

Chapitre 1

Méthodes et dispositifs expérimentaux

1.1 Culture cellulaire

1.1.1 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 conservent leur capacité à se différencier en myotubes lorsqu'elles atteignent la confluence et 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). Elles sont conservées dans des flasques de plastiques 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.

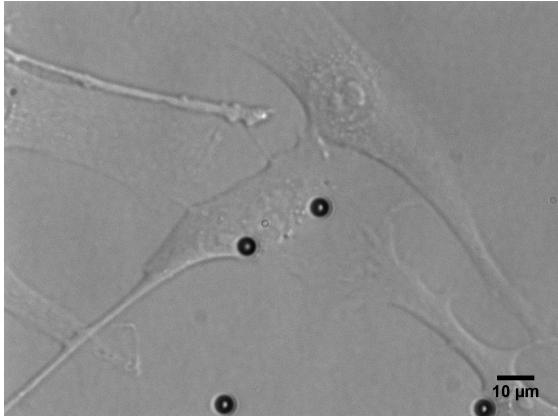


FIGURE 1.1 – C2C12 en culture sur du verre, avec des billes de 4,5 microns de diamètre, observées au microscope à immersion 100X.

1.1.2 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 les puits d'une plaque 6 trous, et mis à incuber 30 minutes à 37°C dans 1ml de milieu complet et 5 μl de fibronectine qui va s'adsorber sur la surface.

Après rinçage, les cellules sont ensemencées sur les lamelles dans du milieu complet.

1.1.3 Transfections

Afin de visualiser les protéines qui nous intéressent, on ajoute aux cellules des fragments d'ADN appelés plasmides qui contiennent une version fluorescente de nos protéines d'intérêt. Ces plasmides sont intégrées aux cellules grâce à des protéines spécifiques comme la nanofectine 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 fluorescente 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 va-

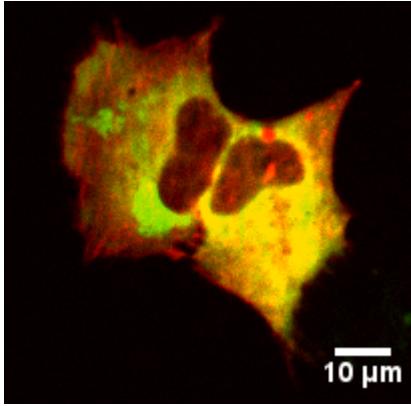


FIGURE 1.2 – C2C12 transfectées avec un plasmide MRTF-A GFP (en vert) et un plasmide Actine Mccherry (en rouge)

riable 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 boîte de culture 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 McCherry (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 μ g de nanofectine
- 1 μ g d'ADN de MRTF-A GFP

- (option 1 : Actine Mcherry) 1 μ g d'ADN d'Actine Mcherry
- (option 1 : Actine Mcherry) 1 μ g de nanofectine
- (option 2 : LifeAct RFP) 0,75 μ g d'ADN de LifeAct RFP
- (option 2 : LifeAct RFP) 0,75 μ g de nanofectine
- 2*50 μ l de NaCl 1mM
- (option 1 ou 2) 2*50 μ l de NaCl 1mM
- 0,9ml de milieu complet (transfection simple uniquement)
- (option 1 ou 2) 0,8 μ l de milieu complet

Protocole :

1. Diluez dans un eppendorf 1 μ g de MRTF-A GFP dans 50 μ l de solution de NaCl 1mM.
2. Diluez de même 1 μ g de nanofectine
3. (option 1 ou 2) répétez ces deux étapes avec l'Actine Mcherry ou la LifeAct
4. Transvasez le contenu de l'eppendorf de nanofectine dans l'eppendorf d'ADN (l'ordre est important)
5. (option 1 ou 2) Répétez l'opération pour les deux autres tubes
6. Laissez incuber 30 minutes à 37 °C
7. Transvasez le ou les mélange(s) nanofectine + ADN dans du milieu complet de façon à obtenir 1 ml de solution
8. Rincez les cellules
9. Ajoutez le mélange nanofectine + ADN + milieu complet sur les cellules
10. Laissez incuber à 37 °C pendant au moins 6 heures
11. Enlevez le mélange, rincez et remplacez avec du milieu complet
12. Laissez les cellules exprimer le plasmide entre 12 et 24h après rinçage

1.1.4 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.

