S est observée en réponse à TGF- β ou à une contrainte cyclique dans les cellules épithéliales.

3.3.8 Conformations

La conformation de MRTF-A en complexe avec cinq actines est très différente de la conformation de MRTF-A liée à l'importine α (HIRANO et MATSUURA 2011). Ddx19 est une protéine capable de remodeler des complexes protéine-ARN, dont le rôle principal est de contribuer à l'export des ARN messagers. Des expériences de FRET ont montré que Ddx19 peut également changer la conformation de MRTF-A, la faisant passer d'une configuration repliée à une configuration dépliée qui permet son attachement à l'importine α/β et son import dans le noyau.

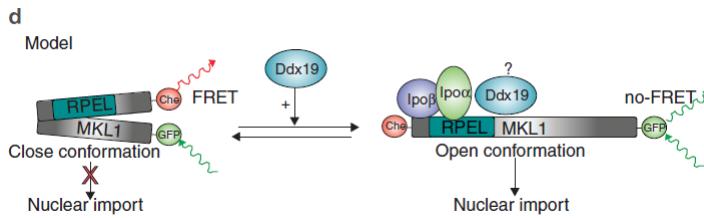


FIGURE 3.6 – Modèle proposé par RAJAKYLÄ, VIITA et al. 2015

3.4 En amont de MRTF-A : voie de signalisation et régulation de l'actine

La régulation de l'activité de MRTF-A se fait principalement par sa localisation intracellulaire qui dépend du réservoir d'actine monomérique disponible. Lorsque l'actine G est disponible pour former un complexe pentamérique avec MRTF-A, ce complexe est confiné dans le cytoplasme où il ne peut jouer aucun rôle dans la transcription. Lorsque l'actine G n'est pas disponible, MRTF-A est importée dans le noyau et peut se lier à SRF pour activer la transcription de ses gènes cibles.

L'actine est le point de convergence d'une grande diversité de signaux extracellulaires ou intracellulaires, biochimiques ou mécaniques, qui vont activer ou inhiber MRTF-A et SRF. Ainsi, tout élément qui va perturber la dynamique de l'actine aura des conséquences sur l'activation de MRTF-A : drogues agissant sur l'actine, protéines liées à l'actine (Actin-Binding Proteins, ABP), voies de signalisations, environnement mécanique.

3.4.1 Actines mutantes

La surexpression d'actine, même sans changer l'équilibre entre les filaments et les monomères, entraîne l'augmentation des monomères disponibles pour former le complexe avec MRTF-A (MIRALLES et al. 2003, M. K. VARTAINEN et al. 2007). MRTF-A est alors localisée dans le cytoplasme.

La surexpression d'une actine-NLS (M. K. VARTAINEN et al. 2007, POSERN, SOTIROPOULOS et TREISMAN 2002) a le même effet. Lorsque l'export est bloqué par la Leptomycine B, MRTF-A est *de facto* bloquée dans le noyau, mais comme elle reste complexée par l'actine, SRF n'est pas activé.

Les mutants non-polymérisables comme R62D ont le même effet que la sur-expression de l'actine, mais en plus efficace (POSERN, SOTIROPOULOS et TREISMAN 2002, MIRALLES et al. 2003, M. K. VARTAINEN et al. 2007, COLLARD et al. 2014).

Les mutants qui polymérisent mieux ou qui forment des filaments plus stables déclenchent l'accumulation nucléaire de MRTF-A et l'activation de SRF (POSERN, MIRALLES et al. 2004).

3.4.2 Drogues agissant sur l'actine

Les drogues agissant sur l'actine sont très souvent utilisées lors des études sur MRTF-A comme contrôles.

La latrunculine B séquestre les monomères d'actine, empêchant leur incorporation dans les filaments. La liaison Latrunculine-Actine est compatible avec l'incorporation dans le complexe avec MRTF-A (MOUILERON et al. 2008). L'ajout de latrunculine B permet donc de conserver l'actine hors des filaments et de la rendre disponible pour former un complexe avec MRTF-A, qui est alors séquestré dans le cytoplasme et inactif (M. K. VARTAINEN et al. 2007, ZHAO et al. 2007, SMITH et al. 2013).

La cytochalasine D coiffe les microfilaments d'actine à leur extrémité + et empêche leur polymérisation et leur dépolymérisation. Contrairement à la latrunculine, elle est incompatible avec la formation du complexe car l'organisation de l'actine dans le complexe actines-RPELs est très différente de l'organisation dans les filaments (TREISMAN et al. 2011). Par conséquent, la cytochalasine séquestre l'actine hors de portée à la fois des filaments et de MRTF-A, qui est alors importée dans le noyau et activée. (MIRALLES et al. 2003, M. K. VARTAINEN et al. 2007, SMITH et al. 2013) Le Swinholid A séquestre des dimères d'actine et fonctionne de manière semblable. (MIRALLES et al. 2003, M. K. VARTAINEN et al. 2007).

Le Jasplakinolide augmente la polymérisation de l'actine, diminuant la disponibilité de l'actine monomérique et entraînant l'accumulation de MRTF-A dans le noyau (MIRALLES et al. 2003, M. K. VARTAINEN et al. 2007, SMITH et al. 2013).

3.4.3 Actin-Binding Proteins

L'équilibre dynamique de polymérisation de l'actine dans la cellule est régulée par de nombreuses protéines impliquées dans d'encore plus nombreuses voies de signalisation.

De manière générale, les protéines qui vont favoriser la formation ou la stabilité des filaments, comme la profiline, Arp2/3, les formines mDia (CHAN et al. 2010, BAARLINK, H. WANG et GROSSE 2013) ou l'émerine (HO et al. 2013), seront à l'origine d'une accumulation nucléaire de MRTF-A, car elle vont appauvrir les réserves de monomères d'actine.

Lorsque la voie RhoA est activée, la cofiline est phosphorylée, ce qui l'inactive. L'inactivation de la cofiline stabilise les filaments d'actine, et donc l'accumulation nucléaire de MRTF-A (ZHAO et al. 2007).

La thymosine β , comme la latrunculine, séquestre les monomères d'actine avec une stoechiométrie de 1 :1. Mais contrairement à celle-ci, la thymosine β empêche l'intégration des monomères dans le complexe avec MRTF-A. Lors d'une surexpression de T β 4, MRTF-A est donc nucléaire et SRF activé (Tsuyoshi MORITA et Ken'ichiro HAYASHI 2013).

3.4.4 La voie RhoA

RhoA (Ras homolog gene family, member A) est une protéine de la famille des petites GTPases dont le rôle est de réguler le cytosquelette d'actine. Ce rôle fait de RhoA une voie de signalisation importante pour MRTF-A.

RhoA a deux cibles principales : ROCK (Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase 1) et les formines mDia (mammalian Diaphanous). La phosphorylation de ROCK entraîne la phosphorylation de LIMK (LIM domain kinase) qui désactive la cofiline. L'activation des formines et le blocage de la cofiline concourent à la formation de filaments d'actine plus longs et plus nombreux et à la réduction des réserves de monomères d'actine.

La voie RhoA peut être activée par un grand nombre de signaux biochimiques ou mécaniques. ILK (Integrin Linked Kinase) associée à une stimulation mécanique (MAIER et al. 2008), les androgènes (SCHMIDT et al. 2012), la thrombopoïétine (SMITH et al. 2013), le sérum (SOTIROPOULOS et al. 1999) et les hormones du rythme circadien (GERBER et al. 2013) activent la voie de signalisation RhoA/actine/MRTF-A/SRF. Une déformation mécanique constante (ALBINSSON 2004, ZHAO et al. 2007, CHAN et al. 2010) ou cyclique (KUWAHARA et al. 2010), un substrat dur (HUANG et al. 2012) sont des signaux mécaniques qui vont également activer la voie RhoA.

3.4.5 Un cas particulier : MICAL2

La signalisation par MRTF-A/B est importante pour le développement des neurones (Katarzyna KALITA, KUZNIEWSKA et KACZMAREK 2012), cependant contrairement aux fibroblastes et aux myoblastes, les neurones font l'expérience de contraintes et de réorganisation du cytosquelette beaucoup plus limités. Il

n'y a que rarement formation de fibres de stress dans les neurones par exemple. La polymérisation d'actine dans ces cellules n'est pas suffisante pour déclencher la voie MRTF-A de la même manière que dans d'autres types cellulaires.

Les protéines de la famille MICAL sont capables d'oxyder la méthionine 44 de l'actine, ce qui l'empêche de faire partie d'un filament. Cette oxydation peut avoir lieu sur l'actine déjà recrutée dans un filament, causant sa dépolymérisation (HUNG, PAK et TERMAN 2011). L'actine oxydée est également sélectivement exportée du noyau, une actine mutante M44Q constitutivement oxydée est confinée dans le cytoplasme (LUNDQUIST et al. 2014).

MICAL2 est un membre de cette famille particulièrement présent dans le noyau, où il peut contrôler la dépolymérisation de l'actine nucléaire. L'expression d'un mutant dominant négatif de MICAL2 cause l'apparition de longs filaments d'actine dans le noyau, car son activité de dépolymérisation des filaments est interrompue (LUNDQUIST et al. 2014).

L'activation de MICAL2 ou sa surexpression entraîne ainsi paradoxalement une accumulation nucléaire de MRTF-A : l'actine du noyau est oxydée, dépolymérisée puis expulsée du noyau, réduisant ainsi la réserve globale d'actine disponible dans le noyau (LUNDQUIST et al. 2014).

Lorsque une atrophie musculaire est causée par la dénervation, MICAL2 est sous-exprimée dans les fibres musculaires, ce qui participe au maintien de concentrations importantes d'actine monomérique dans le noyau et donc à l'exclusion de MRTF-A (COLLARD et al. 2014).

MICAL2 est donc une voie d'activation de MRTF-A indépendante de RhoA, et donc l'activité se concentre sur le réservoir d'actine nucléaire de la cellule.

3.5 Rôles de MRTF-A

Depuis sa découverte au début des années 2000, de nombreux rôles de MRTF-A ont été mis en évidence dans des types cellulaires et dans des tissus très divers.

3.5.1 Embryogenèse

Les MRTF sont exprimées dès le jour 10 du développement de l'embryon (D.-Z. WANG et al. 2002), dans tous les tissus. La délétion de MRTF-B entraîne l'échec de la gastrulation, et donc une fin précoce de l'embryogenèse (Katarzyna KALITA, KUZNIEWSKA et KACZMAREK 2012). Au contraire, 60% des mutants MRTF-A^{-/-} sont viables et atteignent l'âge adulte, les autres étant perdus pendant l'embryogenèse car souffrant de défauts cardiaques. Les mutants survivants sont dépourvus de ces anomalies cardiaques, et vivent jusqu'à l'âge adulte (S. LI et al. 2006, SUN et al. 2006). Cependant, les femelles souffrent d'un défaut de formation de la glande mammaire, lié à une apoptose précoce des cellules myoépithéliales qui déclenchent l'éjection du lait. Il apparaît donc que chez la souris, tandis que MRTF-B est indispensable à l'embryogenèse, l'absence de MRTF-A peut être compensée dans la plus grande partie des tissus. Les souris possédant un gène mutant dominant négatif de MRTF-A sont en revanche de plus petite

taille, ne bougent pas et ne survivent que quelques jours, principalement à cause des défauts de musculature de leur diaphragme (Shijie LI et al. 2005).

3.5.2 Régulation de la masse musculaire

Serum Response Factor a pour gènes cibles un grand nombre de gènes liés au cytosquelette et à la différenciation musculaire.

Lorsque SRF est désactivé dans le muscle squelettique de souris adulte (souris HSA-Cre-ERT^{T2} :srf^{flox/flox}), l'hypertrophie compensatoire de ses muscles est bloquée (GUERCI et al. 2012). Les cellules satellites sont moins nombreuses, et ne fusionnent pas avec les fibres musculaires. Au contraire, un SRF constitutivement actif protège de l'atrophie liée à une immobilisation ou à une dénervation. Suite à une dénervation, MRTF-A est exclue des noyaux des fibres musculaires, et donc incapable d'activer SRF. Une MRTF-A constitutivement nucléaire protège contre l'atrophie induite par la dénervation (COLLARD et al. 2014). C'est donc la régulation de la localisation de MRTF-A dans les fibres musculaires qui régule l'activité de SRF et l'atrophie ou l'hypertrophie en réponse aux contraintes mécaniques.

Dans les myoblastes murins C2C12, un dominant négatif MRTF-B, capable d'interférer avec l'activité des deux MRTF, bloque la différenciation musculaire en myotubes et diminue leur taux de duplication (A. SELVARAJ et R. PRYWES 2003, B. CEN et al. 2003). Les souris DN-MRTF-A montrent d'ailleurs un phénotype myopathique.

3.5.3 Transition épithéliale-mésenchymale

La transition épithélio-mésenchymateuse est le processus par lequel des cellules, sous l'influence de signaux extérieurs, vont perdre leur type épithéial (expression de l'E-cadherine, polarisation, organisation en monocouche jointive ...) et acquérir un phénotype mésenchymal (expression de N-cadherine, motilité plus importante, fabrication de matrice extra-cellulaire ...). Plusieurs marqueurs de l'EMT, comme la vimentine ou l'actine du muscle lisse α Smooth Muscle Actin sont des cibles de SRF.

La conjonction d'un signal biochimique, TGF β (Transforming Growth Factor), et d'un signal mécanique déclenche l'activation de la voie de signalisation RhoA/actine/MRTF-A/SRF. Les signaux mécaniques déclencheurs peuvent être très divers, locaux ou globaux, cycliques ou statiques : membranes étirées cycliquement (MAIER et al. 2008), îlots de fibronectine (GOMEZ et al. 2010, CONNELLY et al. 2010), gels de polyacrylamides de différentes rigidités (HUANG et al. 2012), microbilles magnétiques recouvertes de collagène (CHAN et al. 2010).

Des anomalies dans la transition épithélio-mésenchymateuse ont été liées aux fibroses pulmonaires et hépatiques.

3.5.4 Différenciation des mégacaryocytes

Les souris MRTF-A KO ont une genèse anormale des mégacaryocytes, les cellules de la moelle osseuse qui sont à l'origine des plaquettes. Les gènes contrôlant la différenciation de ces cellules sont sous le contrôle de SRF. La thrombopoïétine active la voie RhoA/MRTF-A/SRF.

3.5.5 Rythme circadien

Les plantes, les animaux et même certains organismes unicellulaires possèdent une horloge biologique d'environ 24h, calquée sur l'alternance jour/nuit. Un certain nombre de processus biologiques dépendent des hormones produites par cette horloge dans le cerveau et propagées dans le sang vers l'ensemble des organes, comme le rythme veille/sommeil, la température corporelle, le péristaltisme de l'intestin, la sécrétion des hormones de croissance ...

SRF fait partie des facteurs de transcription dont la régulation est sensible au rythme circadien et contient dans ses cibles un certain nombre de gènes régulant le rythme circadien (ESNAULT et al. 2014). Une stimulation par ajout de sérum permet de réinitialiser l'horloge biologique.

Dans le foie de rats et de souris, la polymérisation de l'actine est maximale au lever du jour (fin de période d'activité pour les rongeurs nocturnes) et minimale au crépuscule (GERBER et al. 2013). De manière synchronisée, les MRTF sont nucléaires et SRF est activé au lever du jour, et les MRTF sont cytoplasmiques et SRF désactivé au couche du soleil. Le niveau d'expression de l'actine et de MRTF ne varie pas au cours de la journée. Chez l'humain, espèce diurne, ce rythme est inversé mais également présent.

3.5.6 MRTF-A et cancers

Le rôle de MRTF-A dans l'invasion, les métastases et la prolifération cancéreuse est complexe. Dans l'exemple du cancer du sein, on a attribué à MRTF-A un rôle antiprolifératif en tant que facteur de transcription de l'Eplin α (Epithelial protein lost in Neoplasm), protéine qui est inversement corrélée avec la mortalité et l'invasion cancéreuse (Laura LEITNER et al. 2010). Cependant, dans les cancers du sein sensibles aux œstrogènes, l'activation de MRTF-A favorise la transition vers un type insensible au contrôle hormonal (KERDIVEL et al. 2014) et MRTF et SRF sont nécessaires à l'adhésion, à la motilité et à l'invasion dans des lignées issues de cancers du sein et de mélanomes (MEDJKANE et al. 2009). Les gènes contrôlés par MRTF-A indépendamment de SRF semblent être liés à un mauvais pronostic (GURBUZ et al. 2014).

L. LEITNER et al. 2011 montre bien le rôle complexe que peut avoir la régulation d'un élément du cytosquelette dans différents contextes : MRTF-A augmente l'adhésion dans deux types cellulaires, des cellules épithéliales non-invasives et des cellules tumorales de cancer du sein, mais l'effet sur la motilité est opposé dans les deux types. Dans les cellules mammaires épithéliales, l'augmentation de l'adhésion causée par la surexpression de MRTF-A cloue les

cellules sur place : l'adhésion est trop forte et les cellules ne sont plus capables de se détacher pour avancer. Inversement, l'adhésion était le facteur limitant dans les cellules tumorales. Avec la surexpression de MRTF-A, elles adhèrent mieux et se déplacent plus efficacement.

L'activation de la voie RhoA/MRTF/SRF est liée à l'agressivité des tumeurs de la prostate (SCHMIDT et al. 2012), et une mutation du premier intron de MRTF-A a été identifiée dans des triplets homozygotes dont deux ont développé un lymphome de Hodgkin (BJORKHOLM et al. 2013), sans qu'un lien précis soit établi.

Le cas particulier d'OTT-MAL

OTT-MAL est une protéine issue de la fusion d'un gène du chromosome 1 également nommé RBM15, qui régule le facteur de transcription RBPJ (recombination signal binding protein for immunoglobulin κ J region), et MRTF-A sur le chromosome 22, qui régule SRF. La présence de cette mutation a été reliée à des leucémies à mégacaryoblastes (MERCHER, BUSSON-LE CONIAT et al. 2001). La protéine fusion est toujours localisée dans le noyau et active SRF (DESCOT et al. 2008), elle peut former des hétérodimères avec MRTF-A et donc interférer avec les protéines saines. Mais c'est l'activation de RBPJ qui est déterminante pour ses propriétés oncogènes dans les mégacaryocytes (MERCHER, RAFFEL et al. 2009).

3.5.7 Réorganisation de la chromatine

En plus de son rôle de régulateur de la transcription des cibles de SRF, plusieurs effets de MRTF-A sur l'organisation de la chromatine ont été mis en évidence. L'activation de MRTF-A et de différents mutants montre une augmentation de l'accétylation de l'histone H3, de la quantité d'euchromatine et de l'activité transcriptionnelle (FLOURIOT et al. 2014). Cette fonction de MRTF-A nécessite son domaine C-terminal. Les fibroblastes 3T3 cultivés sur des motifs de grande taille montrent une plus grande quantité de MRTF-A dans le noyau, associée à une histone déacétylase HDAC3 séquestrée dans le cytoplasme et une plus grande activité transcriptionnelle (JAIN et al. 2013).

L'histone méthyltransférase SMYD3 coopère avec MRTF-A, sans interaction direct, pour réguler la transcription du gène MYL9 codant pour la Myosin Light Chain (LUO et al. 2014).

Chapitre 4

De la cellule au muscle

Les muscles représentent environ 40% de la masse totale d'un humain adulte. Ils participent à tous les phénomènes indispensables à notre vie : ils nous permettent de nous mouvoir, d'exercer des forces sur notre environnement, mais aussi de respirer, de faire circuler le sang, de digérer... Il existe trois principaux types de muscles : lisses, cardiaque, et squelettiques. Les muscles lisses, comme ceux que l'on trouve le long du tube digestif ou des vaisseaux sanguins, mais aussi dans la vessie ou l'utérus, ne peuvent pas être contrôlés volontairement. Le muscle cardiaque, présent uniquement au niveau du cœur, a une organisation spécifique qui lui permet de maintenir des contractions régulières et permanentes, assez puissantes pour faire circuler le sang dans le système circulatoire. Les muscles squelettiques sont les seuls que nous contrôlons volontairement. Comme leur nom l'indique, ils s'ancrent au squelette par l'intermédiaire des tendons, et ce sont eux qui nous permettent de bouger nos membres. Il en existe environ 640, de toutes tailles, des minuscules muscles contrôlant les mouvements des yeux à l'énorme quadriceps.

4.1 Organisation du muscle squelettique

Dans le chapitre premier, une cellule typique et peu différenciée a été présentée, semblable aux précurseurs du muscle. Les cellules qui composent les muscles ont une organisation bien différente. En partant des cellules et des protéines qui ont été décrites dans les chapitres précédents, nous allons reconstituer l'architecture du muscle.

4.1.1 Du myoblaste au myocyte

Les myoblastes sont les cellules progénitrices du muscles. Les C2C12 sont une lignée immortalisée de myoblastes murins, mais des myoblastes primaires peuvent également être mis en cultures *in vitro*. La différenciation se produit quand les myoblastes sont suffisamment nombreux et que les facteurs de crois-

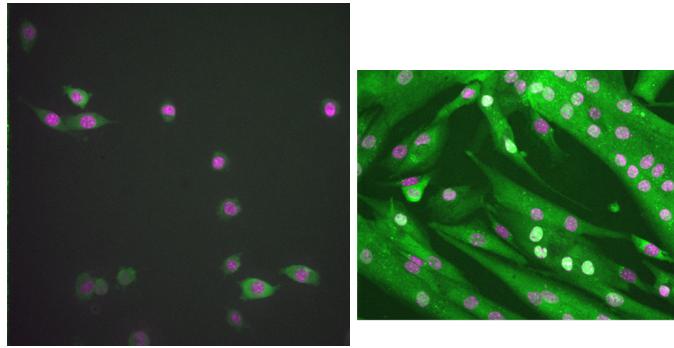


FIGURE 4.1 – Myoblasts primaires infectés avec un plasmide MRTF-A GFP, et myotubes obtenus à partir de myoblastes primaires après 4 jours de différenciation *in vitro*. En magenta, le noyau marqué au DAPI.

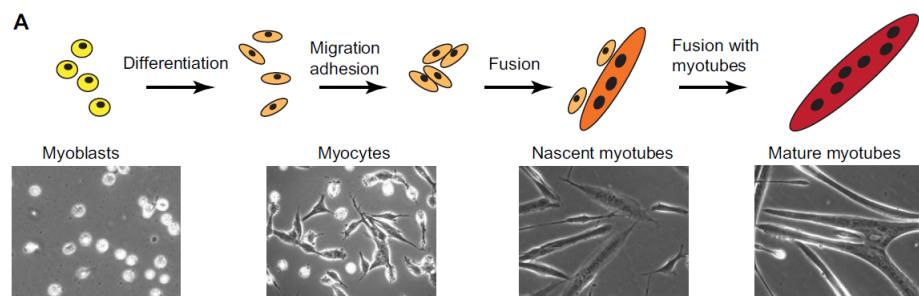


FIGURE 4.2 – Étapes successives de la différenciation des myoblastes en myotubes chez la souris, d'après **Abmayr**

sance qui les maintiennent en prolifération viennent à manquer. Les myoblastes se mettent alors à sécréter de la fibronectine, la liaison intégrine/fibronectine étant indispensable à la différenciation.

Les myoblastes vont alors s’aligner, puis fusionner entre eux pour former des myotubes, qui sont des cellules pluri nucléées et allongées. Les myoblastes étendent autour d’eux des lamellipodes et des filopodes pour contacter les cellules voisines. Au niveau de ces contacts, les compositions des lipides de la membrane change, on trouve un grand nombre de protéines comme les M-cadhérines, les intégrines et les filamines qui assurent un lien avec le cytosquelette. Ce dernier est réorganisé localement : un réseau dense se forme sous la membrane, mis sous tension par la myosine 2A. Le myoblaste envahit le myotube à l'aide de podosomes quasiment exclusivement composés d'actine en filaments, avant que des pores se forment entre les deux cellules pour achever la fusion.

Une fois le myotube formé, il mûrit pour devenir une myofibre en développant une organisation spécifique de l'actine et de la myosine.

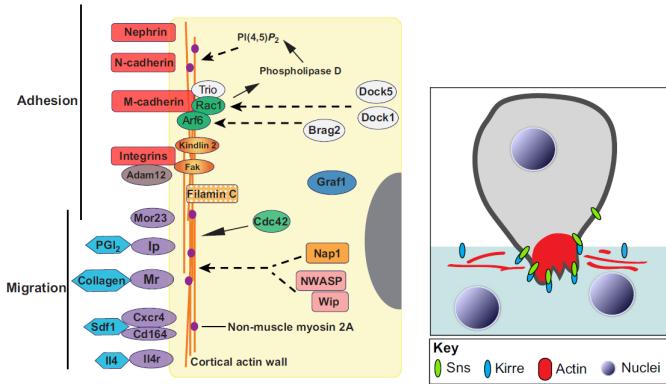


FIGURE 4.3 – Protéines impliquées dans la différenciation des myoblastes et invasion d'un myotube par un myocyte avant la fusion.

4.1.2 Une organisation spécifique de l'actine

À l'intérieur d'un myocyte totalement différencié, l'actine est organisée en unités appelées les sarcomères.

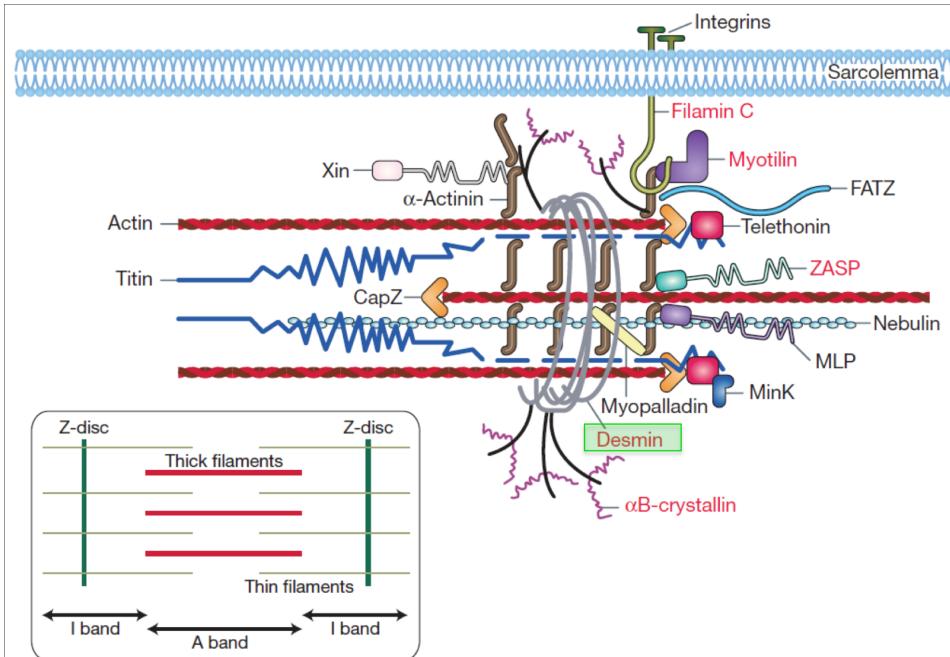
Un sarosome est composé de filaments d'actine et de filaments de myosines qui sont dotés de milliers de têtes de myosines. Le mouvement des têtes de myosines sur le filament d'actine fait coulisser les deux filaments l'un par rapport à l'autre, ce qui crée la contraction musculaire.

Afin que les filaments d'actine, dont nous avons vu au chapitre 2 qu'ils sont ordinairement très dynamiques, maintiennent leur taille, ils sont coiffés aux deux extrémités par CapZ d'un côté et par la tropomoduline de l'autre. Les nébulines, de très longues protéines qui peuvent se lier à environ 200 actines en filament, sont soupçonnées de servir d'échelon pour fixer la longueur des filaments d'actine dans les sarcomères.

Autour des filaments d'actine, la tropomyosine, liée également à la troponine, régule la liaison entre le filament d'actine et le filament de myosine, en recouvrant ou découvrant les sites de liaisons des têtes de myosines à l'actine, et le maintient polymérisé.

Les filaments de myosine sont maintenus alignés grâce à la structure de la bande M, et les filaments d'actine par le disque Z.

Au niveau de la bande M, les filaments de myosine se lient aux protéines M, aux myomésines et aux titines. La titine est une protéine géante qui maintient l'intégrité du sarosome en se liant à la bande M, au disque Z et aux filaments de myosine. Elle présente une structure enroulée sur elle-même, et fonctionne comme un ressort qui stocke de l'énergie quand le sarosome change de longueur, et contribue ainsi à maintenir l'intégrité de l'ensemble de la structure. Les myomésines ont une structure semblable mais sont plus courtes. Elles forment des ponts entre les filaments de myosine pour les maintenir dans une structure qui ressemble à un réseau hexagonal.



Schematic drawing of components of the Z-disc

Expert Reviews in Molecular Medicine © 2008 Cambridge University Press

FIGURE 4.4 – Organisation schématique du disque Z, d'après ferrer _ 2008

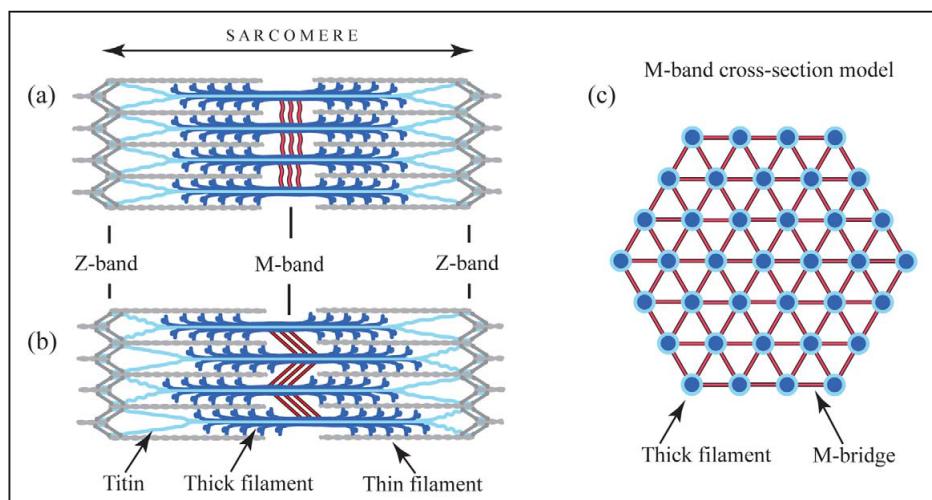


FIGURE 4.5 – Organisation dans les deux plans des filaments de myosine au niveau de la bande M, d'après tskhovrebova _ 2012

Au niveau du disque Z, un grand nombre de protéines viennent assurer l'ancre des filaments d'actine et l'organisation du sarcomère. Une partie d'entre elles sont également partie prenantes de cascades de signalisation. L' α -actinine, déjà évoquée précédemment en tant que protéine liée à l'actine, assure vis-à-vis de l'actine la même mission que les myomésines pour les filaments de myosine : elle lie les filaments entre eux pour former un réseau hexagonal, et lie également les titines. Par l'intermédiaire de la filamine C, l' α -actinine relie les filaments d'actine du sarcomère aux intégrines qui assurent l'ancre avec la matrice extra-cellulaire. La desmine, le filament intermédiaire du cytosquelette s'enroule autour du disque Z pour maintenir sa structure, et l' $\alpha\beta$ -cristalline l'empêche de former des agrégats.

4.1.3 Rôle de la voie RhoA/MRTF-A/SRF

Parmi les gènes cibles de SRF, on trouve un grand nombre de protéines indispensables à la constitution des sarcomères : tous les différents gènes d'actine et en particulier l' α Skeletal Actin , des myosines (MHC9,myo16,myoIE), des α -actinines, des intégrines et des tropomyosines ([selvaraj_2004](#) [charvet_2006](#) [ESNAULT et al. 2014](#)).

MyoD, facteur de transcription de la famille des Myogenic Regulatory Factors et marqueur de la différenciation en cellule musculaire, contient un Serum Response Element [l'honore_2003](#) et est activé par MRTF-A/SRF ([Mokalled_2011](#)

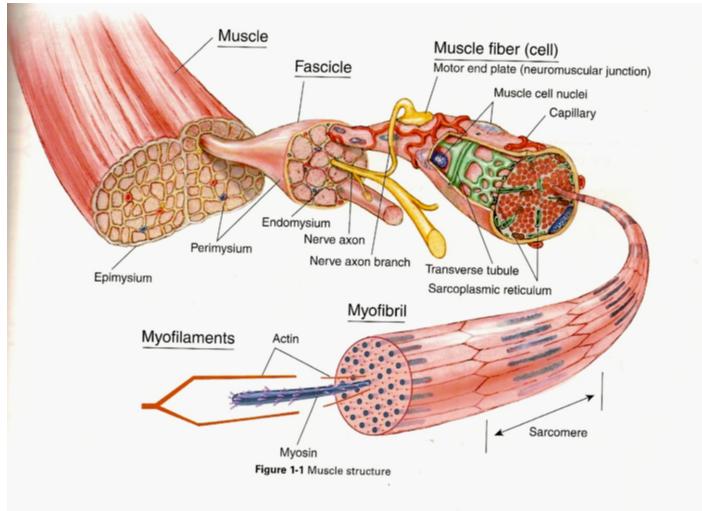
Il suffit qu'un seul des maillons de la voie RhoA/MRTF/SRF manque pour que la différenciation en cellule musculaire échoue.

In vivo dans des souris ayant une délétion conditionnelle de SRF dans les muscles, on observe une diminution de l'expression de la tropomyosine et de l' α actine du muscle squelettique, corrélés à des défauts dans la croissance des myofibres, une désorganisation des sarcomères et une hypotrophie musculaire ([charvet_2006](#) Shijie LI et al. [2005](#)). *In vitro*, un SRF dominant négatif bloque la différenciation de myoblastes C2C12 en myotubes [wei_1998](#)

Les souris dominant négatif MRTF-A sont viables mais présentent une hypotrophie musculaire qui dépend du niveau d'expression de MRTF-A, une fibrose, et des noyaux positionnés au centre des fibres musculaires, ce qui les désorganise Shijie LI et al. [2005](#). *In vitro*, la différenciation des C2C12 nécessite également la présence des MRTF A. SELVARAJ et R. PRYWES [2003](#).

Bloquer RhoA avec un dominant négatif [wei_1998](#) empêche également la différenciation.

KAWAUCHI et al. [2012](#) détaillent un peu plus loin ces voies de signalisations impliquées dans la différenciation musculaire, en montrant que la signalisation passe par p130Cas, les intégrines β 3 et ILK, qui désactivent à la fois ERK1/2 (ce qui empêche la phosphorylation de MRTF-A et donc promeut son accumulation nucléaire, et met hors jeu les TCF), et la cofline (ce qui promeut l'actine polymérisée). Ils montrent que p130Cas contribue à maintenir l'actine polymérisée et MRTF-A présent dans le noyau alors que la différenciation se fait dans un milieu pauvre en sérum, où RhoA est diminué.



4.1.4 De la fibre au muscle

Les sarcomères mis bout à bout les uns à la suite des autres forment des myofibrilles. Les myofibrilles adjacentes sont liées et alignées au niveau de leurs disques Z, afin que les contractions se fassent de manière synchronisée.

Dans une myofibre, on trouve de nombreuses myofibrilles liées les unes aux autres, de l'ordre de la dizaine, qui occupent la majeure partie de l'espace disponible. Les multiples noyaux sont repoussés en périphérie de la cellule.

Les myofibres sont regroupées en faisceaux de quelques dizaines de fibres dans un tissu conjonctif composé principalement de collagènes, faisceaux qui sont eux-mêmes regroupés pour former le muscle lui-même. Le tissu conjonctif confère une résistance passive aux muscles et les relie aux tendons qui les fixent sur les os.

Les capillaires sanguins et les nerfs contrôlant les contractions musculaires sont également encapsulés dans ce tissu conjonctif.

Différents types de muscles

Les fibres musculaires ont toutes une organisation similaire, mais ne sont pas toutes identiques. On peut distinguer 2 types majeurs de fibres musculaires : les fibres lentes et les fibres rapides.

Les fibres lentes servent aux efforts de longue durée et de faible force, comme par exemple le maintien de la posture, elles se contractent lentement. Elles sont riches en mitochondries et en capillaires sanguins, car leur alimentation en énergie se fait principalement par la consommation d'oxygène. Les fibres rapides permettent des mouvements puissants, développant une grande force. Elles sont riches en glycogène, dont elles tirent la majeure partie de leur énergie.

4.2 La contraction musculaire

4.2.1 Mécanismes moléculaires

Le signal de contraction musculaire arrive du système nerveux par un neurone moteur, qui est attaché à une fibre musculaire par la plaque motrice. Lorsque le signal nerveux est transmis au niveau de la synapse, la membrane de la myofibre est dépolarisée, ce qui aboutit à libérer des ions Calcium du Réticulum Sarcoplasmique (l'équivalent pour la cellule musculaire du Réticulum Endoplasmique lisse).

Les ions Calcium libérés se lient à la troponine C, qui est présente sur la tropomyosine qui décore les filaments d'actine dans le sarcomère. La tropomyosine est déplacée sur le filament d'actine, laissant apparaître les sites de liaison à la myosine, qui étaient cachés.

Les têtes de myosine s'attachent au filament d'actine, puis l'ATP qu'elles contiennent est hydrolysée en ADP+Pi. Le phosphate est ensuite libéré, ce qui provoque un changement de conformation de la tête de myosine, qui avance sur le filament, puis l'ADP est relâchée à son tour, ce qui incline encore plus la tête de myosine.

À ce moment, les filaments d'actine et les filaments de myosine coulissent les uns par rapport aux autres, ce qui raccourcit la longueur totale du sarcomère. C'est la contraction musculaire.

En l'absence d'ATP, le phénomène s'arrête à cette étape : les filaments d'actine et de myosine sont attachés les uns aux autres. Le muscle est immobilisé, c'est l'origine de la rigidité cadavérique.

Lorsqu'elle est présente, l'ATP peut alors remplir le site de liaison laissé vacant par le départ de l'ADP. Cela provoque à nouveau un changement de conformation qui détache la tête de myosine du filament d'actine et la remet dans sa position initiale.

Tant que la concentration en ions calcium est suffisante pour maintenir dans la tropomyosine dans cette configuration, le cycle attachement-avancée-détachement des têtes de myosine sur l'actine continue, et la fibre musculaire se contracte de plus en plus.

Lorsque la concentration en calcium diminue car le signal du neurone moteur s'est arrêté, la tropomyosine retrouve sa conformation d'origine, et les myosines ne peuvent plus s'attacher au filament d'actine.

4.2.2 Mécanique de la contraction musculaire

Dans les conditions optimales, une seule cellule musculaire mature peut exercer une force de l'ordre de $0,3 \mu\text{N}$, et un muscle peut exercer autour de $30\text{N}/\text{cm}^2$ de section efficace.

Le modèle de Hill **Hill** élaboré bien avant que les mécanismes internes de la contraction musculaire soient connus, permet de relier la vitesse de contraction d'un muscle aux forces qu'il est capable d'appliquer.

Molecular mechanism of muscle contraction

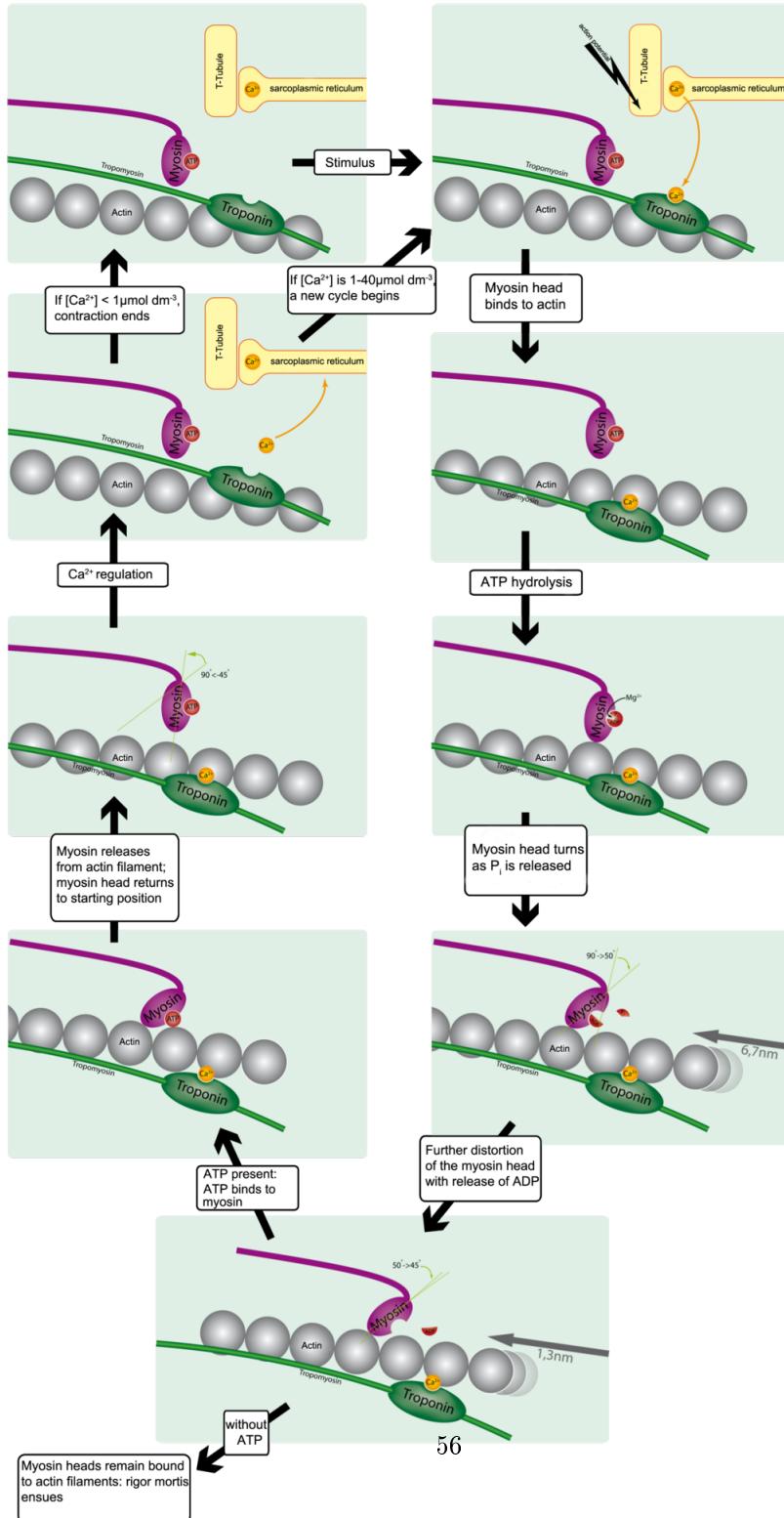


FIGURE 4.6 – Illustration réalisée par Hank van Helvete (CC BY-SA 2.5)

Hill constate que pour un muscle de taille donnée se raccourcissant d'une longueur x , l'énergie dissipée dans le muscle est proportionnelle à x : $W_d = ax$. a est proportionnel à la section efficace du muscle (et donc du nombre de myofibres), et comme la force maximale supportée par le muscle également, le rapport entre les deux est constant :

$$\frac{a}{P_0} = 0.25$$

En faisant un bilan d'énergie dans le muscle, on obtient :

$$E = W + W_d = Px + ax = (P + 0.25P_0)x$$

La puissance totale dissipée vaut alors $(P+a)v$ où v est la vitesse de contraction du muscle, dérivée de x par rapport au temps.

Hill trouve également que la puissance développée par le muscle est une fonction linéaire du poids qui lui est appliqué, avec $v = 0$ quand $P = P_0$. La relation devient alors :

$$(P + a)v = b(P_0 - P)$$

avec b une constante mesurée dans les expériences.

Cette relation peut se réécrire :

$$(P + a)(v + b) = b(P_0 + a) = Cste \quad (4.1)$$

L'équation de Hill relie donc la force que peut appliquer un muscle P à la vitesse de contraction v . Plus la contraction est rapide, moins elle peut être forte, au contraire plus elle est lente et plus elle peut développer de force.

Non seulement la loi de Hill est vérifiée pour les muscles striées, mais elle l'est également au niveau du myoblaste unique **Mitrossilis** et même au niveau d'un unique filament d'actine déplacé par 8 têtes de myosine du muscle squelettique **Debold** ce qui confirme l'hypothèse de Huxley **Huxley** qui attribue ce comportement aux propriétés du complexe acto-myosine.

4.3 Les cellules satellites, MRTF-A et régulation de la masse musculaire

Entre la lame basale et les myofibres, on peut trouver des cellules moins différenciées, les cellules satellites. Celles-ci sont responsables de la réparation et de la croissance des muscles adultes. En effet, les myofibres sont des cellules qui ne se reproduisent plus, et après les deux phases de création de myofibres pendant la vie embryonnaire, le nombre de fibres musculaires reste constant. Cependant, lorsqu'elles sont activées en réponse à une blessure ou à une sollicitation importante du muscle, les cellules satellites prolifèrent, et une partie d'entre elles se différencient et fusionnent avec les fibres musculaires.

En réponse à une stimulation mécanique (hypertrophie compensatoire), SRF est activé dans les myofibres *in vivo* par l'intermédiaire de MRTF-A GUERCI

et al. 2012. L'activation de SRF dans les myofibres produit un signal paracrine composé d'Interleukines 6, qui encourage la prolifération des cellules satellites, et d'interleukines 4 qui les fait fusionner avec les fibres musculaires. Dans les fibres musculaires mutantes où SRF est désactivé, le nombre de noyaux par fibre n'augmente pas, ce qui signifie qu'il n'y a pas de fusion des cellules satellites avec les myofibres. La surexpression d'IL6 chez les mutants restaure la prolifération, mais pas la fusion des cellules satellites. Surexprimer Cox2, qui est en aval de SRF et en amont de l'IL4, ou l'IL4 elle-même permet de restaurer la fusion et l'hypertrophie chez les mutants.

Au contraire, lors d'une absence de signaux mécaniques induite par la dénervation, l'actine G s'accumule dans le noyau des fibres musculaires et l'activité de SRF diminue, cependant, cette diminution n'est pas à l'origine de l'actine nucléaire COLLARD et al. 2014. En revanche, l'activité de MICAL-2 est également réduite, or son rôle contribue normalement à exclure l'actine monomérique du noyau. L'accumulation d'actine G dans le noyau favorise l'export de MRTF-A, qui est confiné dans le cytoplasme dans les muscles dénervés. Cela explique le déficit d'activité de SRF, qui ne peut pas être atteint par son cofacteur.

La désactivation de SRF, l'injection de CCG1423 (drogue inhibant MRTF/SRF), ou l'expression d'une actine non polymérisable sont tous liés à une augmentation de la gravité de l'atrophie musculaire, montrant que cette voie de signalisation protège l'organisme de la destruction de ses propres muscles.

Au contraire, l'expression d'une MRTF-A incapable de se lier à l'actine, et donc constitutivement active (sur le modèle de la myocardine), permet de protéger les muscles de l'atrophie induite par la dénervation, ce que ne fait pas la simple sur-expression de MRTF-A GFP. Cependant, si SRF n'est pas fonctionnel, cette protection n'est plus efficace, prouvant que c'est bien le couple MRTF/SRF qui est nécessaire.

Chapitre 5

Méthodes et dispositifs expérimentaux

5.1 Culture cellulaire

5.1.1 Type cellulaire

Nous avons utilisé comme modèle une lignée immortalisée de myoblastes murins de l'ATCC, les C2C12. Elles présentent l'avantage d'être la lignée immortalisée la plus proche des cellules qui sont utilisées par nos partenaires de l'Institut Cochin dans leurs expérimentations animales sur les souris.

Ce sont des cellules adhérentes qui conservent leur capacité à se différencier en myotubes lorsqu'elles atteignent la confluence et sont placées dans un milieu pauvre en sérum. C'est pourquoi il est essentiel de les maintenir en permanence en-dessous de la confluence.

Elles adoptent des formes variées (allongées, triangulaires, en disque) et se déplacent sur leur surface de culture en étendant des lamellipodes.

Les C2C12 sont cultivées dans un milieu de culture composé de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) à 4,5g/L de L-Glucose supplémenté de 10% de Sérum de Veau Foetal (SVF) et de 1% d'antibiotiques (Pénicilline et Streptomycine dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂.

Lorsqu'elles sont proches de la confluence, il faut rincer deux fois les cellules avec du PBS (Phosphate Buffered Saline) et les laisser incuber 5 minutes à 37°C dans un mélange Trypsine/EDTA. La trypsine est une enzyme qui va casser les adhésions cellulaires, tandis que l'EDTA joue le rôle de chélateur des ions calcium qui sont indispensables pour créer des adhésions. Une fois les cellules décollées, elles sont diluées dans du milieu de culture qui inactive la trypsine et ensemencées à nouveau sur des boîtes de culture. Cette opération s'appelle le passage.

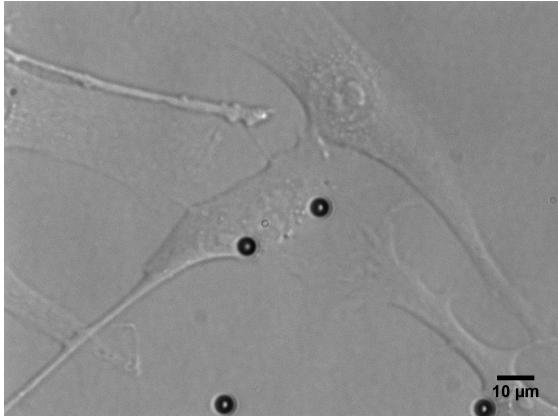


FIGURE 5.1 – C2C12 en culture sur du verre, avec des billes de 4,5 microns de diamètre, observées au microscope à immersion 100X.

5.1.2 Culture sur PDMS ou sur verre

Pour réaliser les différentes expériences de rhéologie cellulaire, les cellules doivent être cultivées sur d'autres substrats que dans les boîtes de cultures : sur des lamelles de verre carrées (22mm x 22mm x 100 μm) dans le cas des pinces magnétiques et sur des disques de PDMS (30mm de diamètre et 0.3 mm d'épaisseur) dans le cas de l'étirement.

Les disques de PDMS doivent préalablement être passées dans un four à plasma pendant 2 minutes afin de rendre leur surface hydrophile. Cette opération stérilise également les disques. Les lamelles de verre doivent être stérilisées 30 minutes à l'aide d'un rayonnement UV.

Les lamelles comme les disques sont placés dans les trous d'une plaque 6 trous, et mis à incuber 30 minutes à 37°C dans 1ml de milieu complet et 5 μg de fibronectine qui va s'adsorber sur la surface.

Après rinçage, 110 000 cellules sont ensemencées sur chaque lamelle dans du milieu complet.

Visualiser une protéine dans la cellule : anticorps, marqueurs et protéines fluorescentes

Trois techniques ont été utilisée pendant cette thèse pour visualiser nos deux protéines d'intérêt, l'actine et MRTF, dans les cellules.

La première et la plus ancienne fait appel à des anticorps spécifiquement dirigés contre la protéine cible. Une fois que les anticorps se sont fixés sur leurs cibles, un anticorps secondaire couplé à un fluorophore vient détecter et se fixer sur le premier anticorps.

La seconde fait appel à des molécules spécifiquement dirigées contre notre protéine d'intérêt et couplées à un fluorophore. C'est le cas par exemple de la

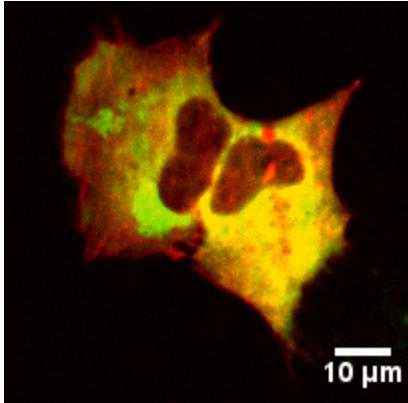


FIGURE 5.2 – C2C12 transfectées avec un plasmide MRTF-A GFP (en vert) et un plasmide Actine Mccherry (en rouge)

phalloïdine, drogue issue de l’Amanite Phalloïde qui a la propriété de se fixer aux filaments d’actine.

La dernière technique fait appel à la Green Fluorescent Protein (GFP), protéine découverte dans les années soixante chez une méduse, et utilisée à partir des années 90 pour marquer des protéines. En fusionnant la séquence génétique de la GFP avec la séquence de la protéine à observer, on obtient un nouveau gène codant pour une version fluorescente de la protéine d’intérêt. Après introduction du gène dans les cellules, celles-ci expriment alors la version fluorescente de la protéine. Cette utilisation de la GFP a révolutionné la biologie cellulaire et a été l’objet du prix Nobel de Chimie en 2008. Aujourd’hui, il existe de nombreuses variantes de cette technique, que ce soit au niveau des bandes d’émission et d’absorption du fluorophore (il en existe de toutes les couleurs du spectre visible) ou au niveau de la manière dont le gène de la nouvelle protéine est intégrée dans les cellules (transfection, électroporation, infection par des virus ...).

Cette dernière technique permet d’observer la protéine fluorescente en direct pendant la vie de la cellule, alors que la première technique ne peut être utilisée que sur des cellules fixées. La seconde technique peut parfois être utilisée sur des cellules vivantes lorsque la drogue utilisée n’est pas trop毒ique.

5.1.3 Transfections

Afin de visualiser les protéines qui nous intéressent, on ajoute aux cellules de l’ADN non chromosomique d’origine bactérienne appelés plasmides qui codent pour une version fluorescente de nos protéines d’intérêt. Ces plasmides sont intégrées aux cellules grâce à des agents spécifiques comme la nanofection et la lipofectamine lors de la transfection.

Les cellules transfectées expriment donc deux versions de la protéine : la version endogène qui se trouve dans leur propre génome, et la version fluores-

cente du plasmide. La protéine que l'on observe est par conséquent toujours surexprimée par rapport à la situation normale, d'un facteur qui peut être variable d'une cellule à l'autre, selon la quantité de plasmide qui a été intégrée par la cellule : certaines cellules n'ont incorporé aucun plasmide et ne sont donc pas fluorescentes, d'autres en ont incorporé une grande quantité et sont très fluorescentes.

La transfection est d'autant plus efficace que les cellules sont proches de la confluence. Cependant, on ne peut pas laisser les C2C12 atteindre la confluence, l'efficacité de transfection est donc toujours limitée. La transfection peut se faire avant ou après l'ensemencement des cellules sur leur substrat (verre ou PDMS selon l'expérience). Lorsque la transfection a lieu avant l'ensemencement, elle est faite directement dans la boîte de culture, alors que lorsqu'elle est faite après, elle a lieu dans les puits.

Protocole de transfection

Dans les protocoles suivants, les proportions sont données pour un puits d'une plaque 6 puits. Une petite boîte de culture (T-25) représente une surface de 2,5 fois celle d'un puits, les quantités utilisées lors de la transfection d'une boîte sont donc multipliées d'autant.

Trois protocoles sont décrits simultanément ici : le protocole pour une transfection simple de MRTF-A GFP , puis pour une transfection double MRTF-A GFP/Actine Mcherry (option 1) ou MRTF-A GFP/LifeAct RFP (option 2). Sauf indication contraire, toutes les étapes et ingrédients optionnels sont en plus des ingrédients pour la transfection simple.