1.1.5 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.

1.1.6 Marquages sur cellules fixées

Les protéines 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 plus efficacement 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 fixer 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 Alexa 647 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,

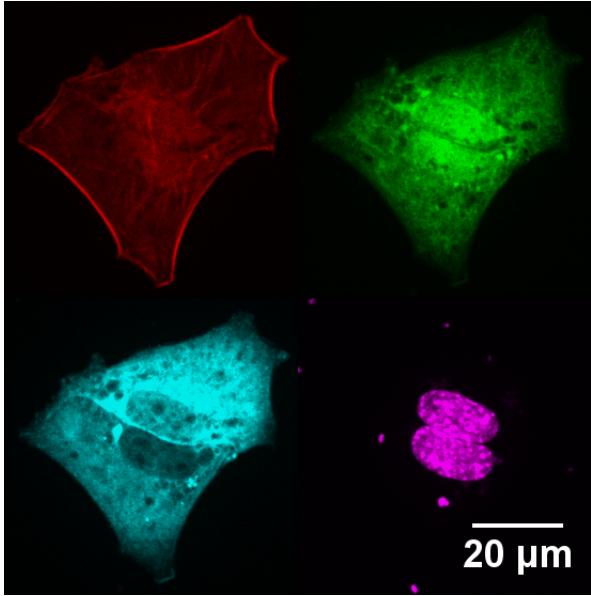


FIGURE 1.3 – C2C12 transfectées MRTF-A GFP, fixées et marquées phalloïdine Alexa647, DNaseI Alexa547 et DAPI

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.

DAPI

Le DAPI peut aussi bien être utilisé sur les cellules fixées. On ajoute 1 μ l de DAPI dans 1ml de PBS pendant 30 minutes à température ambiante. La lamelle est alors rincée avant observation.

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
- 1 µl de DNase I
- 4 µl d'anticorps MRTF-A H140
- 2 µl d'anticorps anti-rabbit Alexa 488
- 1 µl de DAPI

Protocole pour une lamelle :

1. Mélangez 40 µg de BSA, 50 µl de HS et 5 µl de Triton dans 905 µl de PBS.
Le mélange constitue la solution de saturation.
2. Enlevez le PBS de la lamelle fixée
3. Ajoutez la solution de saturation sur la lamelle, et laissez incuber 3h à température ambiante
4. Ajoutez 4 µl d'anti-MRTF-A H140 à 996 µl de PBS
5. Enlevez la solution de saturation de la lamelle
6. Ajoutez l'anti-MRTF-A diluée et laissez incuber 30 minutes à température ambiante
7. Enlevez l'anticorps et rincez deux fois au PBS
8. Ajoutez 2 µl d'anti-rabbit Alexa 488 dans 998 µl de PBS
9. 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.
10. Ajoutez l'anti-rabbit diluée sur la lamelle et laissez incuber 30 minutes à température ambiante
11. Enlevez l'anticorps et rincez 2 fois au PBS
12. Ajoutez 1 µl de DAPI à 999 µl de PBS
13. Ajoutez le DAPI dilué sur la lamelle et laissez incuber 30 minutes à température ambiante
14. Enlevez le DAPI et rincez 2 fois à température ambiante
15. Ajoutez 4 µl de phalloïdine et 1 µl de DNase I à 995 µl de PBS
16. Ajoutez le mélange phalloïdine et Dnase diluées à la lamelle et laissez incuber toute la nuit.

1.2 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'ancrer 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 car les protéines des complexes d'adhésions sont stimulées à la liaison fibronectine - intégrine. 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 :

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

Deux modèles nous permettent d'obtenir la contrainte subie par la cellule σ_0 à partir de la force exercée par l'électro-aimant sur la bille F_0 et la déformation de la cellule $\epsilon(t)$ en fonction du 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. 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.