Ingrédients :

- Des C2C12 ensemencées dans un puits d'une plaque 6 puits
- 1 µg de nanofectine (PAA Nanofectin Kit)
- 1 µg d'ADN de MRTF-A GFP
- (option 1 : Actine Mcherry) 1 µg d'ADN d'Actine Mcherry
- (option 1 : Actine Mcherry) 1 µg de nanofectine
- (option 2 : LifeAct RFP) 0,75 µg d'ADN de LifeAct RFP
- (option 2 : LifeAct RFP) 0,75 µg de nanofectine
- 2*50 µl de NaCl 150mM
- (option 1 ou 2) 2*50 µl de NaCl 150mM
- 0,9ml de milieu complet (transfection simple uniquement)
- (option 1 ou 2) 0,8 ml de milieu complet

Protocole :

1. Diluer dans un eppendorf 1 µg de MRTF-A GFP dans 50 µl de solution de NaCl 150mM.
2. Diluer de même 1 µg de nanofectine
3. (option 1 ou 2) Répéter ces deux étapes avec l'Actine Mcherry ou la LifeAct RFP

4. Transvaser le contenu de l'eppendorf de nanofectine dans l'eppendorf d'ADN (le sens est important)
5. (option 1 ou 2) Répéter l'opération pour les deux autres tubes
6. Laisser incuber 30 minutes à 37 °C
7. Transvaser le ou les mélange(s) nanofectine + ADN dans du milieu complet de façon à obtenir 1 ml de solution
8. Rincer les cellules
9. Ajouter le mélange nanofectine + ADN + milieu complet sur les cellules
10. Laisser incuber à 37 °C pendant au moins 6 heures
11. Enlever le mélange, rincez et remplacez avec du milieu complet
12. Laisser les cellules exprimer le plasmide entre 12 et 24h après rinçage

5.1.4 Marquage DAPI sur cellules vivantes

Le 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) est une molécule fluorescente qui peut se fixer entre les bases A et T de l'ADN. Elle peut entrer dans les cellules vivantes et permet ainsi de marquer l'ADN du noyau. Sa localisation dans l'ADN perturbe la réPLICATION de l'ADN nécessaire à la division cellulaire, c'est pourquoi le DAPI est ajouté à la dernière minute avant les expériences sur cellules vivantes.

Trente minutes avant l'observation, du DAPI est ajouté au milieu de culture en proportion 1/1000 ou 1/500 (selon l'efficacité du lot de DAPI pour entrer dans les cellules). Il est si possible rincé avant l'observation pour améliorer le contraste.

5.1.5 Fixation

La fixation permet de figer les protéines des cellules à un instant donné. Elle est réalisée en ajoutant sur une lamelle recouverte de cellules préalablement rincée au PBS une solution à 4% de paraformaldéhyde (PFA) pendant 20 minutes à température ambiante. Cette solution est ensuite rincée au PBS.

Les lamelles fixées ainsi obtenues peuvent être conservées plusieurs mois à 4°C et observées longuement au microscope.

5.1.6 Marquages sur cellules fixées

Les cellules fixées peuvent être marquées par des molécules fluorescentes qui peuvent être perturbatrices ou toxiques pour des cellules vivantes. Ici nous avons réalisé sur cellules fixées des marquages à 4 couleurs : rouge profond pour les filaments d'actine, rouge pour l'actine monomérique, vert pour la MRTF-A et bleu pour l'ADN.

Perméabilisation

Afin de faire rentrer les molécules et protéines qui vont nous permettre de marquer les protéines des cellules, il est nécessaire de perméabiliser les cellules. Pour cela, on va ajouter aux cellules fixées une solution contenant 0.5% de Triton, un tensio-actif qui va permettre de créer des trous dans les membranes plasmiques des cellules fixées. Pour améliorer la spécificité des différents marqueurs on va également saturer les sites de liaison des protéines à l'aide de protéines non spécifiques : Bovine Serum Albumine (BSA) 4% et Horse Serum (HS) 5%.

Les lamelles de cellules fixées sont donc initialement laissées 3h à température ambiante dans la solution de saturation composée de 0.5% triton, 5% HS et 4% BSA.

Phalloïdine

La phalloïdine est une drogue issue de l'amanite phalloïde qui se lie aux filaments d'actine et les stabilise. Utilisée *in vivo* elle perturbe significativement le cytosquelette jusqu'à se révéler毒ique pour les cellules.

Sur des cellules fixées, la phalloïdine permet de marquer spécifiquement les filaments d'actine. La phalloïdine utilisée pendant nos marquages a été ajoutée aux cellules fixées la veille de l'observation et laissée toute la nuit à 4°C, et rincée avant observation.

DNaseI

La DNaseI est une protéine naturellement présente dans le noyau des cellules et qui découpe l'ADN en morceaux de 4 paires de bases. Son action est bloquée lorsqu'elle est liée à un monomère d'actine. En raison de son action sur l'ADN, elle ne peut pas être utilisée sur des cellules vivantes. Sur des cellules fixées, elle est un marqueur spécifique du monomère d'actine.

Comme la phalloïdine, elle est ajoutée aux cellules fixées la veille de l'observation et laissée toute la nuit à 4°C.

MRTF-A endogène

Lorsque les cellules sont fixées, on peut observer la MRTF-A endogène grâce à l'immunofluorescence plutôt que de transfecter de la MRTF-A GFP dans les cellules. Cela nous permet de détecter les protéines sauvages exprimées directement par cellule sans surexpression induite par la transfection.

Le marquage se fait en deux étapes : le marquage par un anticorps spécifique anti-MRTF-A, puis le marquage de l'anti-corps anti-MRTF-A par un autre anti-corps qui est fluorescent. L'anti-corps primaire est placé pendant 30 minutes à température ambiante. La lamelle est ensuite rincée et on y ajoute l'anticorps secondaire à nouveau pendant 30 minutes à température ambiante, puis on rince à nouveau.

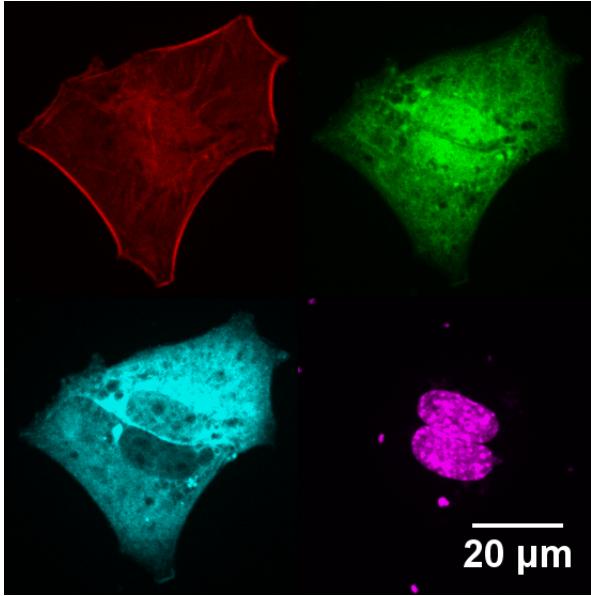


FIGURE 5.3 – C2C12 transfectées MRTF-A GFP (ici en cyan), fixées et marquées phalloïdine Alexa647 (ici en rouge), DNaseI Alexa547 (ici en vert) et DAPI (ici en magenta)

Protocole de marquage quadrichrome

Durée estimée : 3h + 3*30 minutes + une nuit

Ingrédients pour une lamelle :

- une lamelle de cellules fixées
- PBS
- 40 µg de BSA
- 50 µl de Horse Serum
- 5 µl de Triton
- 4 µl de Phalloïdine Alexa 647 (Life Technologies) 6.6 µM dans le méthanol
- 1 µl de DNase I Alexa 594 (Life Technologies) 161 µM dans un mélange 50% v/v PBS 50% glycérol
- 4 µl d'anticorps MRTF-A H140 (Santa Cruz Biotechnology) 200µg/ml dans PBS 0.1% gélatine
- 2 µl d'anticorps goat anti-rabbit Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch) 1.5mg/ml dans de l'eau diluée
- 1 µl de DAPI

Protocole pour une lamelle :

1. Mélanger 40 μ g de BSA, 50 μ l de HS et 5 μ l de Triton dans 905 μ l de PBS.
Le mélange constitue la solution de perméabilisation et de saturation.
2. Enlever le PBS de la lamelle fixée
3. Ajouter la solution de saturation sur la lamelle, et laisser incuber 3h à température ambiante
4. Ajouter 4 μ l d'anti-MRTF-A H140 à 996 μ l de PBS
5. Enlever la solution de saturation de la lamelle
6. Ajouter l'anti-MRTF-A diluée et laisser incuber 30 minutes à température ambiante
7. Enlever l'anticorps et rincer deux fois au PBS
8. Ajouter 2 μ l d'anti-rabbit Alexa 488 dans 998 μ l de PBS

Attention à partir de cette étape, pour limiter le photo-blanchiment, il faut éclairer la lamelle le moins possible. Pendant les temps d'incubation, elle doit être protégée par un film opaque.

9. Ajouter l'anti-rabbit diluée sur la lamelle et laisser incuber 30 minutes à température ambiante
10. Enlever l'anticorps et rincer 2 fois au PBS
11. Ajouter 1 μ l de DAPI à 999 μ l de PBS
12. Ajouter le DAPI dilué sur la lamelle et laisser incuber 30 minutes à température ambiante
13. Enlever le DAPI et rincer 2 fois à température ambiante
14. Ajouter 4 μ l de phalloïdine et 1 μ l de DNase I à 995 μ l de PBS
15. Ajouter le mélange phalloïdine et Dnase diluées à la lamelle et laisser incuber toute la nuit.
16. Rincer deux fois avec 1ml de PBS. Les lamelles marquées peuvent être conservées plusieurs semaines à 4°C dans l'obscurité, mais la qualité du signal décroît avec le temps, il est donc préférable de les observer le lendemain du marquage.

5.2 Pinces magnétiques

Les pinces magnétiques sont destinées faire de la rhéologie à l'échelle locale sur une cellule unique. Comme les pinces optiques, elles utilisent des billes micrométriques recouvertes de protéines d'adhésion pour s'ancre à la cellule. Une force exercée sur la bille sera alors transmise par les adhésions à la cellule. Les contraintes sont donc non seulement ressenties mécaniquement par la cellule, mais aussi biochimiquement au niveau des protéines des complexes d'adhésions. La bille, observée au microscope, se déplace en réponse à la force, mais est retenue par la cellule.

Pour étudier la rhéologie cellulaire, on va alors exercer une force connue sur la bille, et mesurer au microscope son déplacement, et donc la déformation de

la cellule. Nous nous sommes placés ici en régime de fluage, plus adapté à la pince magnétique. La bille exerce une contrainte constante sur la cellule σ_0 , qui est reliée à la déformation de la cellule par la relation :

$$\epsilon(t) = \sigma_0 J(t)$$

Un modèle nous permet de relier la contrainte subie par la cellule σ_0 à la force exercée par l'électro-aimant sur la bille F_0 et la déformation de la cellule $\epsilon(t)$ au déplacement de la bille $x(t)$.

Les pinces magnétiques ont été construites pour contourner un certain nombre de limitations que rencontraient les pinces optiques qui existaient déjà au laboratoire, en particulier pour exercer des forces plus grandes pendant des durées plus longues et des découpler l'observation et l'application de force, qui se faisaient par l'intermédiaire de l'objectif dans le cas des pince optiques. Cela s'est fait au prix de la perte de contrôle de la direction de la force : la pince magnétique ne peut que tirer la bille vers la pointe, dans la direction de l'axe de l'électro-aimant.

5.2.1 Description

Principe

Lorsqu'on applique un champ magnétique

$$\vec{H} = \frac{\vec{B}}{\mu}$$

sur une bille paramagnétique de volume V et de susceptibilité magnétique χ , cela induit dans la bille un moment magnétique

$$\vec{m} = \chi V \vec{H}$$

Si le champ magnétique est de plus inhomogène, la bille subit alors une force :

$$\vec{F} = (\vec{m} \cdot \vec{\nabla}) \vec{B}$$

Le principe des pinces magnétiques est donc d'utiliser un électro-aimant, qui va créer un champ et un gradient de champ magnétiques lorsqu'il est alimenté par un courant, pour exercer des forces à distance sur un bille magnétique fixée à la cellule par des protéines d'adhésion.

Afin d'exercer cette force, il est nécessaire de construire un électro-aimant répondant à plusieurs contraintes : il doit être capable de créer un fort champ magnétique ainsi qu'un fort gradient de champ magnétique, cependant il ne doit pas chauffer l'échantillon afin de ne pas endommager les cellules vivantes sur lesquelles on manipule, et cela sans système de refroidissement qui risquerait d'introduire un bruit mécanique trop important. L'électro-aimant doit pouvoir

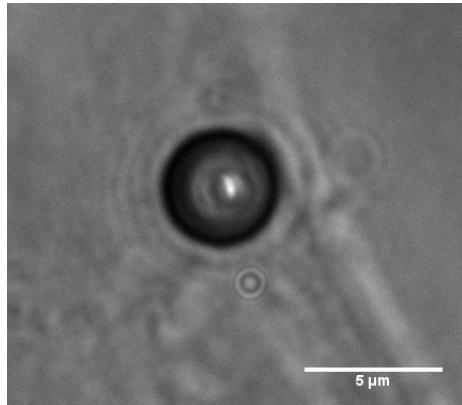


FIGURE 5.4 – Bille Dynabeads M-450 observée en grossissement 150X.

être amené le plus près possible de l'échantillon afin d'exercer une force maximale, le plus précisément possible afin de conserver une bonne précision sur la direction et la valeur de la force exercée. On souhaite manipuler avec une chambre expérimentale fermée pour éviter toute contamination des cellules, et pouvoir faire des observations en fluorescence. On souhaite également faire des expériences de longue durée, en imposant des paliers de force pendant plusieurs minutes et répétés pendant plusieurs dizaines de minutes.

Billes superparamagnétiques

Les billes utilisées sont des Dynabeads M-450 Epoxy d'Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norvège. Ce sont des billes de polystyrène sphériques, de $4,5\mu\text{m}$ de diamètre, recouvertes en surface de groupes epoxy afin de permettre l'ajout de ligands en surface, et contenant des nanoparticules d'oxydes de fer qui leur confèrent leurs propriétés superparamagnétiques. Elles sont initialement fournies dans une suspension concentrée (4.10^8 billes/ml) dans de l'eau distillée. On les recouvre de fibronectine pour une fixation spécifique aux intégrines. Pendant les expériences de pinces magnétiques, la bille magnétique par l'intermédiaire de laquelle on applique une force sur la cellule est observée au microscope à l'aide d'un objectif 100X et filmée pendant toute la durée de l'expérience. Ces images sont ensuite traitées avec un logiciel d'analyse d'image (ImageJ, National Institute of Health) qui ajuste une ellipse sur l'image des billes. Le logiciel nous donne pour chaque image de chaque expérience le grand axe et le petit axe de l'ellipse ajustée. Une bille est donc mesurée environ 4 000 fois pendant une expérience. Nous obtenons donc 385 885 mesures de taille pour 191 billes observées pendant 191 expériences de pinces, avec une taille moyenne de $4.4067 \pm 0.0002 \mu\text{m}$ et un rapport petit axe sur grand axe $e = 0.98585 \pm 0.0008$. Les billes apparaissent donc légèrement plus petites qu'annoncé par le fabricant mais semblent bien sphériques.

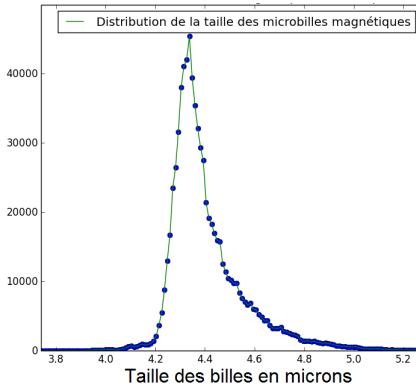


FIGURE 5.5 – Fonction de distribution de taille des billes magnétiques utilisées dans 191 expériences de pinces. Pour chaque expérience, lorsque la bille est suivie par le logiciel d’analyse d’image, son grand axe et son petit axe sont mesurés pour chaque temps. La fonction est asymétrique car lorsque la bille n’est pas tout à fait au point, son diamètre apparaît plus grand.

Électroaimant

L’électro-aimant est composé d’un cœur entouré d’une bobine de fil de cuivre. Le passage d’un courant électrique dans la bobine crée un champ magnétique dont les lignes de champ sont conduites par le cœur.

Le cœur Deux types de cœur ont été testés : un cœur en fer doux (diamètre, longueur) et un cœur en mu-métal, un alliage de grande perméabilité magnétique (diamètre 5,10mm , longueur 143,64mm).

Une extrémité du barreau est taillée en pointe. La forme de pointe permet d’augmenter le gradient de champ magnétique en resserrant les lignes de champ à cet endroit. Il est très important de conserver sa symétrie cylindrique, et d’avoir le rayon de courbure le plus faible possible au bout de la pointe. Les résultats obtenus sont visibles en figure 5.6. Étant en fer doux, le barreau est très malléable, il faut donc le manipuler avec précautions : le moindre choc aplati la pointe. Le barreau a été usiné au tour, puis pour la taille d’entretien de la pointe, on monte le barreau sur un moteur de perceuse, ce qui permet de garder la symétrie cylindrique, et on l’approche d’un morceau de papier de verre de grain de plus en plus fin, incliné avec un angle de 30° .

L’angle optimal pour maximiser le gradient peut être calculé **magnetisme**. Ici, on doit aussi prendre en compte le fait que la pointe doit être approchée de biais au-dessus de la lamelle d’échantillon. Il nous faut donc un angle plus faible que l’angle optimal, trop obtus. On a fixé cet angle à 30° , car il est prévu d’approcher la pointe de la lamelle sur laquelle seront les cellules avec un angle de 45° , comme représenté sur la figure 5.2.1 .

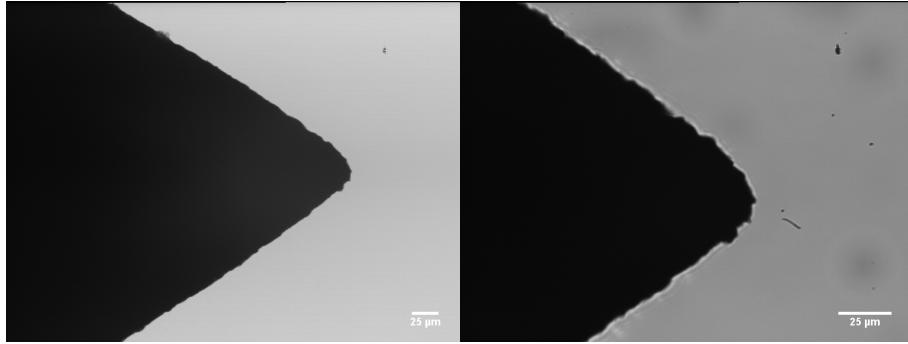
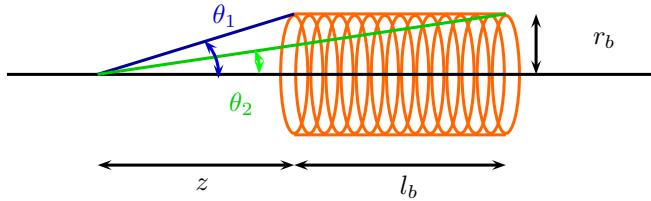


FIGURE 5.6 – À gauche une image de la pointe en fer doux au grossissement X20. À droite, la même pointe au X40. Le rayon de courbure mesuré est de l'ordre de 20 μm.



La bobine L'optimisation des caractéristiques de l'électro-aimant a été l'objet de mon stage de Master 2. Deux contraintes s'opposent lors de la fabrication : l'augmentation du champ magnétique et l'effet Joule.

Le champ \vec{B} généré par un solénoïde de longueur finie dans le vide sur son axe à une distance z :

$$\vec{B} = \frac{\mu_0 n I}{2} (\cos(\theta_2) - \cos(\theta_1)) \vec{u}_z$$

dépend du nombre n de spires par mètre, de la longueur de la bobine l_b et du courant I qui passe à l'intérieur. On veut donc maximiser n et I pour augmenter la valeur de B . La distance z sera de l'ordre de 700 μm.

La puissance dissipée par effet Joule

$$P = R I^2$$

dépend de la résistance de la bobine et de I , il s'agit de minimiser ces quantités.

La résistance de la bobine :

$$R = \frac{L}{\gamma s}$$

dépend de la section du fil s , de sa longueur totale L . γ est la conductivité du cuivre.

La section du fil est directement reliée au nombre de spires par mètre :

$$n = \frac{1}{2r_f} = \frac{1}{2\sqrt{\frac{s}{\pi}}} = \sqrt{\frac{\pi}{4s}}$$

Il est facile de voir que lorsque s augmente, R diminue en s^{-1} alors que n ne diminue qu'en $s^{-1/2}$, et donc qu'il faut choisir la section de fil la plus grande disponible. En pratique, on ne fait pas qu'une couche de bobinage, mais plusieurs, le nombre de spires par mètres est donc aussi relié à la longueur totale de fil L_f .

$$R \propto L_f \approx n_c \frac{\pi d_b l_b}{d_f}$$

où d_b est le diamètre de la bobine, l_b sa longueur, d_f le diamètre du fil.

$$n = n_c \frac{1}{d_f}$$

Pour augmenter n_c en augmentant le moins possible R , il faut alors minimiser le rapport $\frac{\pi d_b l_b}{d_f}$. On a déjà maximisé d_f , on minimise alors également d_b le diamètre de la bobine.

En ce qui concerne la longueur de la bobine, l_b , on aimerait la minimiser pour diminuer R , cependant, le champ B est maximal pour une bobine de longueur infinie. La longueur optimale correspond en fait à celle du cœur : ajouter de la longueur de bobine au-delà n'augmente que peu le champ, à cause de la faible perméabilité magnétique de l'air.

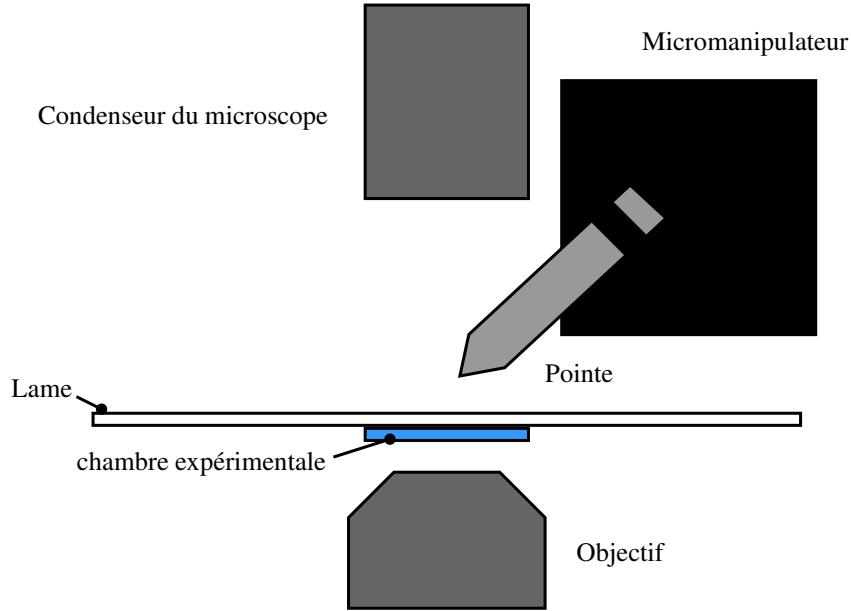
La bobine finalement utilisée dans nos expériences est composée de 8 couches de fil de cuivre de diamètre 0,5mm bobinées sur un tube d'aluminium de diamètre extérieur égal à 5,38mm sur une longueur de 66,5mm. Sa résistance est mesurée à $3,3\Omega$ et son inductance à $1,2\text{mH}$.

L'aluminium est un bon support pour la bobine car il est à la fois léger, car il ne faut pas surcharger le micromanipulateur qui portera l'électro-aimant dans le montage final, et qu'il conduit bien la chaleur dégagée par l'effet Joule pour qu'elle soit évacuée vers la pointe. L'aluminium a pu également être taraudé à une extrémité afin d'y attacher une vis de support qui est tenue par le micromanipulateur, et qui sert également à évacuer une partie de la chaleur de la pointe.

Montage sous microscope

Circuit électrique Un générateur de tension basse fréquence, contrôlé par ordinateur par l'intermédiaire d'une carte PCI, alimente un amplificateur de courant fabriqué par les ateliers du laboratoire, qui permet de délivrer des courants jusqu'à 2A à la bobine. La bobine ayant à dessein une résistance la plus faible possible pour limiter l'effet Joule, une résistance de 10Ω est ajoutée au circuit. Un ampèremètre mesure à tout instant l'intensité délivrée à la bobine.

Le temps de réponse caractéristique du circuit RL est donc de 16ms, ce qui sera négligeable dans toutes les configurations où les pinces seront utilisées.



Montage sous le microscope L'électro-aimant que l'on a fabriqué précédemment est monté sur un micromanipulateur (InjectMan NI2, Eppendorf, avec une précision de position de $0.1\mu\text{m}$), et incliné à 45° . La force que nous allons exercer sur les billes est parallèle à l'axe de la bobine, nous allons donc appliquer simultanément une force horizontale et une force verticale vers le haut.

Un thermomètre est fixé sur la pointe pour mesurer sa température à tout instant et vérifier qu'il n'y a pas de risque d'endommager les cellules pendant l'expérience.

Les cellules ont préalablement été ensemencées sur une lamelle de verre et incubées avec les microbilles recouvertes de fibronectine. Sur une lame de verre $22\text{mm} \times 64\text{mm} \times 0.15\text{mm}$, on monte un séparateur et la lamelle de verre, le tout formant une chambre expérimentale fermée de $65\mu\text{l}$ remplie de milieu de culture.

Le micromanipulateur et la lamelle contenant les cellules sont montés sur un microscope inversé (Leica DMIRB). À l'aide du micromanipulateur, on peut approcher la pointe de l'électro-aimant à une distance de $100\mu\text{m}$ de la lamelle. On enregistre les images de la bille à l'aide d'une caméra (CoolSnap HQZ) reliée à un ordinateur qui la contrôle par l'intermédiaire de MicroManager.

Il existe deux possibilités de montage pour la lamelle : la lamelle sur laquelle sont les cellules peut être placée en haut, du côté de la pointe de l'électro-aimant, ou au contraire en bas, proche de l'objectif du microscope.

Dans le premier cas, la distance entre la pointe de l'électro-aimant et la bobine peut être réduite à $280\mu\text{m}$, ce qui permet d'exercer de grandes forces, de l'ordre du nanoNewton. Cependant, la distance entre l'objectif et les cellules est alors d'au moins $400\mu\text{m}$, et ne permet pas d'utiliser d'un objectif à immersion,

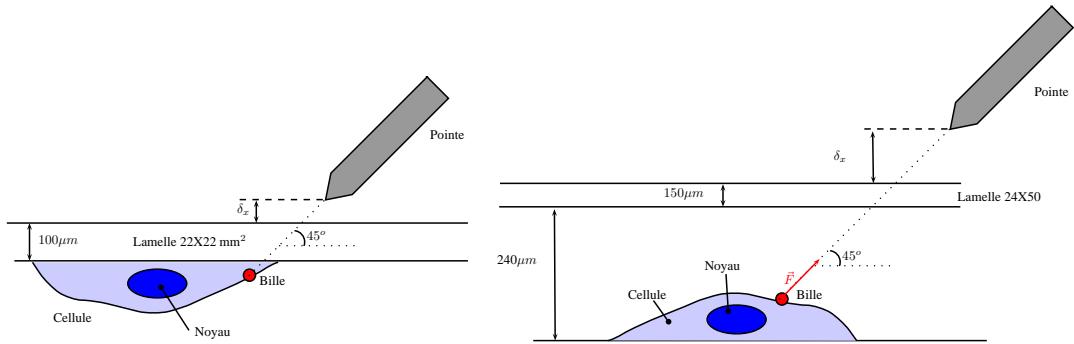


FIGURE 5.7 – Schéma des deux montages possibles de la lamelle par rapport à l’objectif et à la pince magnétique.

nous restreignant à des grossissements inférieurs à 40X.

Dans le second cas, on peut au contraire utiliser des objectifs à immersion à huile 100X, ce qui nous permet d’avoir une très bonne précision sur la position et sur les déplacements de la bille. Cependant, la distance entre la bille et la pointe est alors de $700 \mu\text{m}$ et il est alors possible d’appliquer au maximum des forces de l’ordre de 160 pN.

Le choix entre les deux méthodes dépend donc de la précision d’observation dont on a besoin et de la force que l’on souhaite exercer.