1.2.1 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

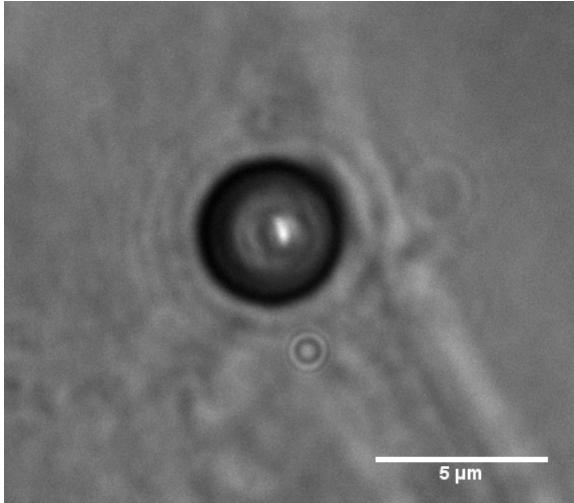


FIGURE 1.4 – Bille Dynabeads M-450 observée en grossissement 150X.

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 un bruit mécanique trop important. L'électro-aimant doit pouvoir 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 longs et répétés.

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, les billes sont détectées par le logiciel de traitement d'images, qui ajuste une ellipse sur la forme de la bille. Nous obtenons donc 385885 mesures

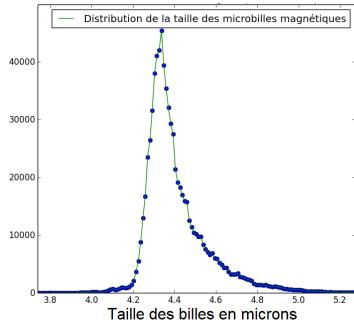


FIGURE 1.5 – Fonction de distribution de taille des billes magnétiques utilisées dans 191 expériences de pinces. Pour chaque expérience, lorsque la bille est suivie par le logiciel d’analyse d’image, son grand axe et son petit axe sont mesurés pour chaque temps. La fonction est asymétrique car lorsque la bille n’est pas tout à fait au point, son diamètre apparaît plus grand.

de taille pour 191 billes, 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.

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 visible en figure 1.6. Étant en fer doux, le barreau est très malléable, il faut donc le manipuler avec précautions : le moindre choc aplatis 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

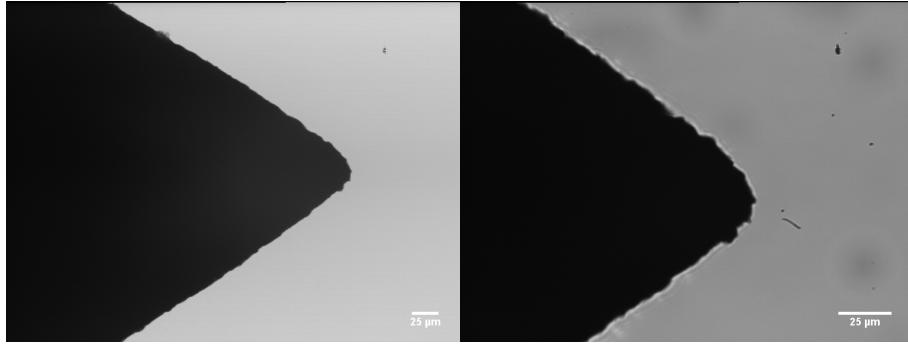
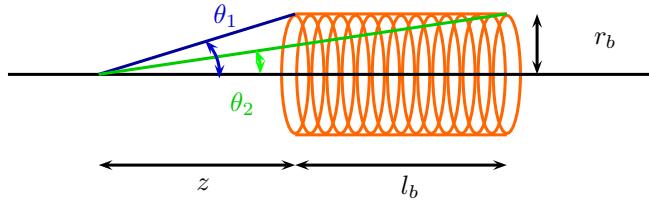


FIGURE 1.6 – À gauche une image de la pointe en fer doux au grossissement X20. À droite, la même pointe au X40. Le rayon de courbure mesuré est de l'ordre de $20\mu\text{m}$.



d'approcher la pointe de la lamelle sur laquelle seront les cellules avec un angle de 45° , comme représenté sur la figure ?? .

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 $700\mu\text{m}$.

La puissance dissipée par effet Joule

$$P = RI^2$$

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.

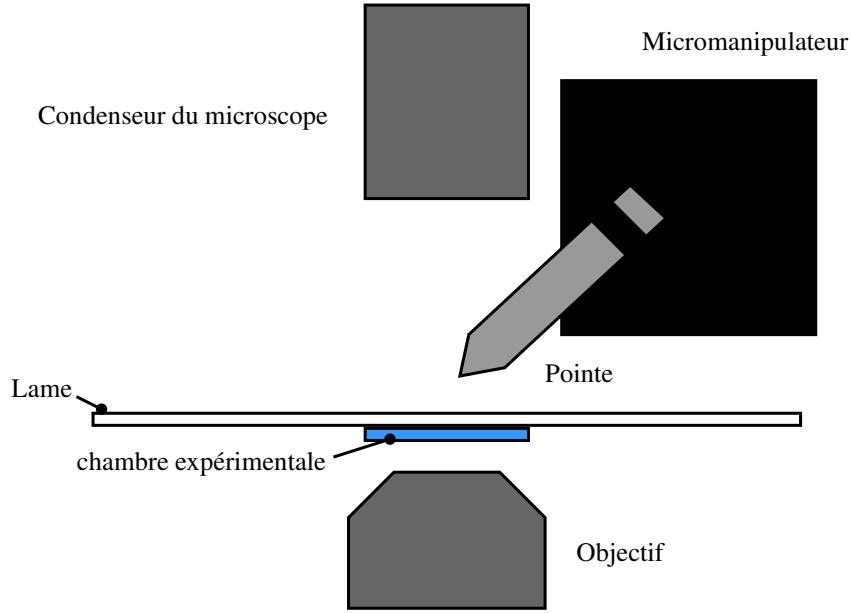
En ce qui concerne la longueur de la bobine, l_b , on aimerait la minimiser pour diminuer R , cependant, le champ B est maximal pour une bobine de longueur infinie. La longueur optimale correspond en fait à celle du cœur : ajouter de la longueur de bobine au-delà n'augmente que peu le champ, à cause 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 3,3Ω et son inductance à 1,2mH.

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,

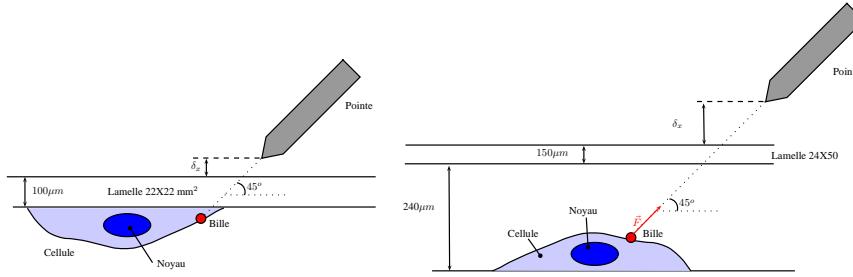


FIGURE 1.7 – Schéma des deux montages possibles de la lamelle par rapport à l’objectif et à la pince magnétique.

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, 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.

1.2.2 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 $\vec{\nabla}B$ est mauvaise. Il est donc impossible de calculer de manière fiable la force exercée par la pointe 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 :

$$F_{mag} = 3\pi \left(\eta_{24^\circ C} - a \left(\frac{T_{fin} - T_{init}}{2} - 24 \right) \right) * \left(\frac{d_{max} + d_{min}}{2} \right) * \left(1 + \frac{d}{h} \right) * \vec{U} \quad (1.1)$$

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 cisaillant 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 $240\mu\text{m}$ 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 $(x_p, y_p)_{20X}$.

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 1.1, 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.

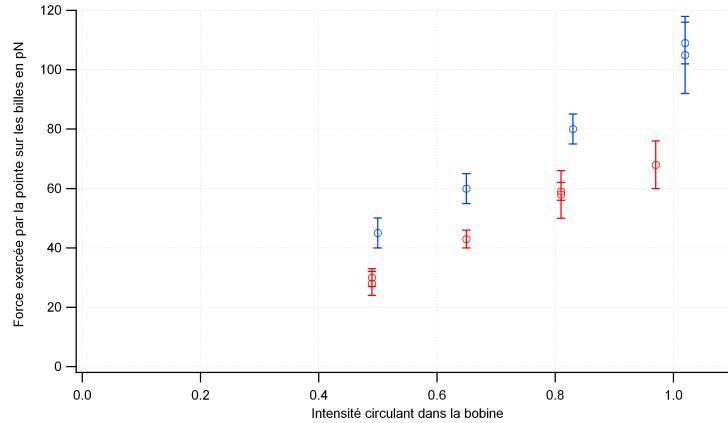


FIGURE 1.8 – Courbe de calibration des forces exercées à $700\mu\text{m}$ de la pointe pour l'ancienne (en rouge) et la nouvelle bobine (en bleu, utilisée pour les expériences).