5.2.2 Calibration

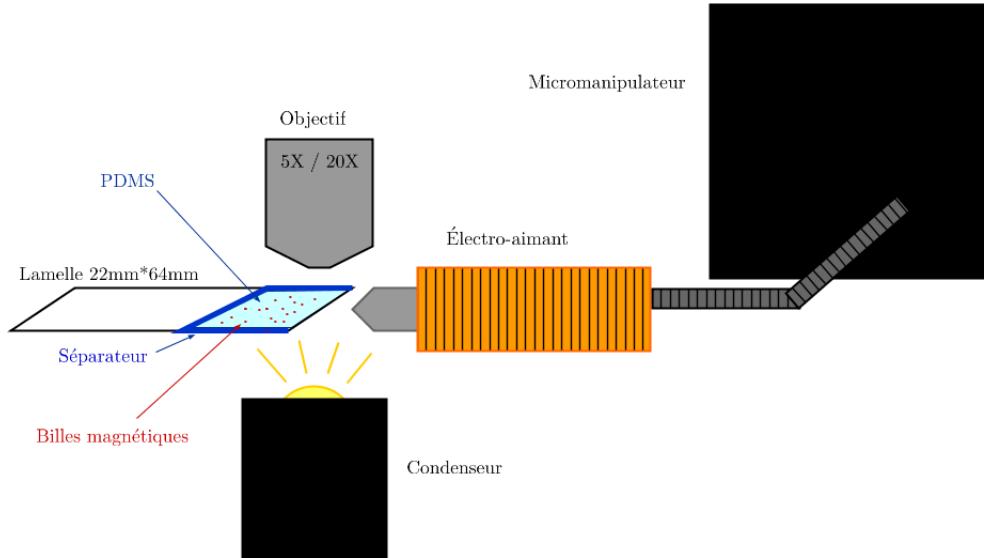
Les caractéristiques magnétiques des billes ne sont pas fournies par le fabricant, et de plus à des distances inférieures au millimètre, la précision sur les mesures de \vec{B} et ∇B est mauvaise. Il est donc impossible de calculer de manière fiable la force exercée par la point sur les billes à un courant et à une distance données. Pour connaître la force exercée par l’électro-aimant sur les billes en fonction de la distance et du courant, nous avons donc procédé à une calibration.

Principe

Les billes de diamètre $d = 4.5\mu\text{m}$ sont placées dans du PDMS liquide de masse volumique ρ proche de celle de l’eau mais de grande viscosité $\eta = 0.75\text{Pa.s}$. Dans ces conditions, le nombre de Reynolds associé aux billes lorsqu’elles se déplacent à une vitesse U dans le liquide vaut :

$$Re = \frac{\rho U d}{\eta} = 6 * U * 10^{-3}$$

et donc $Re \ll 1$ tant que la vitesse $U \ll 167\text{m.s}^{-1}$. On peut donc en conclure que les forces inertielles sont complètement négligeables devant les forces visqueuses dans ces conditions.



Les billes subissent donc deux forces : la force magnétique exercée par la pointe, et les forces de friction visqueuses exercées par le fluide qui s'annulent à l'équilibre.

La force de friction visqueuse sur une sphère peut être modélisée par la relation de Stokes :

$$\vec{F}_{vis} = -3\pi\eta d\vec{U} = -\vec{F}_{mag}$$

Dans notre dispositif, les billes sont placées dans une chambre expérimentale de $240\mu\text{m}$ de hauteur formée par un séparateur, et l'influence de la lamelle supérieure ou de la lamelle inférieure ne peuvent pas être exclues. On appelle h la distance à la lamelle la plus proche. De plus, la viscosité η du fluide est très sensible aux variations de température, or l'électro-aimant chauffe pendant l'application de la force à cause de l'effet Joule dans la bobine. Comme la mesure est effectuée à une distance de 0,5 à 1mm de la pointe, celle-ci chauffe le fluide localement. On a mesuré la dépendance de la viscosité du fluide en fonction de la température a .

Le modèle de Stokes est donc corrigé ainsi :

$$F_{mag} = 3\pi \left(\eta_{24^\circ C} - a \left(\frac{T_{fin} - T_{init}}{2} - 24 \right) \right) * \left(\frac{d_{max} + d_{min}}{2} \right) * \left(1 + \frac{d}{h} \right) * \vec{U} \quad (5.1)$$

Montage et protocole

L'électro-aimant est monté sur le micromanipulateur à l'horizontale. On suspend 1 μl de solution mère de billes dans 499 μl de PDMS, et on passe cette

suspension 45 minutes dans une cuve à ultra-sons en cisailant toutes les 5 minutes. La suspension est placée dans une chambre expérimentale formée par une lamelle 22mm*64mm*0.15mm, une lamelle 22mm*22mm*0.1mm et un séparateur de 240 μm d'épaisseur. La chambre est ouverte du côté où l'on va approcher la pointe.

La chambre expérimentale est placée sous un microscope droit Reichert doté d'un objectif 5X et d'un 20X et d'une caméra reliée à un ordinateur.

1. Placer le plan focal au centre de la chambre expérimentale selon l'axe vertical.
2. À l'aide du micromanipulateur, amener la pointe à droite du champ de la caméra avec l'objectif 5X, le plus près possible de la chambre expérimentale sans entrer en contact avec le PDMS.
3. Prendre une image au 5X de la position de la pointe.
4. Au 20X, repérer une bille à gauche du champ (éloignée de la pointe), l'amener dans l'axe de la pointe.
5. Faire le point sur la bille et repérer la hauteur du plan focal.
6. Relever la température de la pointe T_{init} .
7. Simultanément, alimenter la bobine avec un courant continu i et commencer l'acquisition à 5 images/seconde.
8. Lorsque la bille sort du champ de la caméra à droite, arrêter l'acquisition et couper le courant dans la bobine.
9. Relever la température finale de la pointe T_{fin} .

On recommence cette opération une dizaine de fois pour chaque intensité de courant.

Traitements des données

On obtient alors T_{init}, T_{fin}, i, h directement, et des vidéos desquelles on extrait d_{min}, d_{max} les petit et grand axes de la bille, la position $(x(t), y(t))$ de la bille au court du temps, et une image de la pointe d'où on obtient (x_p, y_p) la position de la pointe.

Les vidéos des billes attirées par la pointe sont traitées avec l'algorithme d'ImageJ *Analyse Particules* qui repère les billes et relève leur position sur toutes les images successives et leur taille. Cependant, si ImageJ repère toutes les billes sur chaque image, il ne relie pas une position à l'instant t à la position de la même bille à l'instant $t + \Delta t$.

Pour cela, j'ai créé sous Igor un algorithme de tri qui sépare les trajectoires des différents billes et crée pour chaque bille une trajectoire $(x(t), y(t))$.

La position de la pointe (x_p, y_p) est repérée sur l'image prise en début d'expérience au 5X, grâce à ImageJ également. Comme la position du champ du 20X dans le champ du 5X est connue, la position $(x_p, y_p)_{5X}$ de la pointe dans le champ du 5X peut être convertie en position dans le champ du 20X $(x_p, y_p)_{20X}$.

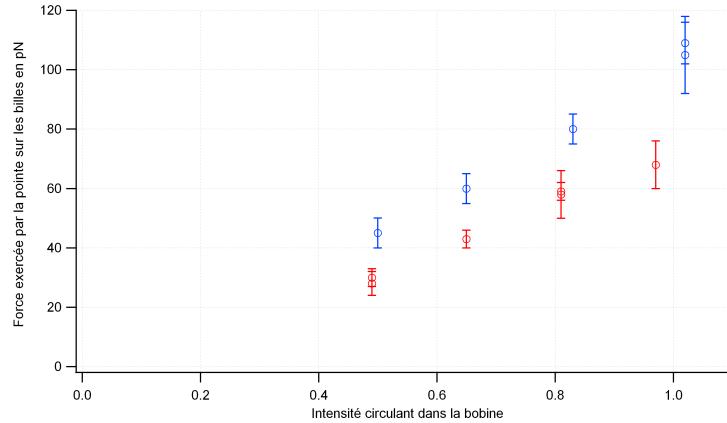


FIGURE 5.8 – Courbe de calibration des forces exercées à $700\mu\text{m}$ de la pointe pour l'ancienne (en rouge) et la nouvelle bobine (en bleu, utilisée pour les expériences).

On peut constater immédiatement que la vitesse maximale des billes est atteinte quasiment immédiatement, on peut donc supposer que nous sommes toujours dans le régime stationnaire $\vec{F}_{mag} = -\vec{F}_{vis}$. Les billes ne se déplacent cependant pas à une vitesse constante, car lorsqu'elles se rapprochent de la pointe, la force F_{mag} à laquelle elle sont soumises change.

Enfin, pour chaque bille, un algorithme sous Igor permet de :

- Calculer la distance de la bille à la pointe à chaque instant.
- À l'aide d'un ajustement linéaire local, en déduire la vitesse $U(t)$ de la bille.
- À l'aide de la formule de Stokes corrigée 5.1, estimer la force exercée par la pointe sur la bille.

On obtient donc une série de courbes de calibrations, où à chaque intensité de courant on connaît le module de la force magnétique F en fonction de la distance de la bille à la pointe.

5.2.3 Protocole de renforcement

Préparation des cellules et des billes

Les cellules sont ensemençées sur une lamelle de verre recouverte de fibronectine comme indiqué en 5.1.2 24 heures avant le début des expériences.

Ingrédients :

Pour la fabrication de la solution intermédiaire :

- PBS
- la solution mère de Dynabeads à 4.10^8 billes/ml
- de l'eau micro-filtrée

- un aimant permanent
- de la fibronectine
- une cuve à ultra-sons

Pour la préparation finale :

- des C2C12 sur une lamelle de verre recouverte de fibronectine
- 50 μl de solution intermédiaire
- 950 μl de DMEM 1% BSA
- du milieu complet
- une lamelle de verre 22mm*64mm*0.15mm
- un séparateur de 240 μm d'épaisseur
- 15 μl d'HEPES

Protocole :

1. Suspendre 50 μl de solution mère dans 450 μl d'eau micro-filtrée.
2. Placer l'aimant sous l'eppendorf pour attirer les billes, et prélever 450 μl de surnageant.
3. Suspendre à nouveau dans 450 μl d'eau.
4. Répéter deux fois les deux étapes précédentes, mais la dernière fois, ajouter 450 μl de PBS au lieu de l'eau.
5. Placer l'eppendorf 15 minutes dans la cuve à ultra-sons pour disperser les billes, et vortexer toutes les 5 minutes.
6. Ajouter 1 à 5 μl de fibronectine 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dans la suspension
7. Laisser incuber 30 minutes à 37 °C.

La solution intermédiaire ainsi préparée peut être conservée à 4 °C pendant 4 à 6 semaines.

Une heure avant la première expérience :

8. Placer l'eppendorf dans la cuve à ultra-sons pendant 15 à 30 minutes en agitant toutes les 5 minutes pour disperser à nouveau les billes
9. Prélever 50 μl de suspension et les suspendre dans 950 μl de DMEM 1% BSA.
10. Ajouter 75 μl de suspension sur une lamelle de C2C12.
11. Laisser incuber les billes et les cellules ensemble pendant 30 minutes à 37 °C.
12. Rincer 2 fois avec 1ml de milieu en cisaillant le moins possible pour enlever les billes qui n'ont pas adhéré aux cellules.
13. Ajouter 15 μl d'HEPES pour préserver l'acidité du milieu pendant l'expérience.
14. Coller le séparateur sur la lamelle 22mm*64mm*15mm lavée à l'alcool 70%

15. Ajouter $65\mu\text{l}$ de milieu 1,5% d'HEPES
16. Monter la lamelle de C2C12 pour fermer la chambre expérimentale.

La lamelle préparée ainsi peut être observée immédiatement et conservée jusqu'à 2h dans une enceinte thermalisée à 37 °C.

Déroulement de l'expérience de fluage

On place la lamelle préparée à l'étape précédente sur le microscope inversé.

Protocole :

1. Au 20X, repérer la face supérieure de la lamelle au-dessus de la chambre expérimentale.
2. Grâce au vernier de la tour à objectif, placer le plan focal $100\mu\text{m}$ au-dessus de la lamelle.
3. Approcher la pointe avec le micromanipulateur afin de la placer dans le plan focal et au centre du champ de la caméra.
4. Décaler horizontalement vers la droite la pointe de $240\mu\text{m}$ dans la configuration courte distance et de $390\mu\text{m}$ dans la configuration longue distance. La pointe est alors alignée de sorte que l'axe de la bobine passe par le centre du champ d'observation.
5. Mémoriser cette position et éloigner la pointe.
6. Décaler la lamelle, changer d'objectif pour le 100X en configuration longue distance, pour le 40X sinon.
7. Placer une goutte d'huile sur l'objectif s'il s'agit du 100X et repositionner la lamelle.
8. Chercher une cellule sur laquelle a adhéré une bille unique et placer la bille au centre du champ.
9. Ramener la pointe à la position mémorisée.
10. Alimenter la pointe avec un signal sinusoïdal de fréquence 0.5Hz afin de chercher la plus petite intensité de courant pour laquelle la bille a un mouvement détectable.
11. Régler le GBF pour fournir la tension continue correspondante en réponse à un déclenchement externe (la carte PCI reliée à l'ordinateur).
12. Ajouter la lentille 1.5X dans l'axe optique.
13. Sélectionner une zone restreinte autour de la bille qui va être acquise par la caméra.
14. Lancer l'exécution du script sous MicroManager.

Le script d'acquisition sous MicroManager contrôle la caméra et l'électro-aimant par l'intermédiaire de la carte PCI contrôlant le GBF. Il va procéder ainsi :

Phase 1 : de t=0 à t=12s

1. Déclencher l'acquisition d'images par la caméra en mode *Burst*, c'est-à-dire aussi vite que possible. Cette vitesse est d'autant plus grande que la zone à observer est petite.
2. Déclencher le GBF pour allumer l'électro-aimant au courant pré-programmé sur le GBF.

Phase 2 : de t=12s à t=125s

3. Continuer l'acquisition des images de la bille mais à une vitesse réduite de 2 images/seconde.

Phase 3 : de t=125s à t=250s

4. Couper l'alimentation de l'électro-aimant
5. Continuer l'acquisition à 1 image/seconde

Cette séquence est répétée 4 ou 6 fois afin d'observer les différences de la fonction de fluage d'une expérience à la suivante.

À la fin de l'expérience, nous obtenons une série d'images de la bille au cours du temps. Dans les métadonnées de ces images, il est possible d'obtenir l'heure à laquelle a été prise chaque image, ce qui permet d'avoir pour chaque image une coordonnée temporelle.

5.2.4 Dépouillement des vidéos

Il est nécessaire d'analyser les images obtenues pour obtenir ce qui nous intéresse : la position de la bille au cours du temps.

Les premières images obtenues pour ma thèse ont toutes été traitées avec l'algorithme *Analyse Particules* d'ImageJ.

Par la suite, pour les expériences menées plus tardivement avec Pierre-Olivier Strale, nous avons préféré utiliser Icy et son plugin *Active Contours*, qui est beaucoup plus robuste à une défocalisation de la bille.

Le traitement d'image nous fournit la position de la bille, le grand axe et le petit axe de la bille et la distance au centre du noyau en fonction du temps écoulé depuis le début de l'application de la force.

5.2.5 Fonction de fluage

À l'issue d'une expérience, nous obtenons donc la position de la bille au cours du temps, en fonction de la force appliquée, pour 4 à 6 applications de la force.

Cependant, pour obtenir des mesures de modules visco-élastiques, il est nécessaire d'utiliser un modèle reliant le mouvement de la bille à la déformation de la cellule, et d'un modèle reliant la force exercée sur la bille à la contrainte subie par la cellule. Plusieurs modèles existent, en particulier un modèle théorique, le modèle de Gallet, et un modèle numérique développé dans la thèse d'Alain Kamgoué, mais les deux supposent que la bille est soumise à une force incluse dans le plan focal du microscope, ce qui n'est pas le cas de notre pince magnétique, qui tire également verticalement.

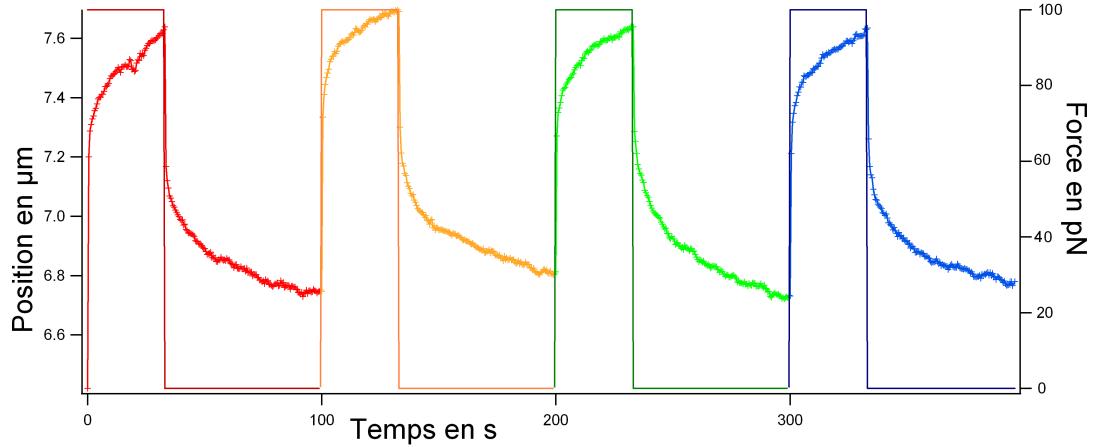


FIGURE 5.9 – Déplacement au cours du temps d'une bille adhérant sur une C2C12 et soumise à 4 créneaux de force de 100pN pendant 33s toutes les 100s.

Le modèle de Gallet suppose que la bille est enfoncee d'un angle θ dans la cellule, et qu'elle est soumise à une force horizontale \vec{F}_0 . La cellule est modélisée comme un milieu visco-élastique semi-infini homogène et isotrope. La bille est supposée s'ancrer dans la cellule de manière homogène et infiniment rigide. La valeur de la fonction de fluage est alors donnée par :

$$J(t) = 2\pi a \frac{2}{3} \left(\frac{1}{(\frac{3}{2} \sin \theta + \frac{\cos \theta}{\sin^3 \theta})} \right) \frac{\delta R(t)}{F_0} \quad (5.2)$$

où a est le rayon de la sphère, θ l'angle d'enfoncement dans le milieu visco-élastique, δR le déplacement de la bille et F_0 la composante horizontale de la force exercée sur la bille.

Passons en revue les différentes approximations.

L'ancrage de la bille à la cellule est assurée par les liaisons fibronectine-intégrine ponctuellement sur la surface de bille immergée dans la cellule. Il nous est impossible avec les techniques dont nous disposons d'avoir une quelconque idée de la quantité de liaisons ponctuelles à la surface de contact. Cependant, en plus des contacts spécifiques, la cellule peut établir avec la membrane des contacts non spécifiques. La supposition d'un très grand nombre de sites de liaisons au niveau de la surface de contact est donc crédible. On l'a vu précédemment, au niveau du complexe d'adhésions à l'intérieur de la cellule, la situation est extraordinairement complexe. Lorsque l'on sonde par les intégrines, on sonde la rigidité de l'ensemble de l'assemblage complexe qui les relie au cytosquelette d'actine.

La cellule est considérée comme un milieu semi-infini. Cette approximation serait facile à justifier si la bille était de taille négligeable par rapport à l'épaisseur de la cellule, mais l'épaisseur de la cellule et la taille de la bille sont en

fait presque égales ; et souvent, la bille est plus grande que l'épaisseur de la cellule lorsqu'elle est loin du noyau. Cependant, la cellule n'est certainement pas non plus isotrope. En effet, lorsqu'avec les pinces magnétiques, on exerce une force ayant deux composantes égales, l'une horizontale et l'autre verticale, la bille n'a un mouvement détectable que dans le plan horizontal. Dans le plan vertical, la bille ne sort pas du plan focal, alors qu'un mouvement très faible serait immédiatement détectable par l'intermédiaire des anneaux de diffraction. Sur le verre, les C2C12 sont très étalées et leur surface inférieure est ancrée à la fibronectine adsorbée sur le verre de façon très forte et la rigidité des cellules selon l'axe vertical est beaucoup plus grande à la fois que la rigidité dans les deux autres directions, mais aussi que la gamme de rigidités que nous pouvons sonder avec les pinces magnétiques.

Enfin, la cellule est considérée comme un matériau passif, ce qui n'est le cas que pendant les 10 à 20 premières secondes d'application de la force. Après ce temps, il devient évident que la cellule exerce activement des forces sur la bille. C'est pourquoi il faut se limiter à appliquer ce modèle pendant les premières 10 secondes de l'application de la force, et c'est pour cette raison qu'il est important de prendre le plus d'images possible pendant ce temps.

Durant sa thèse sous la direction de Jacques Ohayon, Alain Kamgoué a développé un modèle à partir de simulations numériques, qui prend à en compte à la fois l'angle d'enfoncement de la cellule et l'épaisseur finie de la cellule sous la bille, mais qui considère alors la cellule comme un matériau purement élastique dont il cherche à extraire le module d'Young. Il calcule alors un préfacteur géométrique :

$$p(\theta, \frac{h_u}{2R}) = \frac{F_0}{2\pi a \delta R(t) E}$$

avec h_u la hauteur de la cellule sous la bille, et E le module d'Young de la cellule. Ce qui nous donne, en le mettant sous la même forme que l'équation 5.2 :

$$J = 2\pi a p(\theta, \frac{h_u}{2R}) \frac{\delta R(t)}{F_0} \quad (5.3)$$

La différence entre les deux modèles est donc uniquement le facteur géométrique, qui dépend dans les deux cas de l'enfoncement de la bille, et dans le second cas également de l'épaisseur de la cellule en-dessous de la bille.

Durant les expériences de pinces magnétiques, nous ne pouvons pas mesurer l'angle d'enfoncement des billes. Cependant, des cellules fixées ont été observées au microscope confocal, ce qui nous a permis de mesurer l'angle d'enfoncement des billes, et la hauteur h_u pour 23 billes. On obtient alors :

$$\langle h_u \rangle = 1.6 \mu m \quad \langle \theta \rangle = 110^\circ$$

Ce qui nous donne avec les deux modèles :

$$p_{Gallet} = \frac{2}{3} \left(\frac{1}{\left(\frac{3}{2 \sin \theta} + \frac{\cos \theta}{\sin^3 \theta} \right)} \right) = 0.50 \quad (5.4)$$

$$p_{Kam} = 0.92 \quad (5.5)$$

Les deux modèles donnent donc deux valeurs différentes, mais ayant le même ordre de grandeur. Les deux supposent une force horizontale, ce qui est faux ici. Le modèle de Gallet prend en compte le caractère visco-élastique de la cellule, mais en faisant l'hypothèse d'un milieu semi-infini, alors que le modèle de Kamgoué-Ohayon considère une épaisseur finie mais oublie la composante visqueuse du milieu cellulaire.

Le véritable préfacteur se trouve probablement entre les deux, et en réalité ce n'est pas l'essentiel ici : il s'agit d'observer l'évolution des paramètres mécaniques de la cellule au cours du temps, et cette comparaison reste strictement identique quel que soit le préfacteur utilisé. C'est pourquoi les résultats seront en général présentés uniquement sous la forme $\frac{\delta R(t)}{F_0}$ sans tenir compte du préfacteur géométrique.

5.3 Étirement

L'objectif de ce dispositif est de soumettre les cellules à une déformation constante pendant plusieurs heures et de les observer en fluorescence pendant l'étirement sur un microscope inversé.

Par rapport aux expériences de pinces magnétiques, qui ont l'avantage de nous renseigner quantitativement sur les paramètres rhéologiques de la cellule, les expériences d'étirement du substrat permettent de suivre une trentaine de cellules en même temps pendant une expérience qui dure plus longtemps. Ainsi, avec l'étireur on peut observer une trentaine de cellules pendant deux heures, alors qu'avec les pinces magnétiques on aurait pendant ce temps observé 4 cellules pendant 30 minutes chacune.

5.3.1 Description de l'étireur

Pendant ma thèse j'ai conçu les plans de cet étireur de cellules qui a ensuite été réalisé par l'atelier du laboratoire. Il est composé de trois parties principales : la cuve, le support de lamelle et le plot. Toutes les parties de l'étireur sont en PVC, le plot étant transparent pour laisser passer la lumière du condenseur. L'étireur à une symétrie cylindrique autour d'un axe vertical.

La cuve

La cuve doit remplir deux fonctions : contenir le milieu de culture nécessaire aux cellules et permettre l'observation de celles-ci au microscope inversé. Elle est composée de deux pièces trouées en leur centre qui se vissent l'une dans l'autre. Au niveau de l'ouverture destinée à l'observation, on place une lamelle de verre de 30 mm de diamètre dont le contour a été préalablement enrobé dans du téflon souple. Cette lamelle de verre est enserrée entre les deux pièces de façon à former une cuve étanche dont le fond transparent permet l'observation.

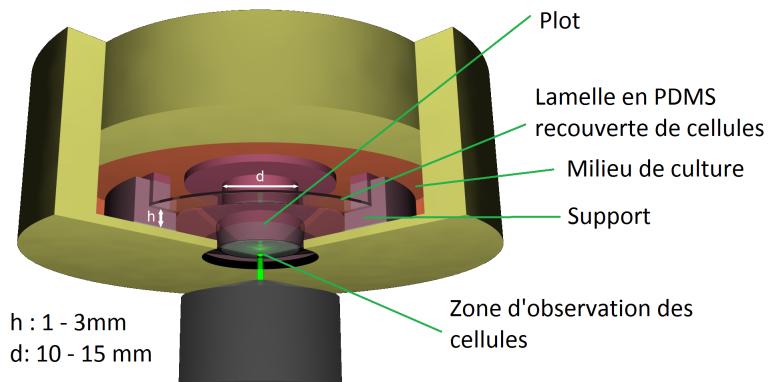


FIGURE 5.10 – Modélisation de l'étireur vu de dessous pendant l'étirement.

La lamelle de PDMS

Les cellules adhèrent à une lamelle de PDMS réticulé élastique recouverte de fibronectine. Cette lamelle est maintenue par le support et déformée par le plot qui la pousse vers le bas. Le PDMS est fabriqué à partir d'un mélange 90% PDMS et 10% de réticulant. On place alors 1,8g du mélange dans une boîte de Petri de XX mm de diamètre et on l'étale jusqu'à la recouvrir entièrement de manière homogène. La masse est choisie de façon à ce que le PDMS étalé fasse 0,3mm d'épaisseur. Les boîtes recouvertes de PDMS sont alors placées toute la nuit dans un incubateur à 60°C pour réticuler le gel. À l'aide d'un emporte-pièce, des disques de 30mm sont alors découpés dans les boîtes.

Le support

Le support est la pièce de serrage de la lamelle de PDMS sur laquelle sont cultivées les cellules. La lamelle de PDMS est placée entre deux anneaux plats de teflon d'un millimètre d'épaisseur qui sont destinés à homogénéiser la pression exercée sur la lamelle par la pièce de serrage. L'ensemble est posé sur un support de hauteur variable (1 mm ou 3mm) qui va déterminer l'étirement maximal possible, et serré par une pièce qui se visse dans le support. Cette pièce doit maintenir fermement les bords de la lamelle en place tandis que le centre est étiré par le plot.

Le plot

Le plot transparent est maintenu dans une pièce qui se visse à l'intérieur de la cuve. Le vissage va faire descendre le plot, qui va ainsi étirer la lamelle en la rapprochant du fond de la cuve et donc de l'objectif du microscope. L'utilisation du support de 1mm ou de 3mm permet de fixer la lamelle de PDMS à différentes hauteurs, et donc pour un même abaissement du plot d'étirer plus ou moins la

lamelle. Il existe deux diamètre de plots cylindriques : 10mm et 15mm, qui permettent également de régler l'étirement subit par le PDMS.

5.3.2 Calibration de l'étireur

Un modèle géométrique simple permet d'estimer rapidement l'augmentation de la surface de la lamelle de PDMS en fonction du diamètre et de l'enfoncement du plot :

$$R_{etire} = R_p + \sqrt{h^2 + (R_l - R_p)^2}$$

$$\Delta A = \frac{R_{etire}^2}{R_l^2} - 1$$

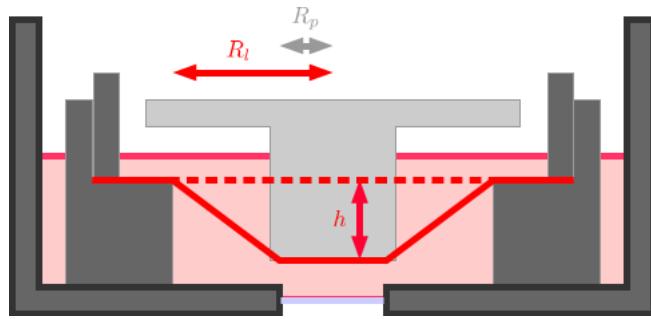


FIGURE 5.11 – Modèle simple de la déformation créée par l'étireur. R_p est le rayon du plot, R_l le rayon de la lamelle qui n'est pas maintenu par le support et h la hauteur d'enfoncement du plot.