1.2.3 Protocole de renforcement

Préparation des cellules et des billes

Les cellules sont ensemencées sur une lamelle de verre recouverte de fibronectine comme indiqué en 1.1.2 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
- $50\ \mu\text{l}$ de solution intermédiaire
- $950\ \mu\text{l}$ de DMEM 1% BSA
- du milieu complet
- une lamelle de verre $22\text{mm} \times 64\text{mm} \times 0.15\text{mm}$
- un séparateur de $240\mu\text{m}$ d'épaisseur
- $15\ \mu\text{l}$ d'HEPES

Protocole :

1. Suspendre $50\ \mu\text{l}$ de solution mère dans $450\ \mu\text{l}$ d'eau micro-filtrée.

2. Placer l'aimant sous l'eppendorf pour attirer les billes, et prélever 450 μ l de surnageant.
3. Suspendre à nouveau dans 450 μ l d'eau.
4. Répéter deux fois les deux étapes précédentes, mais la dernière fois, ajouter 450 μ l 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 μ l de fibronectine 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 μ l de suspension et les suspendre dans 950 μ l de DMEM 1% BSA.
10. Ajouter 75 μ l 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 μ l 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 μ 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 μ 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

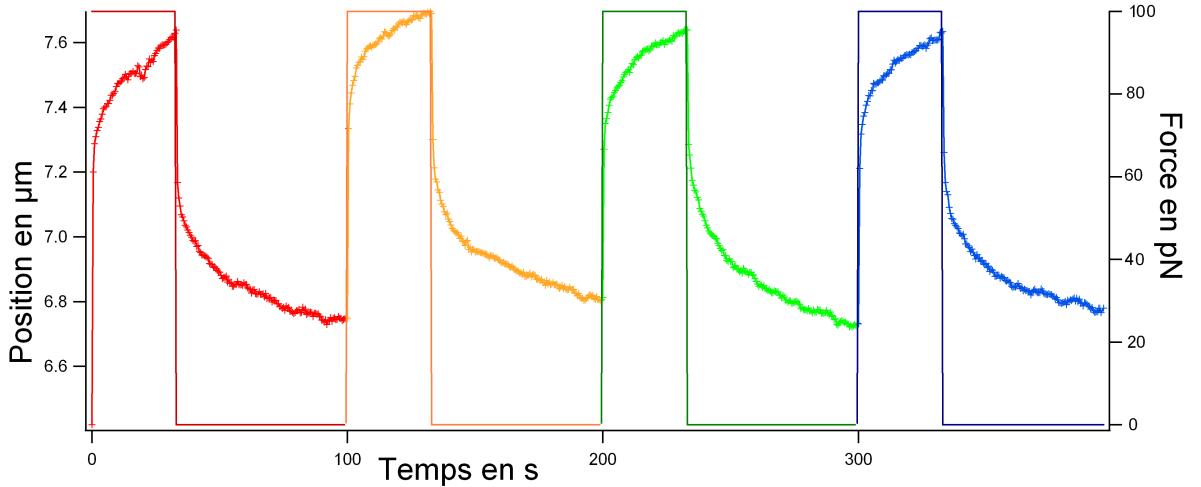


FIGURE 1.9 – Déplacement au cours du temps d'une bille adhérant sur une C2C12 et soumise à 4 créneaux de force de 100pN pendant 33s toutes les 100s.

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.

1.2.4 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.

1.2.5 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, nous cherchons à connaître la relation entre la déformation de la cellule et la contrainte qui lui est appliquée.

Nous avons donc besoin d'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.