Afin de le comparer à l'étirement réel subi par la lamelle de PDMS, des lamelles ont été recouvertes de Pluronics, puis exposées à un rayonnement UVC à travers un masque de quartz contenant un grand nombre de carrés de taille connue formant un quadrillage. Puis les lamelles ont été recouvertes de fibronectine fluorescente, qui ne pouvait adhérer qu'aux endroits non éclairés par les UV.

Ingédients :

- une lamelle de PDMS vierge
- Pluronics
- Fibronectine Cy3
- un masque en quartz
- une lampe UVC

Protocole

1. Préparer une solution de Pluronics 0,2% en masse

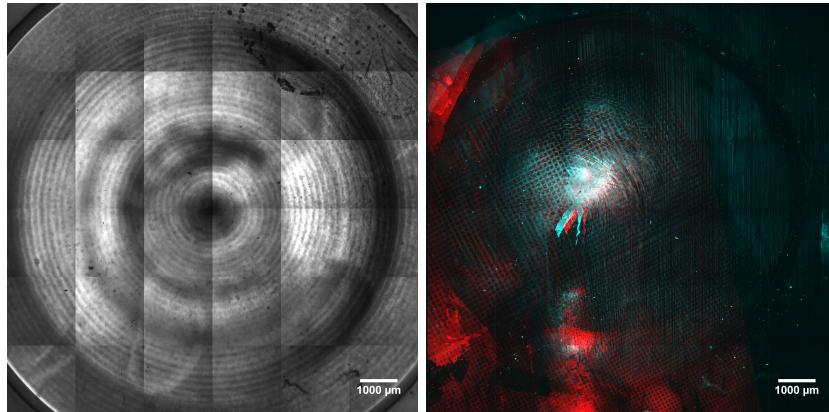


FIGURE 5.12 – À gauche : image du plot reconstituée à partir d'images prises au 4X sur le microscope confocal. À droite : images en fluorescence du quadrillage de fibronectine Cy3 avant (en rouge) et après (en bleu) un étirement 30%.

2. Laisser incuber 1 ml de la solution de Pluronics pendant une heure à température ambiante
3. Rincer au PBS, puis à l'eau, laisser sécher
4. Exposer la lamelle derrière le masque aux UVC pendant 7 minutes
5. Diluer 4 μg de fibronectine fluorescente dans 1 ml de PBS
6. Laisser la solution de fibronectine incuber 30 minutes à 37 °C sur la lamelle, à l'abri de la lumière
7. Rincer au PBS et stockez à 4 °C dans le PBS, à l'abri de la lumière

Nous avons ainsi obtenu des lamelles recouvertes d'un quadrillage visible en microscopie de fluorescence. Ce quadrillage a été observé avant et après étirement, et l'étirement a alors été mesuré à partir de la formation du quadrillage.

Les images nous montrent que la déformation du PDMS par le plot est radiale et uniforme, et que le modèle géométrique le plus simple décrit bien quantitativement la déformation subie.

5.3.3 Le microscope confocal

Pour les expériences d'étirement, il était nécessaire d'utiliser le microscope confocal du laboratoire car il était le seul à disposer d'une platine motorisée, de 4 lasers et des filtres automatisés. Cependant, l'étireur impose d'avoir un plan focal situé à une grande distance de l'objectif, ce qui impose l'utilisation d'un objectif à air à grande distance de travail. Cela nous interdit malheureusement de profiter de la fonctionnalité du confocal qui est de faire des images en 3D.

Les observations en fluorescence contiennent donc nécessairement une intégration du signal selon l'axe vertical, ce qui implique que les endroits où la

cellule est épaisse apparaissent comme plus lumineux que les endroits où elle est fine.

Il en ressort que la zone du noyau, la plus épaisse de la cellule, est presque toujours plus lumineuse que les bords de la cellules qui sont très fins. Il peut alors se révéler peu pertinent de comparer la fluorescence du cytoplasme en entier et la fluorescence du noyau lorsqu'on veut comparer la concentration d'une protéine fluorescente de part et d'autre de la membrane nucléaire.

C'est pourquoi il peut être intéressant de regarder non seulement toute la cellule, mais également une zone péri-nucléaire, d'épaisseur semblable au noyau. Entre le noyau et la zone péri-nucléaire, on compare des luminosités à épaisseur fixée.

Description générale Le microscope confocal est composé :

- d'un microscope inversé Olympus IX81
- de 4 lasers de puissance réglable Andor Laser Combiner 400 series
- d'une roue motorisée de 10 filtres Sutter Lambda 10B Controller
- d'un disque rotatif Yokogawa CSUX1
- d'une platine motorisée Prior Proscan II
- d'un système piézo de réglage pour l'axe Z Andor APZ-100
- d'une caméra Andor IXON+
- d'un ordinateur avec le logiciel constructeur IQ2 pour contrôler l'ensemble
- d'une enceinte thermalisée par un Cube 2 de Life Imaging Services

Dans les expériences décrites, sauf indications contraires, il sera utilisé avec un objectif 20X Olympus à grande distance de travail.

Quatre configurations d'observation ont été utilisées pour la fluorescence :

Rouge profond : Laser d'excitation 640nm et filtre 685nm

Rouge : Laser d'excitation 561nm et filtre 607nm

Vert : Laser d'excitation 488nm et filtre 525nm

Bleu : Laser d'excitation 405nm et filtre 465nm

5.3.4 Protocole d'étirement observé en direct

Les cellules sont ensemencées sur des lamelles de PDMS préalablement recouvertes de fibronectine. Afin d'améliorer l'efficacité de transfection, dans le protocole final, les cellules sont transfectées avec la nanofectine pendant 6h avant d'être rincées décollées, comptées et ensemencées à raison de 110000 cellules par lamelle.

Après avoir mené un certain nombre d'expériences, nous avons constaté que la sensibilité de MRTF-A à la stimulation par le sérum est telle que le fait de remplacer le milieu de culture dans lequel les cellules baignaient depuis 24h par du milieu de culture neuf provoque des modifications non négligeables de la localisation de MRTF-A dans les cellules. Il est donc essentiel de conserver le même milieu de culture tout au long de l'expérience.

Après ensemencement et adhésion, les lamelles de PDMS peuvent être montées à l'avance sur le support et maintenues dans 5 à 7ml de milieu de culture blanc (5ml pour l'étirement 10% et 7ml pour 30%).

Juste avant l'expérience, la lamelle et le milieu de culture sont montés dans le reste de l'étireur et 1,5% d'HEPES sont alors ajoutés pour tamponner l'acidité du milieu pendant la durée de l'expérience. L'étireur complet est alors placé sur la plate-forme du microscope et observé à l'aide d'un objectif 20X (trouver les caracs de l'objectif). Les cellules sont observées en lumière blanche et en fluorescence une première fois avant étirement brièvement, afin d'avoir une idée de l'état de départ des cellules.

En vissant le plot, on étire alors la lamelle rapidement en quelques secondes jusqu'à la déformation souhaitée. On cherche alors des cellules exprimant la MRTF-A GFP. À chaque fois qu'une ou plusieurs cellules sont visibles dans un champ, on enregistre la position de la platine motorisée. Toutes les 5 à 10 minutes, on retourne observer toutes les cellules répertoriées afin de suivre l'évolution de la localisation de MRTF-A au cours du temps. De nouvelles cellules sont recherchées jusqu'à 40 minutes après l'étirement et l'observation est ensuite maintenue pendant 2h après l'étirement.

5.3.5 Protocole d'étirement fixé

Le protocole d'étirement avec observation en direct ne nous permet pas d'observer la population de cellules à des instants courts, car il faut du temps pour retrouver un nombre suffisant de cellules. De plus, l'observation de l'état du cytosquelette en direct est difficile car les différents marqueurs disponibles perturbent trop le système : la surexpression d'actine lors de la transfection avec une actine McCherry modifie de manière très visible l'équilibre entre MRTF-A et l'actine G, la LifeAct RFP, qui marque les filaments d'actine, est exprimée tellement intensément que sa fluorescence empiète sur celle de MRTF-A GFP. De plus, il n'existe pour l'instant aucun marqueur commercial permettant de visualiser l'actine G dans les cellules vivantes.

Fixer les cellules nous permet d'avoir un marquage quadrichrome : la F-actine en rouge-profound grâce à la phalloïdine, la G-actine en rouge grâce à la DNaseI, MRTF-A GFP ou anticorps anti-MRTF-A en vert et l'ADN du noyau en bleu grâce au DAPI.

Pour une expérience d'étirement fixé, on prépare une boîte de C2C12 proches de la confluence (60-70%) transfectées si l'on veut observer la MRTF-A GFP. Elles sont ensemencées ensemble sur 6 lamelles de PDMS dans une plaque 6 trous dans 3ml de milieu de culture 24h avant le début de l'expérience. Le lendemain, une de ces lamelles est montée sur le support, rincée au PBS et fixée immédiatement, c'est la lamelle témoin. Les autres lamelles sont successivement étirées, laissées à l'incubateur pendant un temps donné, puis démontées, rincées et fixées immédiatement. On obtient ainsi pour un même étirement une lamelle à $t=0$ et 5 lamelles à différents temps après étirement (par exemple 5, 10, 20, 30, 60 minutes après étirement).

Ces lamelles sont ensuite marquées dans les 4 couleurs suivant un protocole strictement identique, et observées avec des paramètres strictement identiques (intensité du laser, temps d'exposition ...) au microscope, afin de pouvoir comparer quantitativement les intensité de fluorescence d'une lamelle par rapport

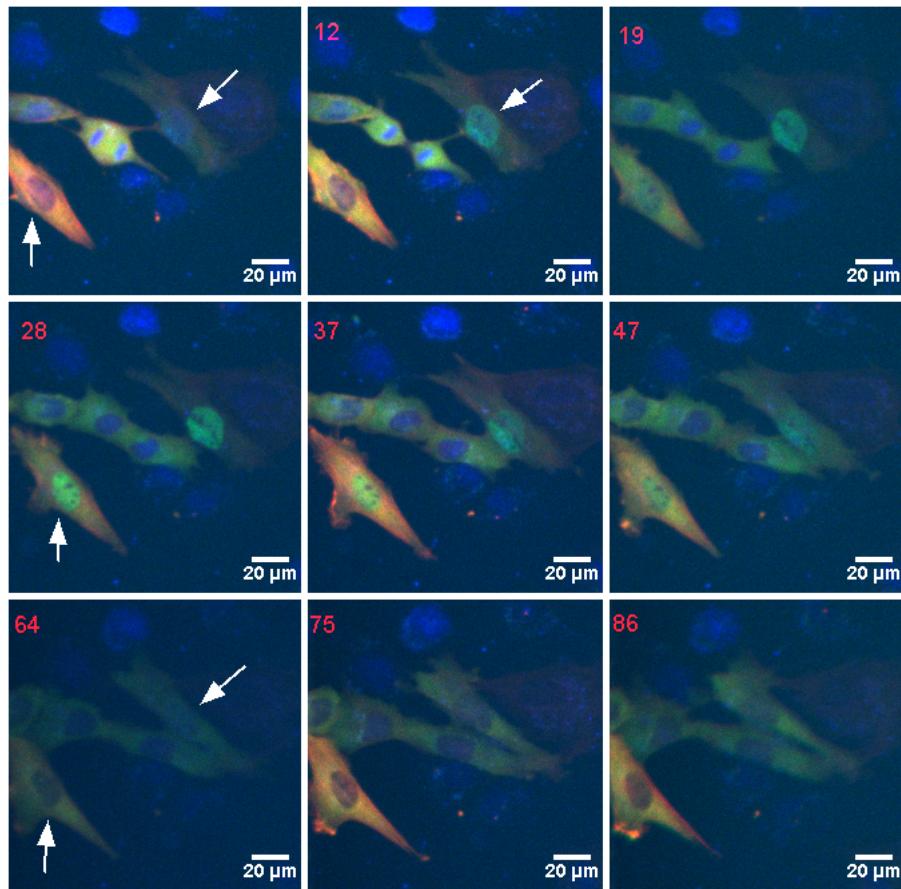


FIGURE 5.13 – C2C12 transfectées MRTF-A GFP (en vert) et Actine Mcherry (en rouge), marquées au DAPI (en bleu), étirées à 30% pendant 120 minutes. Dans les deux cellules marquées d'une flèche, MRTF-A s'accumule dans le noyau, puis retourne dans le cytoplasme.

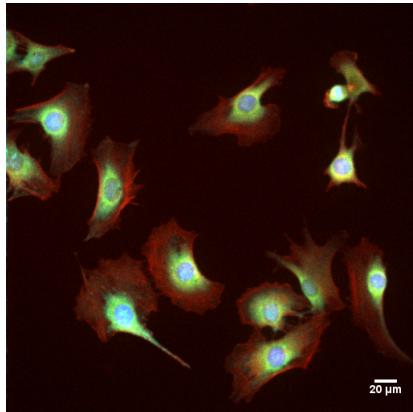


FIGURE 5.14 – C2C12 marquées par la phalloïdine (ici en rouge), par la DNase I (en vert), un anticorps anti-MRTF-A (en cyan) et le DAPI (en bleu).

aux autres.

5.3.6 Dépouillement des images

Étirement observé en direct, traitement qualitatif

On obtient après une observation en direct d'étirement typique une vingtaine de série d'images de cellules observées pendant 120 minutes après étirement, comme la série exposée en figure 5.13 le présente. Les images sont observées grâce à ImageJ, qui nous permet de reconstituer une pile d'images en 4 dimensions (x,y,temps et couleur). On peut alors observer qualitativement à l'œil s'il y a plus de MRTF-A GFP dans le noyau, dans le cytoplasme, ou si c'est homogène.

Toutes les données finales sont destinées à être stockées dans une base de donnée SQL. Cette forme de stockage de données permet de sélectionner et de trier les données en fonction de nombreux critères à la fois quantitatifs et qualitatifs. Pour remplir la base de donnée, j'ai également créé une interface en Python. Cette interface récupère dans les métadonnées des images prises au microscope les temps auxquelles ces images ont été prises. L'utilisateur peut alors remplir pour chaque temps la localisation principale de MRTF-A dans la cellule : Nucléaire, Homogène ou Cytoplasmique. Pour chaque champ d'observation, il note également le nombre de cellules visibles dans le champ, ce qui permet d'évaluer la densité locale de cellules.

Dans cette base de données, on retrouve alors pour chaque cellule la localisation de MRTF-A au cours du temps écoulé depuis l'étirement, l'étirement, le passage, le nombre de cellules présentes dans chaque champ, et l'expression en Actine Mcherry.

Étirement fixé, traitement quantitatif

Pour chaque lamelle fixée, on obtient une série d'images en 5 couleurs : rouge profond, rouge, vert, bleu et lumière blanche.

À partir des images en rouge profond et en rouge, on peut créer une nouvelle image en divisant chaque valeur de pixel rouge profond par la valeur en pixel rouge. On obtient alors une image représentant dans l'espace le rapport entre le signal de la F-actine et celui de la G-actine.

Pour chaque cellule, on procède alors ainsi :

- Si la cellule est isolée, on utilise un seuillage sur l'image en rouge profond pour sélectionner le contour de la cellule
- Si la cellule est collée à une autre cellule, il faut sélectionner le contour à la main
- On mesure alors la valeur moyenne des pixels dans cette zone, son aire, ses paramètres géométriques... successivement en rouge profond (F-actine), en rouge (G-actine) et en rapport (F/G).
- On fait un seuillage sur l'image en DAPI afin de sélectionner le contour du noyau
- On mesure alors les valeurs dans le noyau en rouge profond, rouge, vert et en rapport F/G.
- On sélectionne enfin une zone péri-nucléaire d'intensité homogène, qui correspond à une zone d'épaisseur proche de celle du noyau
- On mesure alors les valeurs en rouge et en vert dans cette zone

On obtient alors des tableaux de données contenant les valeurs moyennes d'intensité pour la phalloïdine, la DNase et la MRTF-A (GFP ou endogène) et les aires des cellules et de leurs noyaux.

Chapitre 6

Rhéologie locale d'une cellule unique

Les pinces magnétiques ont été construites afin de pouvoir observer l'évolution des caractéristiques mécaniques d'une cellule au cours du temps, lorsque celle-ci est soumise à des forces de manière répétée. L'objectif était de poursuivre ainsi une investigation débutée par Delphine Icard avec les pinces optiques. En effet, dans sa thèse, elle avait observé que lorsqu'une force identique est appliquée de manière répétée sur une cellule, elle devient de plus en plus rigide, et que cet effet s'accompagne d'un recrutement d'actine autour du point d'application de la force.

Deux expériences sont décrites ici : les expériences faites avec la pince immédiatement après sa construction et donc le but est d'observer l'évolution des paramètres mécaniques de C2C12 isolées, et des expériences faites bien après en collaboration avec Pierre-Olivier Strale sur d'autres cellules exprimant des cadhérines mutantes.

6.1 Description

6.1.1 Séries d'expériences

Trois séries d'expériences ont été réalisées avec les pinces magnétiques. La première série d'expérience a été réalisée sur des C2C12 en testant deux concentrations de fibronectine pour enrober les billes magnétiques : $2 \mu\text{g}$ ou $4 \mu\text{g}$ de fibronectine pour 2.10^7 billes, ce qui correspond à 1.57 et 3.15 mg/m^2 de fibronectine par unité de surface des billes. On applique sur ces cellules 4 créneaux de force successifs de 125 secondes chacun avec une période de 250 secondes.

La seconde série d'expériences a été réalisée sur une autre série de C2C12, issues d'une nouvelle commande à l'ATCC, $4 \mu\text{g}$ de fibronectine sur 2.10^7 billes et 6 fois 125 secondes de force avec une période de 250s. À la suite des expériences de la série n° 1, il nous est en effet apparu que 4 applications de force ne

permettaient pas toujours de caractériser le comportement à long terme de la cellule, et nous avons donc augmenté le nombre d'applications de force.

La troisième série d'expériences est un témoin réalisé avec les mêmes cellules que l'expérience précédente, la même quantité de fibronectine sur les billes, mais seulement 10 secondes d'application de la force, ce qui correspond au temps nécessaire pour extraire les paramètres mécaniques de la cellule.

Enfin les pinces magnétiques ont également servi à faire des mesures dans le cadre d'une collaboration avec Pierre-Olivier Strale et René-Marc Mège de l'Institut Jacques Monod. Il s'agissait de mesurer les caractéristiques mécaniques de cellules A431D exprimant une cadhérine mutante incapable de former des interactions cis avec d'autres cadhérines de la même membrane, et des billes enrobées de cadhérines et non de fibronectine.

6.1.2 Sélection préliminaire

Une fois l'expérience mise en place comme cela a été décrit dans le chapitre précédent, la première étape consiste à trouver une bille adhérente à une cellule sur laquelle on puisse faire des mesures. On écarte volontairement toutes les billes qui sont trop proches d'une autre bille : en effet, lorsque deux billes sont proches, elles interagissent, et s'attirent l'une vers l'autre jusqu'à former un doublet aligné avec les lignes de champ magnétiques. Il est alors impossible de connaître précisément la force exercée sur la bille.

Lorsque l'on repère une bille isolée adhérente à une cellule, un premier test rapide est réalisé. On commence par appliquer une force oscillante sur la bille, et on observe si un mouvement oscillant de la bille est détectable. Si aucun mouvement n'est détectable, on augmente la force jusqu'à détecter un mouvement. Si aucun mouvement n'est détectable à la force maximale, c'est que la bille est trop fortement ancrée, et la cellule trop rigide pour que l'on puisse mesurer ses caractéristiques à l'aide de notre dispositif.

Il aurait été intéressant de compter le nombre de cellules écartées à cause d'une trop grande rigidité, car cela nous aurait donné un aperçu de la quantité de la population qu'il était impossible de sonder avec le dispositif tel qu'il était monté. Cela a d'ailleurs été fait dans la deuxième expérience sur les cadhérines mutées.

6.1.3 Sélection a posteriori

Il arrive qu'au cours de l'expérience, lorsqu'une bille n'est que peu ancrée à la cellule, elle soit arrachée lors d'une application de la force. Il peut également arriver que la cellule observée ait un mouvement propre tellement important qu'elle fait sortir la bille du champ de la caméra.

Dans ces deux cas, les expériences partielles ne sont pas dépouillées avec les autres, car il leur manque une partie de l'information, mais elles sont dénombrées.

6.1.4 Application de la force : la fonction de fluage

Direction du mouvement des billes

Au temps $t=0$, une force constante est appliquée sur la cellule par l'intermédiaire de la bille.

La bille est attirée par la pointe de la pince par une force $\vec{F}_{tot} = F\vec{u}_x + F\vec{u}_z$ dirigée selon l'axe bille-pointe.

Sur la vidéo, on peut observer la position dans le plan XY du centre de la bille, et constater que la bille est bien attirée par la pointe selon X et n'a qu'un mouvement faible selon Y dû aux petits défauts d'alignement de la pointe. La plupart des billes ont un mouvement total de l'ordre de 0.1 à 0.5 μm lors d'une application de force.

Une fois les positions du centre de la bille extraites de la vidéo par le logiciel d'analyse d'images, on peut en tirer le déplacement de la bille par rapport à sa position au temps $t=0$ de l'application de la force, pour chaque créneau.

On peut également obtenir des informations sur le mouvement de la bille en Z en observant la variation de son rayon, qui augmente lorsqu'elle quitte le plan focal.

Une calibration à l'aide d'une calotte piézo-électrique a permis de déterminer qu'une variation de diamètre de la bille de $0.04\mu\text{m}$ correspond à une variation de hauteur de $0.2\ \mu\text{m}$. Or sur la quasi-totalité des billes observées au cours de ces expériences, la variation du diamètre des billes est inférieure à $0.02\ \mu\text{m}$, ce qui correspond à une borne supérieure de mouvement vertical de $0.1\ \mu\text{m}$ de l'ordre de la borne inférieure des mouvements détectés selon l'axe X.

La pince magnétique applique une force égale selon les deux axes X et Z, mais les déplacements mesurés dans les deux directions sont différents : les cellules semblent plus rigides dans la direction verticale par rapport à l'horizontale.

A AJOUTER : CELLULES DE PIERRE-OLIVIER QUI BOUGENT PLUS EN VERTICAL : CELLULES PLUS EPAISSES ?

Fonction de fluage en loi de puissance

Par défaut, la fonction de fluage sera calculée sans son préfacteur géométrique, qui dépend du modèle choisi mais est strictement identique d'une expérience à l'autre ici.

$$J(t) = 2\pi ap\xi(t) \quad \xi(t) = \frac{\delta R(t)}{F}$$

La fonction de fluage de la cellule peut être modélisée par une loi de puissance à une échelle de temps inférieure à 15-20 secondes. Au-delà, les mouvements actifs de la cellule perturbent le mouvement de la bille.

On peut alors réaliser un ajustement avec la fonction :

$$\xi(t) = \frac{\delta x}{F} = A \left(\frac{t}{t_0} \right)^\alpha$$

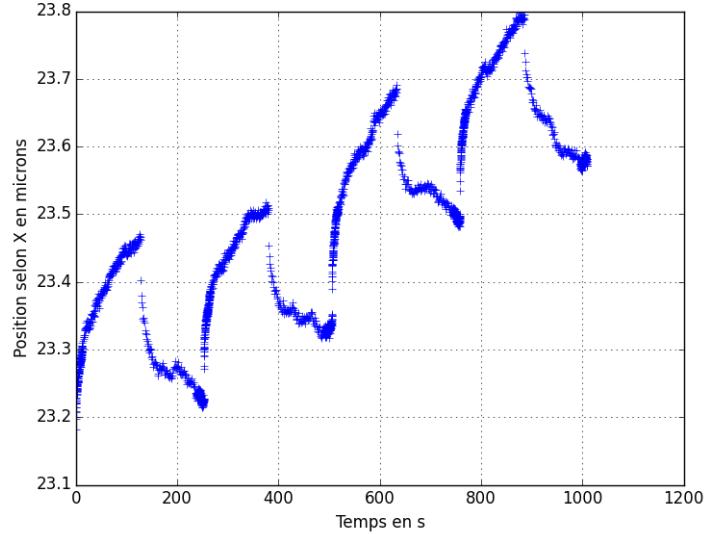


FIGURE 6.1 – Exemple de tracé de la position en X d'une bille au cours du temps lorsqu'elle est soumise à 4 créneaux de force successifs. $\delta R(t)$ est directement proportionnelle à $\delta X(t)$ lorsque le déplacement ne se fait que selon l'axe X . On peut remarquer l'allure caractéristique en loi de puissance.

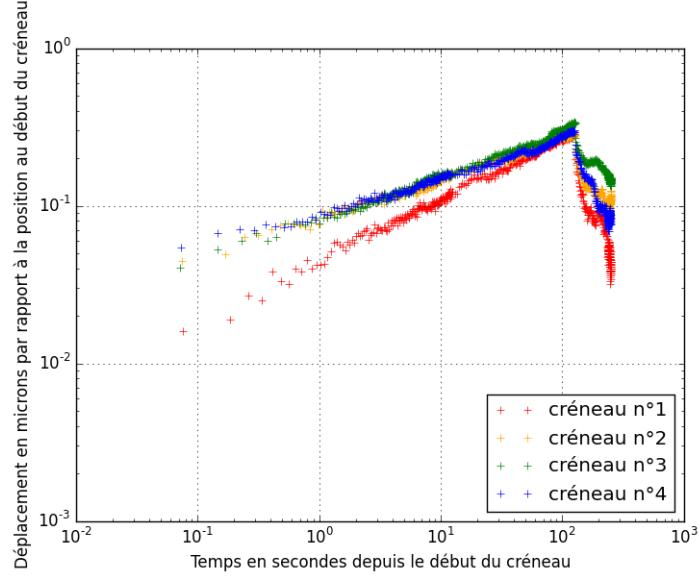


FIGURE 6.2 – Déplacement de la bille en fonction du temps écoulé depuis le début du créneau, pour les 4 créneaux successifs, pour la même cellule que la figure 6.1. On peut remarquer ici qu'après le premier créneau le déplacement est plus grand en réponse à la même force : la cellule s'est ramollie.

A et α sont les caractéristiques mécaniques de la cellule, t le temps écoulé depuis le début de l'application du pas de force, $t_0=1s$.

Pour un solide parfaitement élastique, la déformation en réponse à un palier de force est immédiate et constante au cours du temps, et la fonction de fluage est alors l'inverse du module d'Young.

$$J(t) = \frac{1}{E} = 2\pi ap\xi(t)$$

$$\begin{aligned} J_0 &= \frac{1}{E} = 2\pi apA \\ \alpha &= 0 \end{aligned}$$

Pour un liquide parfaitement visqueux, la fonction de fluage est alors proportionnelle au temps écoulé depuis le début de l'application de la force :

$$\begin{aligned} J(t) &= \frac{t}{\eta} = 2\pi ap\xi(t) \\ J_0 &= \frac{t_0}{\eta} = 2\pi ap \frac{A}{t_0} \\ \alpha &= 1 \end{aligned}$$

A représente alors la déformabilité du matériau : plus il est élevé à un instant donné, plus le matériau a été déformé à force égale. α quantifie la dépendance temporelle de cette déformation : plus il est grand, plus le matériau aura tendance à couler comme un liquide visqueux, plus il est petit et plus il se déformera comme un solide élastique.

Un même créneau de force est appliqué 4 à 6 fois sur les billes avec une période de 250 secondes. À chaque application de force, on peut extraire les paramètres A et α et ainsi observer leur évolution au cours du temps.