Le modèle que nous avons utilisé a été développé par Delphine Icard lorsqu'elle a créé et utilisé les pinces optiques du laboratoire. Il 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 :

$$J(t) = 2\pi a \frac{2}{3} \left(\frac{1}{\left(\frac{3}{2} \sin \theta + \frac{\cos \theta}{\sin^3 \theta} \right)} \right) \frac{\delta R(t)}{F_0} \quad (1.2)$$

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.

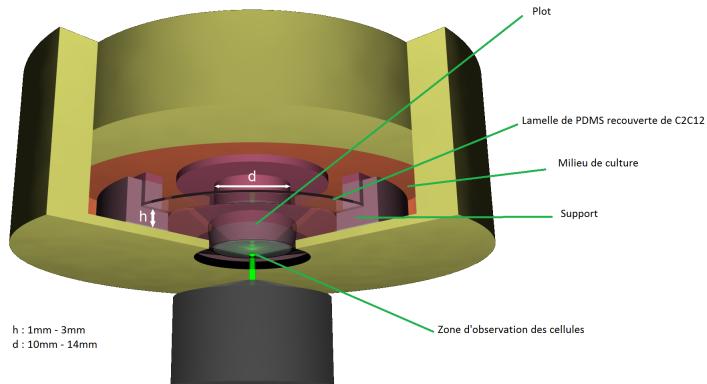


FIGURE 1.10 – Modélisation de l'étireur vu de dessous pendant l'étirement.

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.

Pour tenir compte de ces constats expérimentaux, il serait probablement nécessaire de revoir les hypothèses d'un milieu isotrope semi-infini, et de le remplacer par un milieu non-isotrope de rigidité infinie selon l'axe vertical. Cependant les calculs théoriques ou numériques pour les milieux non-isotropes sont bien plus complexes, et nécessiteraient un travail analytique qui sort complètement du cadre de cette thèse.

De manière plus générale, ce qui nous intéresse particulièrement dans ces mesures est de comparer pendant plusieurs applications de forces successives l'évolution de la fonction de fluage d'une même cellule. Des biais, dus au modèle, sur la valeur absolue de la fonction de fluage ne nous empêchent pas de comparer ces valeurs les unes aux autres et d'en observer l'évolution au cours du temps.

1.3 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.

1.3.1 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 plastique, le plot étant transparent pour laisser passer la lumière du condenseur. L'étireur a 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 teflon 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.

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 diamètres de plots cylindriques : 10mm et 15mm, qui permettent également de régler l'étirement subit par le PDMS.

1.3.2 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.

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.

Ingrediénts :

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

Protocole

1. Préparez une solution de Pluronics 0,2% en masse
2. Laissez incuber 1 ml de la solution de Pluronics pendant une heure à température ambiante
3. Rincez au PBS, puis à l'eau, laissez sécher
4. Exposez la lamelle derrière le masque aux UVC pendant 7 minutes
5. Diluez 4 μ g de fibronectine fluorescente dans 1 ml de PBS
6. Laissez la solution de fibronectine incuber 30 minutes à 37 °C sur la lamelle, à l'abri de la lumière
7. Rincez 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.

1.3.3 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.

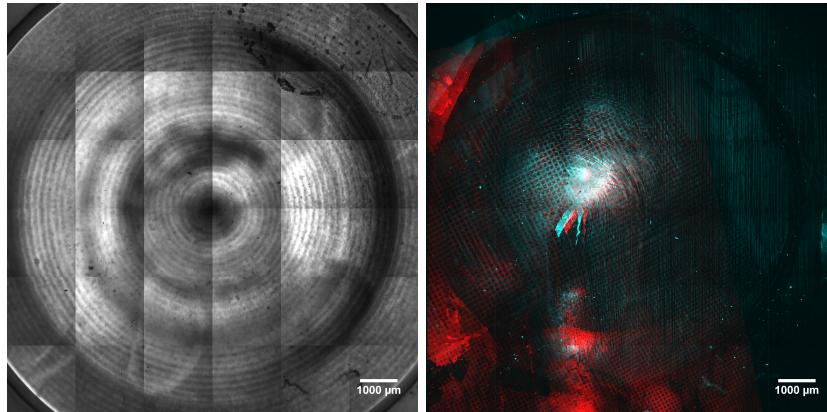


FIGURE 1.11 – À gauche : image du plot reconstituée à partir d’images prises au 4X sur le microscope confocal. À droite : images en fluorescence du quadrillage de fibronectine Cy3 avant (en rouge) et après (en bleu) un étirement 30%.