6.2 Résultats

6.2.1 Caractéristiques mécaniques des C2C12

Les C2C12 sont des cellules très diverses dans leur taille et dans leur forme, mais également en ce qui concerne les paramètres mécaniques : A s'étale sur deux décades, de $7 \cdot 10^{-5}$ à $9 \cdot 10^{-3} \mu\text{m/pN}$ avec une médiane à $1.22 \cdot 10^{-3} \mu\text{m/pN}$. Avec le modèle de Gallet, cela correspond à des modules visco-élastiques G_0 allant de 12 Pa à 6 kPa avec une médiane à 87 Pa. Avec le modèle de Kamgoué-Ohayon, on obtient un module d'Young E allant de 4 à 546 Pa, avec une médiane à 32 Pa.

L'exposant médian, $\alpha = 0.18$ nous indique que la réponse mécanique des cellules est principalement élastique ce qui peut nous conforter quant à l'opportunité de cette hypothèse du modèle de Kamgoué-Ohayon.

Il est important de rappeler que la population est tronquée de ses cellules les plus rigides, ce qui explique la forme non symétrique de A . Les valeurs obtenues

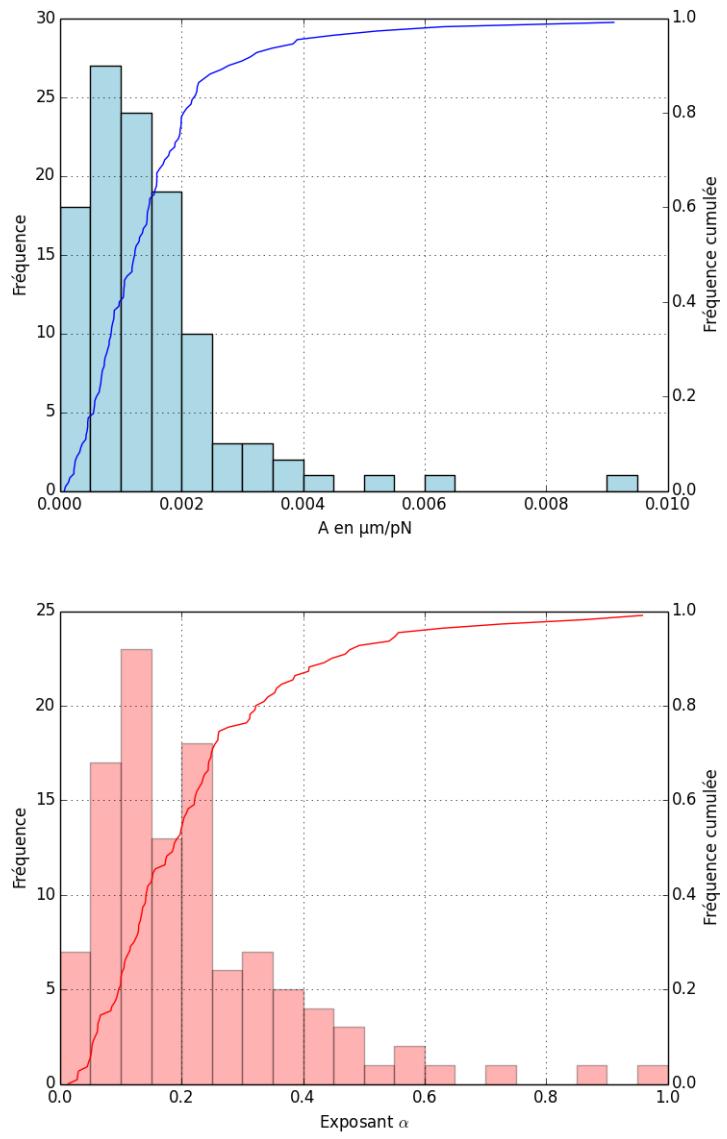


FIGURE 6.3 – Caractéristiques mécaniques des C2C12 avec une concentration de fibronectine disponible sur les billes égale à 3.15 mg/m^2

peuvent paraître faibles en comparaison de celles obtenues précédemment sur la même lignée par Delphine Icard et Elisabeth Charrier, cependant, il est à noter que les angles d'enfoncement choisis ici sont bien plus élevés que les hypothèses retenues dans ces deux autres séries de mesures. De manière générale, on voit que les valeurs de modules visco-élastiques sont très variables d'un modèle à l'autre.

6.2.2 Influence de l'enrobage des billes en fibronectine

Pendant la première série d'expériences, des billes enrobées de deux concentrations différentes de fibronectine ont été utilisées.

On peut voir en observant les deux populations que A est plus élevé lorsque l'enrobage est moins dense, alors que l'exposant ne varie pas, mais cette élévation n'est pas significative avec la quantité de cellules que nous avons observées. Lorsque la quantité de fibronectine sur les billes est plus faible, les cellules apparaissent donc comme plus déformables, moins rigides, ce qui s'explique facilement par un ancrage moindre de la bille au cytosquelette de la cellule.

En revanche, l'équilibre entre l'élasticité et la dissipation dans la cellule n'est pas altéré : on sonde toujours le même cytosquelette, mais avec un attachement moins fort.

6.2.3 Évolution des paramètres mécaniques

Pour chaque cellule, la force est appliquée à 4 reprises pour la série n° 1 et à 6 reprises pour les séries n° 2 et n° 3. On obtient alors un couple de paramètre (A, α) par créneau, donc on observe l'évolution.

Dans les résultats finaux, ne sont conservées que les cellules pour lesquelles la mesure des paramètres (A, α) est possible lors de l'application du premier créneau. En revanche, il arrive pour un nombre non négligeable de cellules que le déplacement de la bille pendant les créneaux suivants passe en dessous de notre résolution, ce qui signifie que la cellule devient trop rigide. Dans ce cas de figure, A a été fixé à 0.

On peut voir sur la figure 6.5 qu'il n'y a pas de changements de A communs à toute la population de cellules : ce ne sont pas toutes les cellules qui se rigidifient ou se ramollissent ensemble. En revanche, on peut observer un décalage des exposants vers les valeurs les plus faibles aux 2^e et 3^e créneaux, qui se résorbe ensuite, mais il n'est pas significatif. Le comportement mécanique de ces cellules soumises à une force pendant de longues durées évolue donc d'abord dans le sens d'une « élastification », d'une diminution de la part dissipative de la réponse mécanique.

Lorsque l'on applique une force pendant 125 secondes, l'amplitude des variations par rapport à la mesure d'origine de A et α se détache du bruit obtenu pour seulement 10 secondes de forces, comme on peut le voir sur l'histogramme 6.6. L'application d'une force pendant une durée plus longue permet donc de modifier significativement les paramètres A et α .

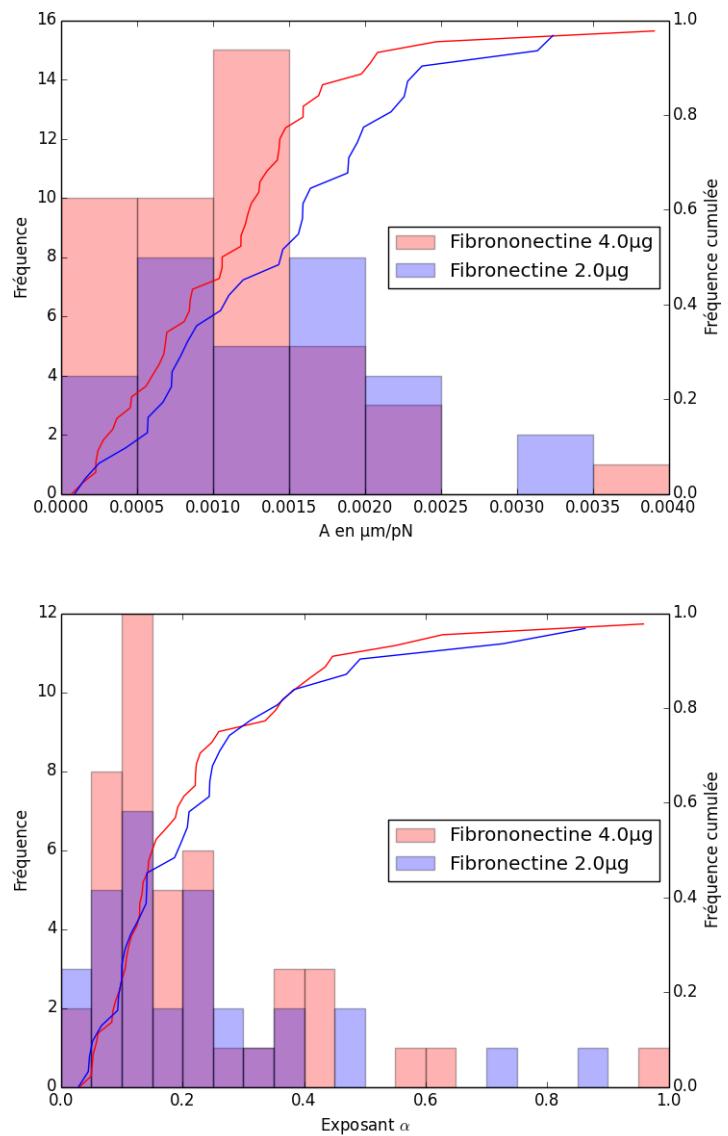


FIGURE 6.4 – Caractéristiques des C2C12 sondées par des billes ayant différentes densités de fibronectine à leur surface. $p=0.13$

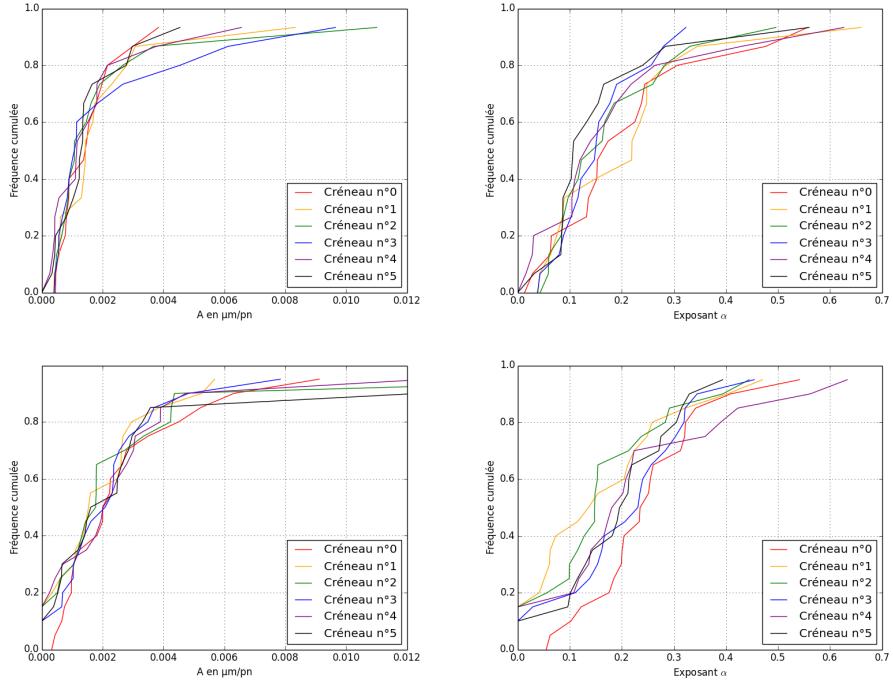


FIGURE 6.5 –

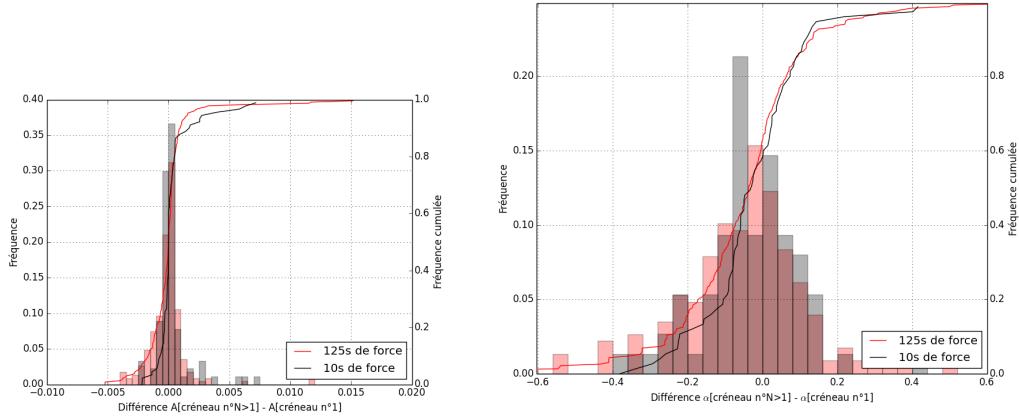


FIGURE 6.6 – Amplitude des évolutions entre la première mesure et les 6 suivantes, pour la série n° 3 témoin (en noir) et pour la même concentration de fibronectine et 125s de force en rouge.

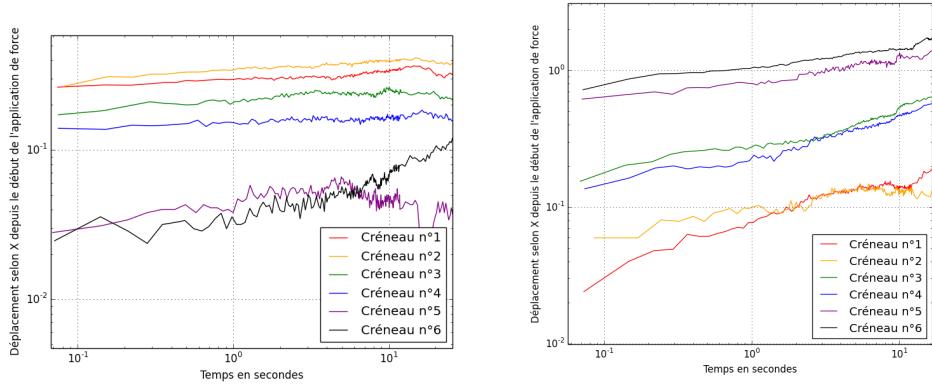


FIGURE 6.7 – Exemples de déplacements au cours du temps et au cours des applications de forces d'une cellule considérée comme en rigidification (en haut) et d'une cellule en ramollissement (en bas).

6.2.4 Classification des cellules selon leur évolution

Il n'y pas de tendance d'évolution de la population de cellules sondée au cours du temps, cependant on peut observer au niveau individuel l'évolution de A pour en déduire une tendance au ramollissement ou à la rigidification.

On classe ainsi les cellules en trois groupes : celles qui se rigidifient, avec A décroissant significativement sur les 4 à 6 applications de force, celles qui se ramollissent A croissant significativement sur les 4 à 6 applications de force, et celles qui n'ont pas une évolution significative ou cohérente dans le temps de A . On peut créer un classement semblable avec l'évolution de l'exposant α .

On peut remarquer sur la figure 6.8 que les cellules ont majoritairement un comportement incohérent lorsque la force n'est appliquée que durant 10 secondes. Cette évolution aléatoire et de plus de faible amplitude comme on le voit sur la figure 6.6 est très probablement le bruit sur la mesure de A .

Lorsque la force est appliquée pendant 125 secondes, on peut au contraire observer qu'il y a beaucoup plus de cellules qui se ramollissent ou se rigidifient de manière persistante au cours du temps, avec une amplitude de variation plus grande que pour le témoin.

6.2.5 Influence de la position de la bille sur la cellule sur l'évolution des propriétés mécaniques

On peut donc constater que parmi les cellules soumises à 125 secondes de force de manière répétée, 60% ont une évolution cohérente de A vers la rigidification ou le ramollissement et 40% une évolution incohérente.

Cette évolution dépend de la valeur initiale de A : ce sont les cellules les plus molles initialement qui se rigidifient, et inversement. Mais cette dépendance est

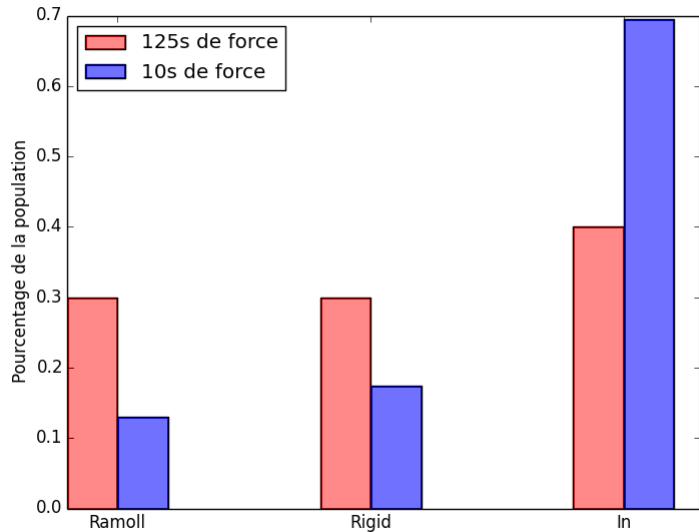


FIGURE 6.8 – Répartition des cellules dans les trois catégories d'évolution de A au cours des applications de force

artificielle : les cellules déjà rigides qui se rigidifient n'ont pas de mouvement visible sur lequel faire des mesures, et les cellules molles qui se ramollissent finissent par voir leur bille arrachée, ou sortir du champ d'observation.

Nous avons alors cherché si ces différences de comportement ne provenaient pas de la position de la bille sur la cellule, et de la direction selon laquelle on appliquait la contrainte.

Il n'y pas de différence significative entre la distance dans le plan focal entre le bord de la bille et le bord du noyau (qui peut être négative si la bille est au-dessus du noyau) des trois différentes populations de cellules.

Cependant, on peut observer que la position de la bille par rapport au noyau de la cellule, c'est-à-dire savoir si on tire la bille pour l'éloigner du noyau, ou pour la pousser vers le noyau, ou perpendiculairement à l'axe bille-noyau, est significativement différente pour les cellules ayant un comportement différent (testé avec un G-test d'indépendance).

En effet, 65% des cellules rigidifiées sont du côté opposé à la direction de la force par rapport au noyau (leur angle est de plus de 135°), alors que 57% des cellules incohérentes ont un angle compris entre 45° et 135° .

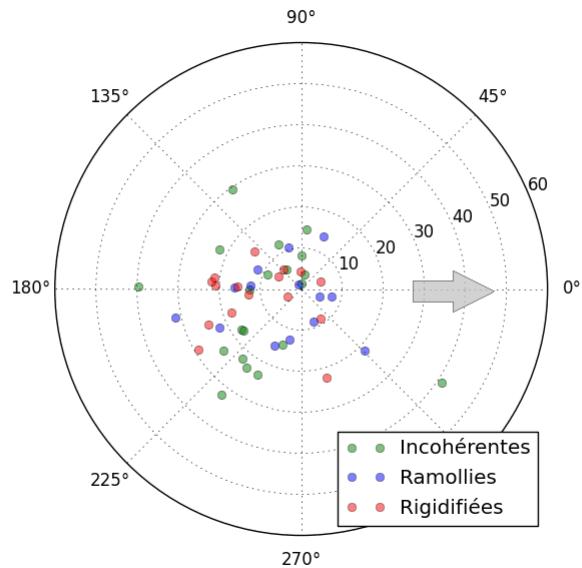


FIGURE 6.9 – Longueur et orientation du vecteur entre le bord du noyau et la bille. La flèche représente la direction de la force exercée sur les billes.

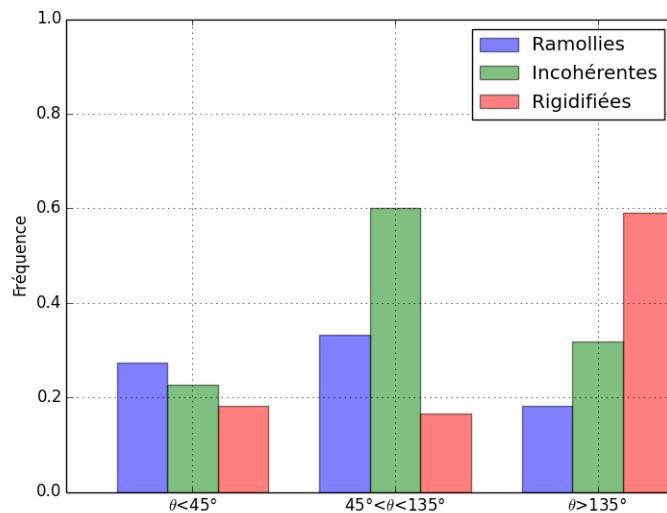


FIGURE 6.10 – Répartition des comportements cellulaires en fonction de l'angle formé entre l'axe bille-noyau et la direction de la force appliquée, pour 125 secondes de force et 4 μg de fibronectine. $p=0.044$

Chapitre 7

Localisation de MRTF-A dans les cellules musculaires en réponse à une stimulation mécanique

7.1 À propos de la localisation de MRTF-A

Comme on l'a vu dans le chapitre qui lui est consacré, la localisation de MRTF-A dans la cellule est liée à la concentration disponible en monomères d'actine : lorsqu'il y a des monomères en excès, MRTF-A est cytoplasmique car son NLS est caché, au contraire lorsqu'il n'y a plus assez de monomères disponibles le NLS est accessible et MRTF-A est dans le noyau.

Cela nous fournit un moyen simple de visualiser l'activation de MRTF-A/SRF : observer en fluorescence la localisation de MRTF-A dans la cellule.

Classification selon la localisation de MRTF-A Dans un premier temps, les cellules exprimant MRTF-A GFP, la version fluorescente du gène MRTF-A, peuvent être classées en trois groupes : celles pour lesquelles on peut distinguer le noyau en noir (la fluorescence est plus importante dans le cytoplasme), qui seront appelées Cytoplasmiques, celles pour lesquelles on peut distinguer le noyau en vert, appelées Nucléaires, et celles pour lesquelles le noyau ne peut être distingué, appelées Homogènes, comme on peut le voir sur les exemples en figure 7.1.

Définition des événements de changement d'état Il peut arriver que les cellules classées comme il est décrit dans le paragraphe précédent changent de groupe au cours du temps. Lorsqu'une cellule est suivie au cours du temps, on peut alors avoir des cellules qui passent d'un état à un autre, parfois plusieurs fois. Pour chaque expérience on peut donc mesurer le nombre de cellules qui

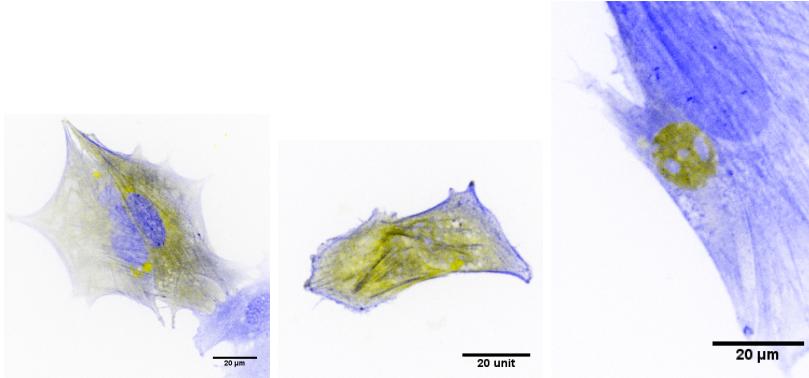


FIGURE 7.1 – Exemples de cellules classées comme MRTF-A Cytoplasmique, Homogène et Nucléaire, de gauche à droite respectivement. En bleu, la phalloïdine marquant les filaments d'actine, en jaune la MRTF-A GFP.

changent au moins une fois d'état, quantifier le nombre de changements ayant eu lieu (nombre strictement supérieur au précédent) et les classer en fonction de leur état de départ et d'arrivée. Trois changements sont catégorisés comme « entrants » : C → H, C → N et H → N. Les trois autres sont catégorisés comme « sortants » : H → C, N → H et N → C.

Quantification Dans un second temps, l'intensité de fluorescence dans le cytoplasme, dans le noyau et dans une zone péri-nucléaire a été mesurée quantitativement. Cette méthode est plus précise mais allonge considérablement le dépouillement. Lorsque les images sont prises avec l'objectif 20X, nous ne prenons qu'un seul plan focal, mais il intègre le signal sur une certaine épaisseur de la cellule. Une zone épaisse, comme le noyau et la zone immédiatement autour, apparaîtra plus lumineuse en fluorescence qu'une zone fine comme un lamelliopode, alors que la concentration en protéines est identique. Pour comparer la concentration nucléaire à la concentration cytoplasmique, on remplace alors la mesure sur l'ensemble du cytoplasme par une mesure sur une zone autour du noyau qui a une épaisseur proche de celle du noyau. On peut également comparer la totalité du signal dans le noyau à sa totalité dans le cytoplasme, car le rapport taille du noyau sur taille de la cellule est relativement bien conservé d'une cellule à l'autre.

7.1.1 Influence des moyens d'observation sur l'équilibre entre MRTF-A et l'actine G

Les C2C12 ont été transfectées avec un plasmide contenant une copie du gène MRTF-A humain adjoint d'une séquence eGFP. Cela nous permet en microscopie d'observer quelle proportion de MRTF-A GFP se trouve dans le noyau, et quelle proportion dans le cytoplasme de la cellule. En revanche, au total,

MRTF-A est sur-exprimée dans la cellule, en proportions variables d'une cellule à l'autre. Si MRTF-A est sur-exprimée en trop grande quantité, il ne reste pas assez de G-actine dans la cellule pour la maintenir dans le cytoplasme, et elle peut alors s'accumuler dans le noyau. Nous avons donc essayé de transfacter la quantité minimale de protéine nécessaire pour mener à bien les observations.

On peut observer sur des cellules fixées et marquées avec l'anti-corps MRTF-A endogène qu'à l'état naturel, MRTF-A est toujours dans le cytoplasme de la cellule. Lorsque nous observons la MRTF-A GFP, ce n'est pas toujours le cas, et une proportion plus ou moins grande, selon la quantité de plasmide qui a pénétré les cellules, est contenue dans le noyau.

L'objectif étant d'observer également le cytosquelette d'actine, nous avons mené des expériences avec un plasmide Actine mCherry, un plasmide LifeAct RFP, des marquages DNaseI et phalloïdine sur cellules fixées, et enfin avec de la siRactine, successivement.

L'ajout d'actine mCherry augmente le réservoir d'actine monomérique de la cellule, et d'autant plus que l'actine fluorescente polymérisé un peu moins bien que l'actine sauvage, et donc participe à maintenir MRTF-A dans le cytoplasme. Cette méthode d'observation est donc loin d'être neutre pour notre système, comme on le verra plus loin.

La LifeAct est une petite protéine qui se lie aux filaments d'actine, et qui n'est pas censée interférer avec la polymérisation des filaments. Cependant, nous avons constaté une tendance à la stabilisation des filaments avec la LifeAct. De plus, sa fluorescence était trop intense et interférait de manière importante avec le signal de MRTF-A GFP.

La DNaseI et la phalloïdine nous permettent d'observer à la fois l'actine F et l'actine G dans la cellule, mais ne peuvent être utilisées que sur des échantillons fixés, ce qui limite fortement l'observation de la dynamique de réorganisation du cytosquelette.

Enfin, la siRactine est une molécule nouvelle dérivée de l'association du jasplakinolide et d'une rhodamine, qui peut être utilisée en faibles concentrations *in vivo* pour observer les filaments d'actine.

7.2 Application d'une force locale avec les pinces magnétiques

Pour réaliser des expériences sur les cellules transfectées MRTF-A GFP, il a fallu monter les pinces magnétiques sous le microscope confocal. L'observation se faisait avec un objectif 40X à air, dans la géométrie à courte distance, ce qui nous permet d'appliquer localement de grandes forces (plusieurs centaines de pN) mais nous empêche d'observer suffisamment bien la position de la bille pour faire des mesures rhéologiques. Dans un premier temps, l'objectif était simplement de voir si l'application d'une force par les pinces magnétiques était suffisante pour déclencher une relocalisation de MRTF-A dans les cellules musculaires.