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

1.3.4 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 110 000 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.

1.3.5 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 est exprimée tellement intensément que sa fluorescence empiète sur celle de MRTF-A GFP.

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.

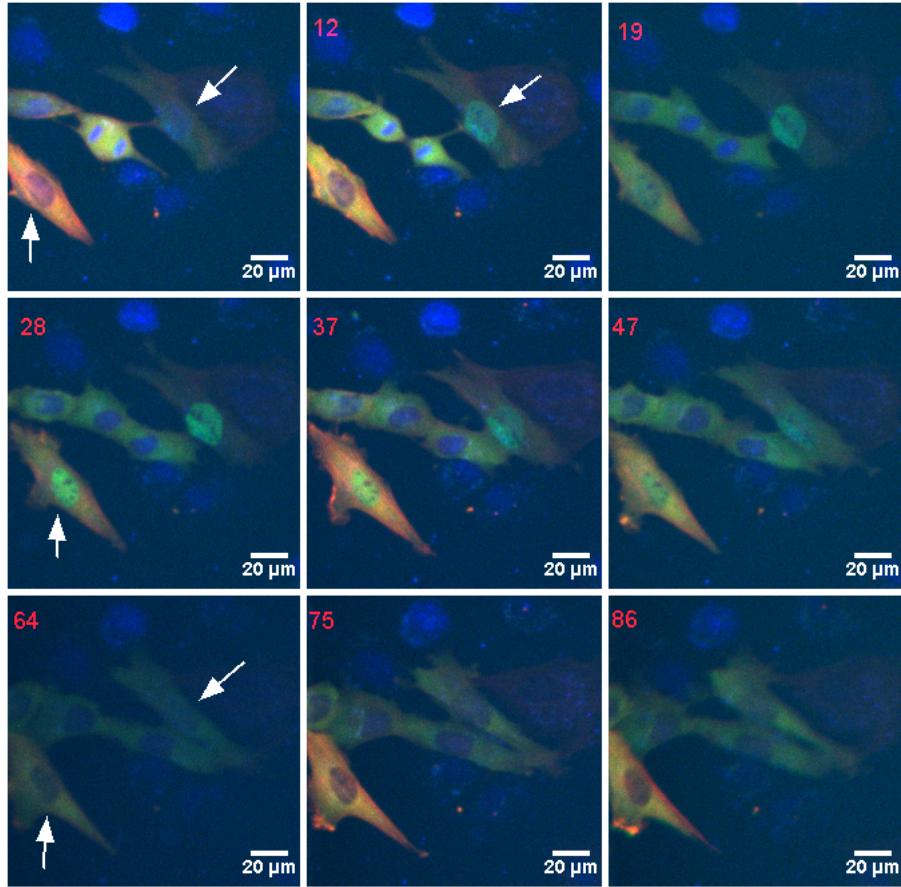


FIGURE 1.12 – C2C12 transfectées MRTF-A GFP (en vert) et Actine Mcherry (en rouge), marquées au DAPI (en bleu), étirées à 30% pendant 120 minutes. Dans les deux cellules marquées d'une flèche, MRTF-A s'accumule dans le noyau, puis retourne dans le cytoplasme.

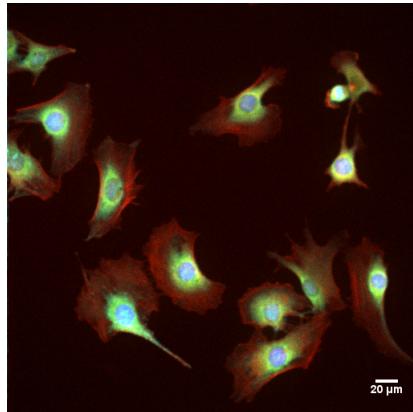


FIGURE 1.13 – C2C12 marquées par la phalloïdine (ici en rouge), par la DNase I (en vert), un anticorps anti-MRTF-A (en cyan) et le DAPI (en bleu).

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 intensités de fluorescence d'une lamelle par rapport aux autres.

1.3.6 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. 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.