Nous avons réalisé ces expériences sur trois séries de C2C12 : transfectées

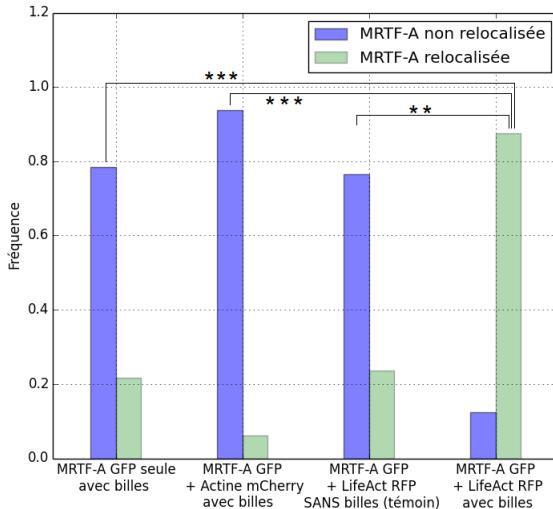


FIGURE 7.2 – Proportion des cellules observées pour lesquelles MRTF-A GFP change (en vert) ou ne change pas (en bleu) de localisation dans la cellule au cours de l’expérience. * : $p < \frac{0.05}{4}$, ** $p < \frac{0.01}{4}$, *** $p < \frac{0.001}{4}$ (réalisés avec un test de Fisher et une correction pour les comparaisons multiples)

avec MRTF-A GFP seule (37 cellules observées), transfectées avec MRTF-A GFP et une Actine mCherry (16 cellules observées), et transfectées avec MRTF-A GFP et le LifeAct RFP, qui marque les filaments d’actine dans les cellules vivantes (42 cellules observées, dont 34 témoins). L’objectif de ces doubles transfections était d’observer en même temps que la localisation de MRTF-A la réorganisation du cytosquelette.

Parmi ces expériences, certaines cellules ont été observées alors qu’elles n’avaient pas de bille attachée à leur cytosquelette : ce sont des cellules témoins, sur lesquelles le champ magnétique a été appliqué comme pour les autres, mais sur lesquelles le champ n’est pas censé avoir un effet quelconque.

On peut voir sur la figure 7.2 que l’ajout d’actine exogène réduit le nombre de cellules pour lesquelles MRTF-A change de localisation, mais de manière non significative, alors que l’ajout de Life Act RFP a l’effet inverse de manière significative. En effet, en ajoutant de l’actine mCherry, on augmente la quantité totale de G-actine dans la cellule, et ce d’autant plus que l’actine fluorescente polymérise un peu moins bien que l’actine sauvage. Comme plus de G-actine est disponible pour se lier à MRTF-A, celle-ci est d’autant plus susceptible d’être liée à l’actine et donc cytoplasmique. Si la réserve d’actine monomérique est grande, une polymérisation d’actine en réponse à la force appliquée ne sera pas forcément suffisante pour dépléter la réserve de G-actine excédentaire.

Au contraire, la LifeAct, en se liant aux filaments d’actine, peut les stabiliser

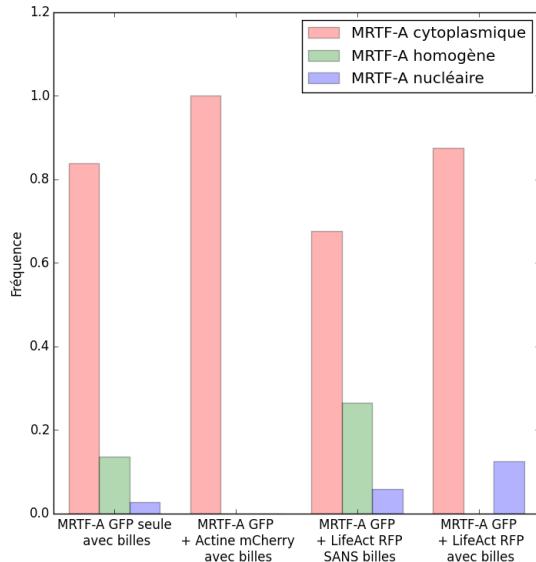


FIGURE 7.3 – Répartition de MRTF-A dans les cellules.

en conformation polymérisée. En stabilisant la F-actine, la LifeAct rend donc la cellule beaucoup plus sensible à un recrutement de G-actine pour former de nouveaux filaments, et MRTF-A est plus susceptible de se retrouver sans liaison avec l'actine, et donc nucléaire.

De plus, on peut voir en comparant avec les expériences LifeAct témoin sans bille que l'application d'une force sur la cellule a un effet significatif sur la relocalisation de MRTF-A.

On peut également remarquer que les résultats pour MRTF-A GFP seule sont identiques aux résultats avec LifeAct RFP mais sans application de force. On peut raisonnablement supposer que la force appliquée n'est pas suffisante ou n'est pas appliquée suffisamment longtemps pour réorganiser significativement le cytosquelette lors des expériences MRTF-A GFP seule, ce qui explique que leur activité soit proche des cellules témoins. La présence de Life-Act RFP stabilisant les filaments, la réserve d'actine monomérique est plus faible dans les cellules doublement transfectées MRTF-A GFP + LifeAct RFP, ce qui les rend plus sensibles : une contrainte plus faible suffit à dépléter suffisamment la réserve de G-actine.

On peut remarquer que la répartition de localisation de MRTF-A entre les différentes expériences est relativement semblable, ce qui implique que le changement d'activité observé sur la figure 7.2 n'est pas dû à l'état initial de MRTF-A dans ces cellules. Cependant, on peut noter une augmentation non significative de la quantité de cellules avec MRTF-A cytoplasmique avec l'actine mCherry,

ce qui est cohérent avec la surexpression de l'actine, et une augmentation de la quantité de MRTF-A nucléaire avec la LifeAct, ce qui est également cohérent avec l'hypothèse d'une stabilisation des filaments par la LifeAct.

7.3 Application d'une déformation globale avec l'étireur : Étude qualitative et dynamique

Les pinces magnétiques, lorsqu'il s'agit de suivre la dynamique sur une durée de l'ordre de la dizaine de minutes, ont l'inconvénient majeur de ne pouvoir opérer que sur une cellule à la fois. Il faut alors beaucoup de temps pour obtenir une population de taille acceptable avec cette méthode.

C'est pourquoi les expériences sur MRTF-A ont été poursuivies par des déformations à l'aide d'un substrat étirable. De cette manière, on peut observer en général une trentaine de cellules pendant deux heures, là où précédemment on n'aurait pu observer que 4 cellules pendant 30 minutes.

7.3.1 État de référence

Avant de comparer ce qu'il se passe pour différents taux d'éirement, il est nécessaire de mesurer quel est l'état de référence de notre système, qui sera le témoin.

L'état de référence est construit à partir de cellules qui ont été transfectées en MRTF-A GFP seulement, puis ensemencées et montées comme si elles allaient être étirées. Aucun rinçage n'a été effectué avant expérience pour éliminer l'effet du changement de milieu de culture (la section 7.3.3 aborde ce sujet en détail).

La dynamique de référence des cellules a été observée pendant deux heures de manière strictement identique à une expérience où l'éirement est non-nul, afin de pouvoir quantifier la fréquence naturelle des changements de localisation de MRTF-A durant cette durée.

On peut observer que la différence de répartition entre les deux états est la même lors des expériences fixées immédiatement après montage et après 5 minutes d'éirement sur la figure 7.4 et constater qu'il n'y aucune différence entre les deux répartitions. Cela peut indiquer qu'il n'y a aucune réponse de la part des cellules durant les 5 premières minutes, mais cela n'exclut pas une improbable réaction très rapide qui reviendrait à l'équilibre pendant ce laps de temps.

Le lecteur attentif aura remarqué que cette répartition est différente de celle présentée en figure 7.2. Cela est dû aux différences dans la préparation des cellules dans les deux expériences, car la transfection n'était pas faite dans les conditions optimales lors des expériences de pinces magnétiques. La quantité de plasmide ayant pénétré dans les cellules est plus faible, et la quantité de cellules ayant MRTF-A dans le noyau (Homogène ou Nucléaire) l'est également.

L'évolution de l'état de base au cours du temps est présentée sur la figure 7.6. On peut observer que la proportions des différents états reste relativement stable, avec une légère diminution de la quantité de MRTF-A Cytoplasmique

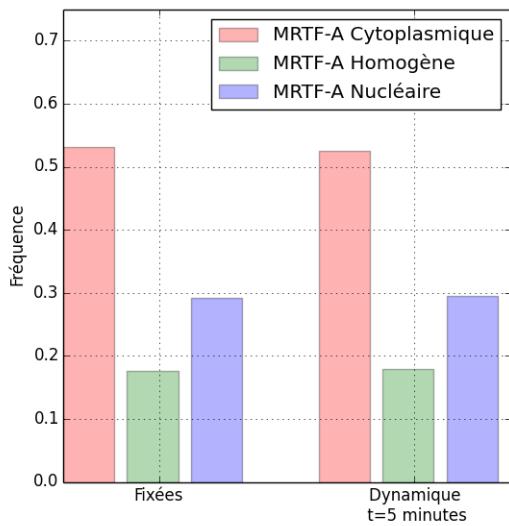


FIGURE 7.4 – Répartition entre les trois états pour des cellules fixées immédiatement après un montage sans rinçage et sans étirement ($n=7$, 963 cellules) et lors de l’observation en direct après 5 minutes d’observation sans étirement ($n=5$, 41 cellules). La différence n’est pas significative ($p=0.995$, G-test).

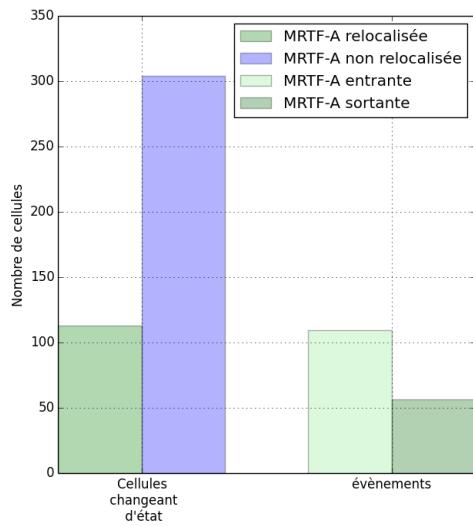


FIGURE 7.5 – Quantité de cellules changeant au moins une fois d’état et direction de ces changements

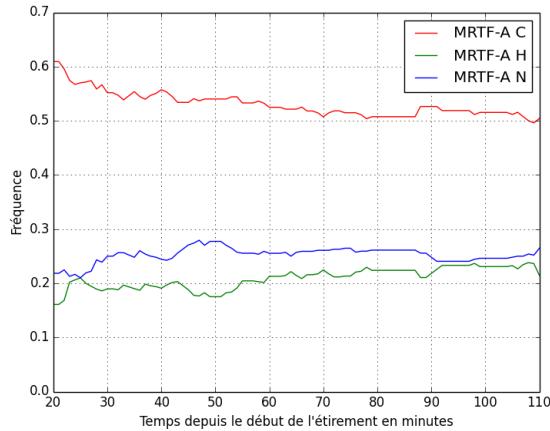


FIGURE 7.6 – Évolution de la proportion de cellules ayant MRTF-A dans chacune des trois localisations au cours du temps lors d'une expérience témoin où l'on a monté à l'avance la lamelle dans l'étireur et où l'on applique aucune contrainte.

au cours du temps. Pendant la durée totale de l'expérience, on peut observer que environ 27% des cellules ont changé d'état au moins une fois, et que dans les deux tiers des cas, ces changements se font vers des états où MRTF-A est plus nucléaire qu'avant.

7.3.2 Effet de la sur-expression d'actine mCherry

De manière similaire à ce qui était observé figure 7.2 pour les expériences de pinces magnétiques, la sur-expression d'actine causée par l'introduction d'un plasmide d'actine mCherry cause des changements importants et significatifs à la localisation de MRTF-A dans la cellule.

La quantité de cellules ayant MRTF-A dans le cytoplasme augmente, aux dépens des cellules ayant MRTF-A dans le noyau, car il y a au total plus de G-actine disponible dans la cellule pour empêcher MRTF-A d'être importé dans le noyau.

Lorsque l'on compare le nombre de cellules ayant changé d'état au moins une fois, on voit qu'il est divisé par deux lorsque l'actine mCherry est exprimée par les cellules, mais cela ne change pas la répartition des événements entre entrants ou sortants. Pourtant, on aurait pu s'attendre à ce qu'il y ait plus d'événements entrants que de sortants dans la mesure où il y a nettement plus de cellules où MRTF-A est cytoplasmique et donc ne peut faire qu'entrer.

Finalement, la sur-expression d'actine mCherry bloque la transition de MRTF-A par rapport à des cellules dans les même conditions n'exprimant pas le plasmide, ce qui est facilement expliqué par le fait qu'une plus grande réserve d'ac-

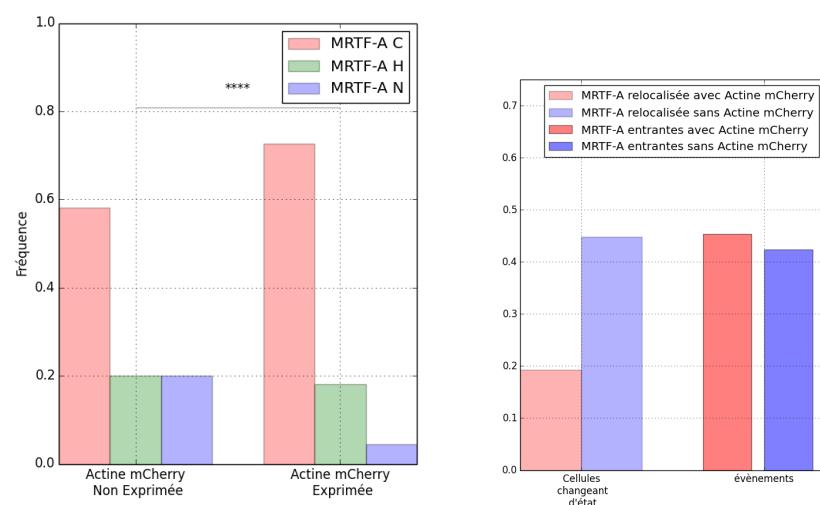


FIGURE 7.7 – Répartition initiale pour des cellules issues des même expériences exprimant ou non le plasmide Actine mCherry. **** : $p < 10^{-4}$

FIGURE 7.8 – Quantité de cellules changeant au moins une fois d'état et direction de ces changements, pour les même expériences, selon que l'Actine mCherry est exprimée ou non.

tine monomérique va séquestrer MRTF-A dans le cytoplasme de manière plus efficace.

7.3.3 Effet du rinçage et du montage préalables

En faisant des expériences témoin durant lesquelles aucun étirement n'était imposé, nous avons commencé à soupçonner qu'une ou plusieurs étapes de la préparation de l'échantillon pouvaient interférer avec les expériences. Deux étapes ont été testées : la première est l'étape durant laquelle on sort la lamelle de la plaque six trous pour la monter dans l'étireur, et qui implique des contraintes mécaniques sur la lamelle ; la seconde est l'étape de rinçage durant laquelle le milieu de culture des trous était remplacé par du milieu neuf dans l'étireur, ce qui pouvait induire une variation de la concentration en sérum.

Pour l'étape de montage, nous avons testé le montage juste avant l'expérience (Montées), et le montage la veille au soir (Prémontées). Le rinçage est toujours effectué en même temps que le montage.

On peut voir sur la figure 7.9 que lorsque les cellules sont rincées juste avant l'expérience (Montées Rincées vs Montées Non Rincées), il y a significativement moins de cellules pour lesquelles MRTF-A est majoritairement cytoplasmique. Comme son nom l'indique, Serum Response Factor est puissamment activé par le sérum, et ici le seul rinçage avec du milieu neuf suffit à activer la voie de signalisation MRTF-A/SRF et changer la localisation de MRTF-A d'une partie des cellules. On également constater que lorsque le rinçage est effectué la veille (Prémontées Rincées vs Prémontées Non Rincées), il n'y a plus aucun effet.

On peut également voir que l'étape du montage n'a pas la même influence selon qu'il y a rinçage ou non. Sans rinçage, cette étape n'a pas d'influence significative sur l'état des cellules, en revanche avec rinçage, on peut remarquer que le montage a tendance à augmenter la quantité de cellules ayant MRTF-A dans le cytoplasme au dépens de celles l'ayant réparti de manière homogène.

Une fois ces résultats mis en évidence, nous avons réalisé la suite des expériences en évitant scrupuleusement de changer le milieu de culture dans lequel baignent les cellules le jour même de l'expérience.

7.3.4 Résultats pour l'étirement 10%

Dans les mêmes conditions que pour le témoin, c'est-à-dire avec des lamelles montées la veille des expériences en conservant le même milieu de culture, et sans plasmide Actine mCherry, nous avons appliqué un étirement de 10% au temps $t=0$, puis observé les cellules toutes les 10 minutes pendant 120 minutes.

On peut observer sur la figure 7.10 que dès le début, la proportion de cellules ayant MRTF-A dans le cytoplasme est inférieure à celle du témoin, et ne fait que diminuer. Au contraire, les cellules ayant MRTF-A répartie de manière homogène sont plus nombreuses et croissent.

On peut confirmer cette tendance en observant les figures 7.11 et 7.12, sur lesquelles on voit une vague importante d'événements C → H et H → N (donc entrants) se produire lors de l'étirement 10%. Le nombre total d'événements

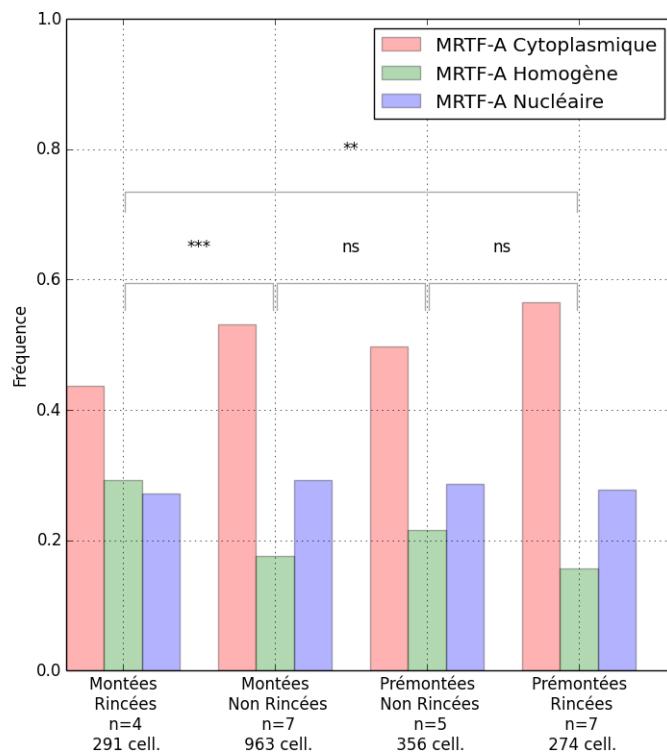


FIGURE 7.9 – Influence sur la localisation de MRTF-A des contraintes mécaniques dues au montage de la lamelle dans l'étireur (Montage) et de la variation de concentration en sérum due au remplacement du milieu de culture par du milieu neuf au moment du montage (Rinçage). Montées : montage à $t - 5$ minutes, Prémontées : montage à $t - 18$ heures, rinçage au même moment. Tous les tests ont été réalisés avec un G-test d'indépendance t et une correction de Bonferroni pour les comparaisons multiples. ** : $p < \frac{0.01}{4}$ et *** : $p < \frac{0.001}{4}$

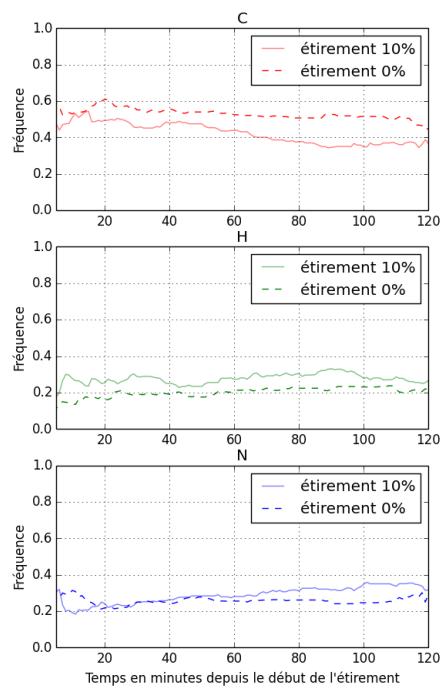


FIGURE 7.10 – Comparaison de l'évolution de la fréquence de chaque localisation de MRTF-A au cours du temps après 10% d'étirement ou dans les expériences témoins ($n=5$ et 141 cellules dans les deux cas)

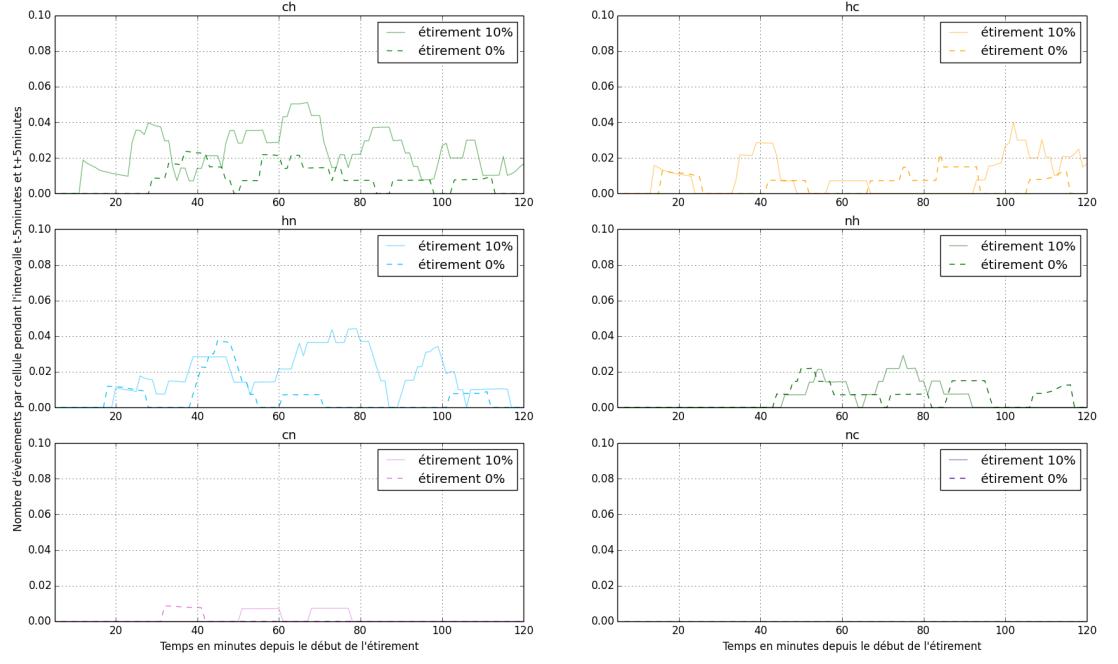


FIGURE 7.11 – Nombre d'événements ayant eu lieu pendant la fenêtre $[t-5\text{min}, t+5\text{min}]$ pour chaque type de transition possible divisé par le nombre de cellules observées.

par cellule est lui aussi bien plus important (multiplié par plus de 2) lorsque les cellules ont été étirées.

De manière générale, les résultats sont conformes à ce qui était attendu : l'application d'une contrainte mécanique sur les cellules entraîne l'accumulation de MRTF-A dans le noyau, probablement car la contrainte oblige les cellules à renforcer leur cytosquelette, et donc crée un manque de monomères d'actine.

7.3.5 Résultats pour l'étirement 30%

Initialement, on s'attendait à voir pour l'étirement le plus fort les mêmes effets que pour l'étirement 10%, mais plus importants. Ce n'est pas du tout ce qui est ressorti des expériences, qui ont montré à peu près le contraire de ce qu'on attendait.

En effet, si l'on observer l'évolution des trois populations différents par rapport au témoin, on peut voir sur la figure 7.13 que la quantité de cellules avec MRTF-A cytoplasmique augmente, et que celles où MRTF-A est homogène diminue, contrairement au témoin et à l'expérience 10%.

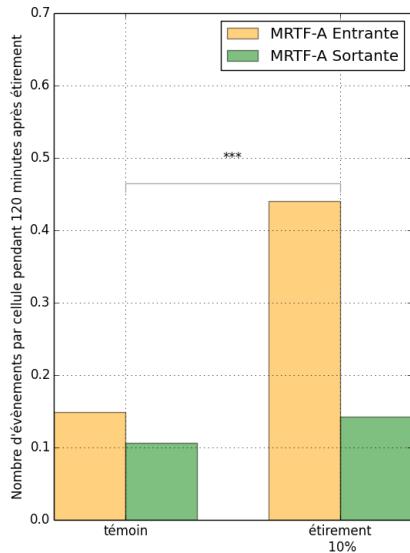


FIGURE 7.12 – Nombre d'événements entrants ou sortants par cellule observée pendant 120 minutes, pour l'étirement 10% et pour le témoin. $p=0.0003$

De plus, sur la figure 7.14, on peut constater qu'il y a dès le début de l'expérience un pic net dans le nombre d'événements sortants H → C entre 20 et 40 minutes. Un pic d'événements sortants devrait être lié à une grande quantité de G-actine libérées dans ces cellules, de manière très rapide, ce qui nous amène naturellement à poser l'hypothèse d'une destruction brutale du cytosquelette en réponse à un déformation trop forte, suivie d'une reconstruction que l'on commence à voir à partir de 80 minutes d'étirement, avec l'augmentation des transitions C → H.

Comme l'autre expérience d'étirement, une grande partie des cellules changent au moins une fois d'état pendant les deux heures d'observation, comme on peut le voir sur la figure 7.15, mais il y a nettement moins de déséquilibre entre les événements entrants et sortants ($p=0.014$, figure 7.16).

Initialement, on souhaitait regarder en parallèle l'état du cytosquelette d'actine et la localisation de MRTF-A. Malheureusement, comme on peut le voir tant en expériences de pinces magnétiques que d'étirement, les plasmides Actine mCherry et LifeAct RFP perturbent de manière trop importante le cytosquelette d'actine pour être utilisés pendant les expériences. C'est pourquoi les expériences ont été faites avec MRTF-A GFP seulement, ce qui nous prive d'informations sur l'état du cytosquelette. Afin de vérifier les hypothèses posées pour expliquer les observations aux deux étirements testés, il nous a fallu passer aux expériences fixées, qui ont l'avantage de pouvoir être marquées à la fois

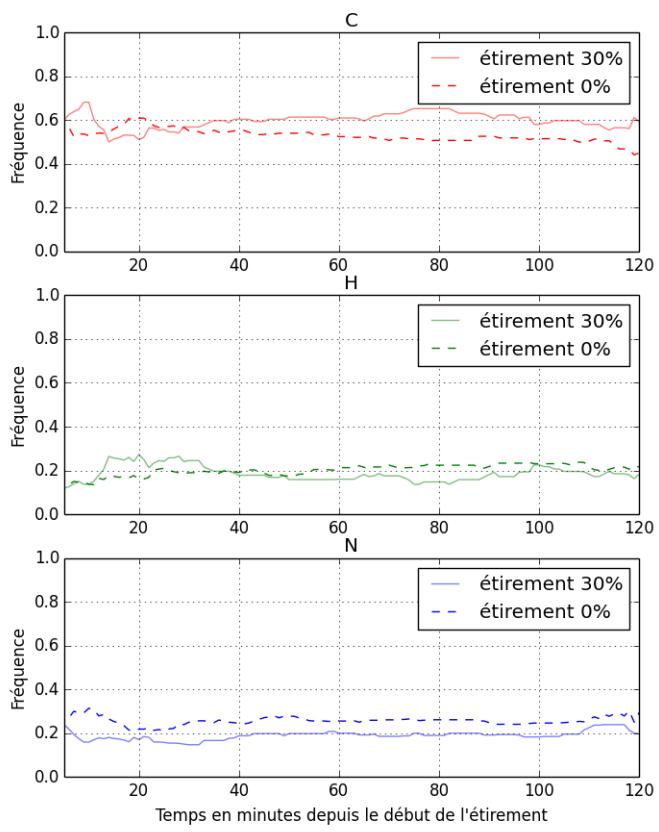


FIGURE 7.13 – Comparaison de l'évolution de la fréquence de chaque localisation de MRTF-A au cours du temps après 30% d'étirement ou dans les expériences témoin ($n=5$ et 141 cellules pour le témoin, $n=3$ et 102 cellules pour l'étirement 30%)

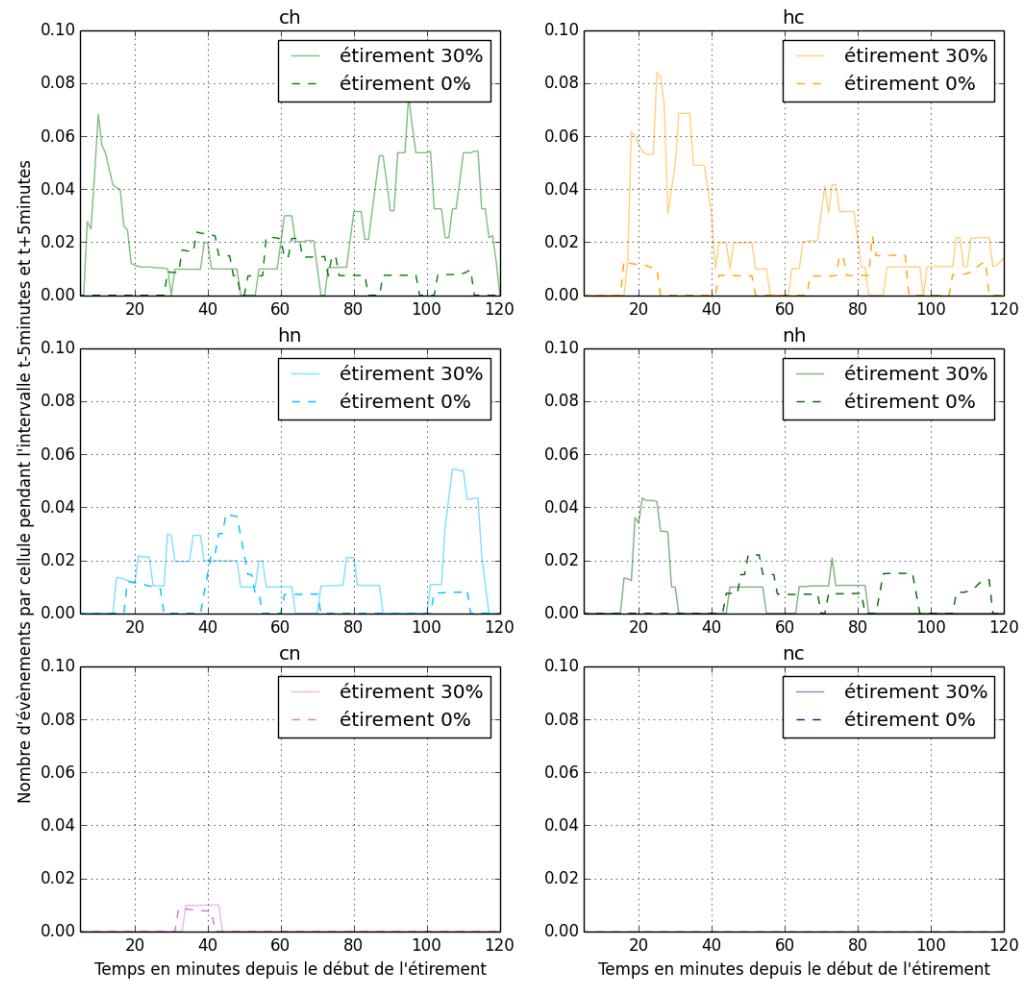


FIGURE 7.14 – Nombre d'événements ayant eu lieu pendant la fenêtre $[t-5\text{min}, t+5\text{min}]$ pour chaque type de transition possible divisé par le nombre de cellules observées.

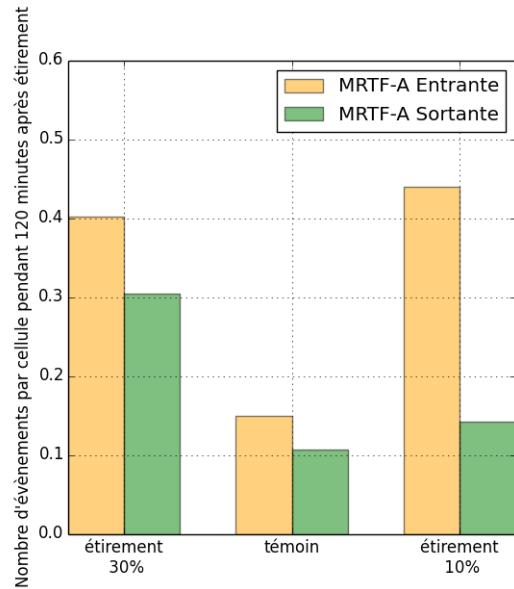


FIGURE 7.15 – Quantité de changements d'état par cellule pour les trois conditions différentes

pour l'actine F et pour l'actine G (pour laquelle il n'existe actuellement aucune sonde commerciale).

7.4 Application d'une déformation globale avec l'étireur : Étude quantitative sur cellules fixées

7.4.1 Résultats pour l'étirement 10%

7.4.2 Résultats pour l'étirement 30%

7.5 Application d'une déformation globale avec l'étireur : Étude quantitative dynamique

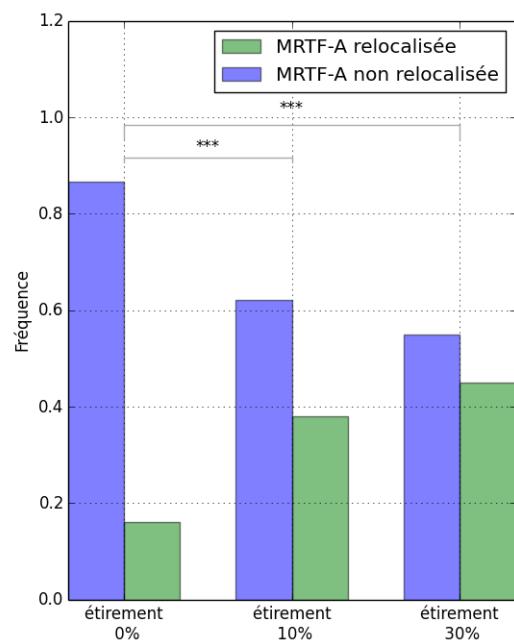


FIGURE 7.16 – Comparaison pour les deux étirements et le témoin de la quantité de cellules qui changent d'état au moins une fois

Bibliographie

- ALBINSSON, S. (2004). "Stretch of the Vascular Wall Induces Smooth Muscle Differentiation by Promoting Actin Polymerization". In : *Journal of Biological Chemistry* 279.33, p. 34849–34855. ISSN : 0021-9258, 1083-351X. DOI : [10.1074/jbc.M403370200](https://doi.org/10.1074/jbc.M403370200). URL : <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M403370200> (visité le 18/11/2013).
- ARAVIND, L. et Eugene V. KOONIN (2000). "SAP—a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization". In : *Trends in biochemical sciences* 25.3, p. 112–114. URL : [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968000499015376/pdf?md5=cedcee99ed900d2aba307d80468151a5&pid=1-s2.0-S0968000499015376-main.pdf&_valck=1](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968000499015376) (visité le 05/02/2015).
- ASPARUHOVA, M. B. et al. (2011). "The transcriptional regulator megakaryoblastic leukemia-1 mediates serum response factor-independent activation of tenascin-C transcription by mechanical stress". In : *The FASEB Journal* 25.10, p. 3477–3488. ISSN : 0892-6638, 1530-6860. DOI : [10.1096/fj.11-187310](https://doi.org/10.1096/fj.11-187310). URL : <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.11-187310> (visité le 23/01/2015).
- BAARLINK, C., H. WANG et R. GROSSE (2013). "Nuclear Actin Network Assembly by Formins Regulates the SRF Coactivator MAL". In : *Science* 340.6134, p. 864–867. ISSN : 0036-8075, 1095-9203. DOI : [10.1126/science.1235038](https://doi.org/10.1126/science.1235038). URL : <http://www.scienmag.org/cgi/doi/10.1126/science.1235038> (visité le 21/10/2013).
- BJORKHOLM, M. et al. (2013). "Development of Hodgkin lymphoma in homozygotic triplets with constitutional deletion in MKL1". In : *Blood* 121.23, p. 4807–4807. ISSN : 0006-4971, 1528-0020. DOI : [10.1182/blood-2013-02-469031](https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-469031). URL : <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2013-02-469031> (visité le 11/12/2014).
- CEN, Bo, Ahalya SELVARAJ et Ron PRYWES (2004). "Myocardin/MKL family of SRF coactivators : Key regulators of immediate early and muscle specific gene expression". In : *Journal of Cellular Biochemistry* 93.1, p. 74–82. ISSN : 0730-2312, 1097-4644. DOI : [10.1002/jcb.20199](https://doi.org/10.1002/jcb.20199). URL : <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.20199> (visité le 12/12/2014).
- CEN, B. et al. (2003). "Megakaryoblastic Leukemia 1, a Potent Transcriptional Coactivator for Serum Response Factor (SRF), Is Required for Serum Induction of SRF Target Genes". In : *Molecular and Cellular Biology* 23.18,

- p. 6597–6608. ISSN : 0270-7306. DOI : [10.1128/MCB.23.18.6597-6608.2003](https://doi.org/10.1128/MCB.23.18.6597-6608.2003). URL : <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.23.18.6597-6608.2003> (visité le 11/12/2014).
- CHAN, M. W. C. et al. (2010). “Force-induced Myofibroblast Differentiation through Collagen Receptors Is Dependent on Mammalian Diaphanous (mDia)”. In : *Journal of Biological Chemistry* 285.12, p. 9273–9281. ISSN : 0021-9258, 1083-351X. DOI : [10.1074/jbc.M109.075218](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.075218). URL : <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M109.075218> (visité le 21/10/2013).
- COLLARD, L. et al. (2014). “Nuclear actin and myocardin-related transcription factors control disuse muscle atrophy through regulation of Srf activity”. In : *Journal of Cell Science* 127.24, p. 5157–5163. ISSN : 0021-9533, 1477-9137. DOI : [10.1242/jcs.155911](https://doi.org/10.1242/jcs.155911). URL : <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.155911> (visité le 16/01/2015).
- CONNELLY, John T. et al. (2010). “Actin and serum response factor transduce physical cues from the microenvironment to regulate epidermal stem cell fate decisions”. In : *nature cell biology* 12.7, p. 711–718. URL : <http://www.nature.com/ncb/journal/vaop/ncurrent/full/ncb2074.html> (visité le 21/10/2013).
- DESCOT, A. et al. (2008). “OTT-MAL Is a Deregulated Activator of Serum Response Factor-Dependent Gene Expression”. In : *Molecular and Cellular Biology* 28.20, p. 6171–6181. ISSN : 0270-7306. DOI : [10.1128/MCB.00303-08](https://doi.org/10.1128/MCB.00303-08). URL : <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.00303-08> (visité le 21/01/2015).
- ESNAULT, C. et al. (2014). “Rho-actin signaling to the MRTF coactivators dominates the immediate transcriptional response to serum in fibroblasts”. In : *Genes & Development* 28.9, p. 943–958. ISSN : 0890-9369. DOI : [10.1101/gad.239327.114](https://doi.org/10.1101/gad.239327.114). URL : <http://genesdev.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gad.239327.114> (visité le 13/01/2015).
- FLOURIOT, Gilles et al. (2014). “The actin/MKL1 signalling pathway influences cell growth and gene expression through large-scale chromatin reorganization and histone post-translational modifications”. In : *Biochemical Journal* 461.2, p. 257–268. ISSN : 0264-6021, 1470-8728. DOI : [10.1042/BJ20131240](https://doi.org/10.1042/BJ20131240). URL : <http://www.biochemj.org/bj/461/bj4610257.htm> (visité le 05/02/2015).
- GERBER, Alan et al. (2013). “Blood-Borne Circadian Signal Stimulates Daily Oscillations in Actin Dynamics and SRF Activity”. In : *Cell* 152.3, p. 492–503. ISSN : 00928674. DOI : [10.1016/j.cell.2012.12.027](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.027). URL : <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867412015498> (visité le 21/10/2013).
- GOMEZ, Esther W. et al. (2010). “Tissue geometry patterns epithelial-mesenchymal transition via intercellular mechanotransduction”. In : *Journal of Cellular Biochemistry*, n/a–n/a. ISSN : 07302312, 10974644. DOI : [10.1002/jcb.22545](https://doi.org/10.1002/jcb.22545). URL : <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.22545> (visité le 03/03/2014).
- GUERCI, Aline et al. (2012). “Srf-Dependent Paracrine Signals Produced by Myofibers Control Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Hypertrophy”. In :

- Cell Metabolism* 15.1, p. 25–37. ISSN : 15504131. DOI : [10.1016/j.cmet.2011.12.001](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.001). URL : <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413111004591> (visité le 10/12/2014).
- GUETTLER, S. et al. (2008). “RPEL Motifs Link the Serum Response Factor Cofactor MAL but Not Myocardin to Rho Signaling via Actin Binding”. In : *Molecular and Cellular Biology* 28.2, p. 732–742. ISSN : 0270-7306. DOI : [10.1128/MCB.01623-07](https://doi.org/10.1128/MCB.01623-07). URL : <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.01623-07> (visité le 17/12/2014).
- GURBUZ, Irem et al. (2014). “SAP domain-dependent Mkl1 signaling stimulates proliferation and cell migration by induction of a distinct gene set indicative of poor prognosis in breast cancer patients”. In : *Molecular cancer* 13.1, p. 22. URL : <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1476-4598-13-22.pdf> (visité le 11/12/2014).
- HAYASHI, K. et T. MORITA (2013). “Differences in the Nuclear Export Mechanism between Myocardin and Myocardin-related Transcription Factor A”. In : *Journal of Biological Chemistry* 288.8, p. 5743–5755. ISSN : 0021-9258, 1083-351X. DOI : [10.1074/jbc.M112.408120](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.408120). URL : <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M112.408120> (visité le 30/01/2015).
- HIRANO, Hidemi et Yoshiyuki MATSUURA (2011). “Sensing actin dynamics : Structural basis for G-actin-sensitive nuclear import of MAL”. In : *Biochemical and Biophysical Research Communications* 414.2, p. 373–378. ISSN : 0006291X. DOI : [10.1016/j.bbrc.2011.09.079](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.079). URL : <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X11016834> (visité le 21/10/2013).
- HO, Chin Yee et al. (2013). “Lamin A/C and emerin regulate MKL1-SRF activity by modulating actin dynamics”. In : *Nature* 497.7450, p. 507–511. ISSN : 0028-0836, 1476-4687. DOI : [10.1038/nature12105](https://doi.org/10.1038/nature12105). URL : <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature12105> (visité le 21/01/2015).
- HUANG, Xiangwei et al. (2012). “Matrix Stiffness-Induced Myofibroblast Differentiation Is Mediated by Intrinsic Mechanotransduction”. In : *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 47.3, p. 340–348. ISSN : 1044-1549, 1535-4989. DOI : [10.1165/rcmb.2012-00500C](https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-00500C). URL : <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/rcmb.2012-00500C> (visité le 21/10/2013).
- HUNG, R.-J., C. W. PAK et J. R. TERMAN (2011). “Direct Redox Regulation of F-Actin Assembly and Disassembly by Mical”. In : *Science* 334.6063, p. 1710–1713. ISSN : 0036-8075, 1095-9203. DOI : [10.1126/science.1211956](https://doi.org/10.1126/science.1211956). URL : <http://www.scienmag.org/cgi/doi/10.1126/science.1211956> (visité le 26/05/2014).
- JAIN, Nikhil et al. (2013). “Cell geometric constraints induce modular gene-expression patterns via redistribution of HDAC3 regulated by actomyosin contractility”. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.28, p. 11349–11354. URL : <http://www.pnas.org/content/110/28/11349.short> (visité le 21/10/2013).
- KALITA, Katarzyna, Bozena KUZNIEWSKA et Leszek KACZMAREK (2012). “MKLs : Co-factors of serum response factor (SRF) in neuronal responses”. In : *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44.9, p. 1444–1447.

- ISSN : 13572725. DOI : 10.1016/j.biocel.2012.05.008. URL : <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272512001744> (visité le 21/10/2013).
- KALITA, K. et al. (2006). "Role of Megakaryoblastic Acute Leukemia-1 in ERK1/2-Dependent Stimulation of Serum Response Factor-Driven Transcription by BDNF or Increased Synaptic Activity". In : *Journal of Neuroscience* 26.39, p. 10020–10032. ISSN : 0270-6474, 1529-2401. DOI : 10.1523/JNEUROSCI.2644-06.2006. URL : <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.2644-06.2006> (visité le 02/02/2015).
- KAWAUCHI, Keiko et al. (2012). "p130Cas-dependent actin remodelling regulates myogenic differentiation". In : *Biochemical Journal* 445.3, p. 323–332. ISSN : 0264-6021, 1470-8728. DOI : 10.1042/BJ20112169. URL : <http://www.biochemj.org/bj/445/bj4450323.htm> (visité le 21/10/2013).
- KERDIVEL, Gweneg et al. (2014). "Activation of the MKL1/actin signaling pathway induces hormonal escape in estrogen-responsive breast cancer cell lines". In : *Molecular and Cellular Endocrinology* 390.1, p. 34–44. ISSN : 03037207. DOI : 10.1016/j.mce.2014.03.009. URL : <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720714001014> (visité le 11/12/2014).
- KUWAHARA, K. et al. (2010). "Myocardin-Related Transcription Factor A Is a Common Mediator of Mechanical Stress- and Neurohumoral Stimulation-Induced Cardiac Hypertrophic Signaling Leading to Activation of Brain Natriuretic Peptide Gene Expression". In : *Molecular and Cellular Biology* 30.17, p. 4134–4148. ISSN : 0270-7306. DOI : 10.1128/MCB.00154-10. URL : <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.00154-10> (visité le 21/10/2013).
- LEITNER, Laura et al. (2010). "Epithelial Protein Lost in Neoplasm a (Eplin-a) is transcriptionally regulated by G-actin and MAL/MRTF coactivators". In : URL : <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1476-4598-9-60.pdf> (visité le 09/02/2015).
- LEITNER, L. et al. (2011). "MAL/MRTF-A controls migration of non-invasive cells by upregulation of cytoskeleton-associated proteins". In : *Journal of Cell Science* 124.24, p. 4318–4331. ISSN : 0021-9533, 1477-9137. DOI : 10.1242/jcs.092791. URL : <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.092791> (visité le 10/12/2014).
- LI, Shijie et al. (2005). "Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102.4, p. 1082–1087. URL : <http://www.pnas.org/content/102/4/1082.short> (visité le 11/12/2014).
- LI, S. et al. (2006). "Requirement of a Myocardin-Related Transcription Factor for Development of Mammary Myoepithelial Cells". In : *Molecular and Cellular Biology* 26.15, p. 5797–5808. ISSN : 0270-7306. DOI : 10.1128/MCB.00211-06. URL : <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.00211-06> (visité le 17/12/2014).
- LUNDQUIST, Mark R. et al. (2014). "Redox Modification of Nuclear Actin by MICAL-2 Regulates SRF Signaling". In : *Cell* 156.3, p. 563–576. ISSN :

00928674. DOI : [10.1016/j.cell.2013.12.035](https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.035). URL : <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867413016048> (visité le 22/05/2014).
- LUO, Xue-Gang et al. (2014). "Histone methyltransferase SMYD3 promotes MRTF-A-mediated transactivation of MYL9 and migration of MCF-7 breast cancer cells". In : *Cancer Letters* 344.1, p. 129–137. ISSN : 03043835. DOI : [10.1016/j.canlet.2013.10.026](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.10.026). URL : <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383513007556> (visité le 31/10/2014).
- MAIER, Silke et al. (2008). "Tenascin-C induction by cyclic strain requires integrin-linked kinase". In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1783.6, p. 1150–1162. ISSN : 01674889. DOI : [10.1016/j.bbamcr.2008.01.013](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.013). URL : <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488908000335> (visité le 12/01/2015).
- MEDJKANE, Souhila et al. (2009). "Myocardin-related transcription factors and SRF are required for cytoskeletal dynamics and experimental metastasis". In : *Nature Cell Biology* 11.3, p. 257–268. ISSN : 1465-7392, 1476-4679. DOI : [10.1038/ncb1833](https://doi.org/10.1038/ncb1833). URL : <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncb1833> (visité le 09/02/2015).
- MERCHER, Thomas, Maryvonne BUSSON-LE CONIAT et al. (2001). "Involvement of a human gene related to the Drosophila spen gene in the recurrent t (1 ; 22) translocation of acute megakaryocytic leukemia". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98.10, p. 5776–5779. URL : <http://www.pnas.org/content/98/10/5776.short> (visité le 12/12/2014).
- MERCHER, Thomas, Glen D. RAFFEL et al. (2009). "The OTT-MAL fusion oncogene activates RBPJ-mediated transcription and induces acute megakaryoblastic leukemia in a knockin mouse model". In : *Journal of Clinical Investigation*. ISSN : 0021-9738. DOI : [10.1172/JCI35901](https://doi.org/10.1172/JCI35901). URL : <http://www.jci.org/articles/view/35901> (visité le 21/01/2015).
- MIRALLES, Francesc et al. (2003). "Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL". In : *Cell* 113.3, p. 329–342. URL : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867403002782> (visité le 21/10/2013).
- MORITA, Tsuyoshi et Ken'ichiro HAYASHI (2013). "G-actin sequestering protein thymosin- β 4 regulates the activity of myocardin-related transcription factor". In : *Biochemical and Biophysical Research Communications* 437.3, p. 331–335. ISSN : 0006291X. DOI : [10.1016/j.bbrc.2013.06.069](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.06.069). URL : <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X1301067X> (visité le 23/05/2014).
- MOUILLERON, Stephane et al. (2008). "Molecular basis for G-actin binding to RPEL motifs from the serum response factor coactivator MAL". In : *The EMBO journal* 27.23, p. 3198–3208. URL : <http://www.nature.com/emboj/journal/vaop/ncurrent/full/emboj2008235a.html> (visité le 21/10/2013).
- OTTERBEIN, L. R. (2001). "The Crystal Structure of Uncomplexed Actin in the ADP State". In : *Science* 293.5530, p. 708–711. ISSN : 0036-8075, 1095-9203. DOI : [10.1126/science.1059700](https://doi.org/10.1126/science.1059700). URL : <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1059700> (visité le 26/05/2014).

- POSERN, Guido, Francesc MIRALLES et al. (2004). "Mutant actins that stabilise F-actin use distinct mechanisms to activate the SRF coactivator MAL". In : *The EMBO journal* 23.20, p. 3973–3983. URL : <http://www.nature.com/emboj/journal/v23/n20/abs/7600404a.html> (visité le 21/10/2013).
- POSERN, Guido, Athanassia SOTIROPOULOS et Richard TREISMAN (2002). "Mutant actins demonstrate a role for unpolymerized actin in control of transcription by serum response factor". In : *Molecular biology of the cell* 13.12, p. 4167–4178. URL : <http://www.molbiolcell.org/content/13/12/4167.short> (visité le 02/02/2015).
- POSERN, Guido et Richard TREISMAN (2006). "Actin' together : serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction". In : *Trends in Cell Biology* 16.11, p. 588–596. ISSN : 09628924. DOI : [10.1016/j.tcb.2006.09.008](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.09.008). URL : <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0962892406002698> (visité le 21/10/2013).
- RAJAKYLÄ, Eeva Kaisa, Maria K. VARTIAINEN et Richard TREISMAN (2010). "An actin-regulated importin α/β -dependent extended bipartite NLS directs nuclear import of MRTF-A". In : *The EMBO journal* 29.20, p. 3448–3458. URL : <http://www.nature.com/emboj/journal/v29/n20/abs/emboj2010216a.html> (visité le 21/10/2013).
- RAJAKYLÄ, Eeva Kaisa, Tiina VIITA et al. (2015). "RNA export factor Ddx19 is required for nuclear import of the SRF coactivator MKL1". In : *Nature Communications* 6, p. 5978. ISSN : 2041-1723. DOI : [10.1038/ncomms6978](https://doi.org/10.1038/ncomms6978). URL : <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncomms6978> (visité le 30/01/2015).
- SASAZUKI, T. (2002). "Identification of a Novel Transcriptional Activator, BSAC, by a Functional Cloning to Inhibit Tumor Necrosis Factor-induced Cell Death". In : *Journal of Biological Chemistry* 277.32, p. 28853–28860. ISSN : 00219258, 1083351X. DOI : [10.1074/jbc.M203190200](https://doi.org/10.1074/jbc.M203190200). URL : <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M203190200> (visité le 30/01/2015).
- SCHARENBERG, M. A. et al. (2014). "TGF- β -induced differentiation into myofibroblasts involves specific regulation of two MKL1 isoforms". In : *Journal of Cell Science* 127.5, p. 1079–1091. ISSN : 0021-9533, 1477-9137. DOI : [10.1242/jcs.142075](https://doi.org/10.1242/jcs.142075). URL : <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.142075> (visité le 31/10/2014).
- SCHMIDT, L. J. et al. (2012). "RhoA as a Mediator of Clinically Relevant Androgen Action in Prostate Cancer Cells". In : *Molecular Endocrinology* 26.5, p. 716–735. ISSN : 0888-8809. DOI : [10.1210/me.2011-1130](https://doi.org/10.1210/me.2011-1130). URL : <http://mend.endojournals.org/cgi/doi/10.1210/me.2011-1130> (visité le 21/10/2013).
- SELVARAJ, A. et R. PRYWES (2003). "Megakaryoblastic Leukemia-1/2, a Transcriptional Co-activator of Serum Response Factor, Is Required for Skeletal Myogenic Differentiation". In : *Journal of Biological Chemistry* 278.43, p. 41977–41987. ISSN : 0021-9258, 1083-351X. DOI : [10.1074/jbc.M305679200](https://doi.org/10.1074/jbc.M305679200). URL : <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M305679200> (visité le 12/12/2014).

- SMITH, Elenoe C. et al. (2013). "Induction of megakaryocyte differentiation drives nuclear accumulation and transcriptional function of MKL1 via actin polymerization and RhoA activation". In : *Blood* 121.7, p. 1094–1101. URL : <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/121/7/1094.short> (visité le 11/12/2014).
- SOTIROPOULOS, Athanassia et al. (1999). "Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics". In : *Cell* 98.2, p. 159–169. URL : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400810119> (visité le 10/12/2014).
- SUN, Y. et al. (2006). "Acute Myeloid Leukemia-Associated Mkl1 (Mrtf-a) Is a Key Regulator of Mammary Gland Function". In : *Molecular and Cellular Biology* 26.15, p. 5809–5826. ISSN : 0270-7306. DOI : [10.1128/MCB.00024-06](https://doi.org/10.1128/MCB.00024-06). URL : <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.00024-06> (visité le 17/12/2014).
- TREISMAN, Richard et al. (2011). "Structure of a Pentavalent G-Actin* MRTF-A Complex Reveals How G-Actin". In : URL : http://www.researchgate.net/profile/Stephane_Mouilleron2/publication/51219331_Structure_of_a_pentavalent_G-actin*MRTF-A_complex_reveals_how_G-actin_controls_nucleocytoplasmic_shuttling_of_a_transcriptional_coactivator/links/0912f5065bb6d82872000000.pdf (visité le 02/02/2015).
- VARTIAINEN, M. K. et al. (2007). "Nuclear Actin Regulates Dynamic Subcellular Localization and Activity of the SRF Cofactor MAL". In : *Science* 316.5832, p. 1749–1752. ISSN : 0036-8075, 1095-9203. DOI : [10.1126/science.1141084](https://doi.org/10.1126/science.1141084). URL : <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1141084> (visité le 21/10/2013).
- WANG, D. et al. (2012). "Bone Morphogenetic Protein Signaling in Vascular Disease : ANTI-INFLAMMATORY ACTION THROUGH MYOCARDIN-RELATED TRANSCRIPTION FACTOR A". In : *Journal of Biological Chemistry* 287.33, p. 28067–28077. ISSN : 0021-9258, 1083-351X. DOI : [10.1074/jbc.M112.379487](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.379487). URL : <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M112.379487> (visité le 11/12/2014).
- WANG, Da-Zhi et al. (2002). "Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99.23, p. 14855–14860. URL : <http://www.pnas.org/content/99/23/14855.short> (visité le 11/12/2014).
- ZHAO, X.-H. et al. (2007). "Force activates smooth muscle -actin promoter activity through the Rho signaling pathway". In : *Journal of Cell Science* 120.10, p. 1801–1809. ISSN : 0021-9533, 1477-9137. DOI : [10.1242/jcs.001586](https://doi.org/10.1242/jcs.001586). URL : <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.001586> (visité le 21/10/2013).