

# Chapitre 1

## Rhéologie cellulaire

L'étude des propriétés mécaniques des objets biologiques (cellules, tissus, gels de biopolymères ...) a été investie par des physiciens convergeant à la fois de la mécanique des milieux continus, de la physique de la matière molle (polymères, mousses, colloïdes, verres), et de l'hydrodynamique. En effet, ils rassemblent des objets et des propriétés qui intéressent tous ces domaines, à des échelles allant de celle de la molécule à l'échelle macroscopique.

Il est aisé de voir à quelle point la mécanique peut être un aspect important du vivant : les médecins détectent les anomalies d'un tissu en testant sa rigidité « à la main » pendant une palpation, l'absence de gravité a des conséquences importantes sur les os, et l'absence d'exercice sur les muscles, tandis que les changements de propriétés mécaniques des globules rouges ou des parois des vaisseaux sanguins peuvent se révéler dramatiques.

Les matériaux vivants, comme les tendons, les os ou la cornée, ou issus du vivant comme la soie ou la nacre peuvent également posséder des propriétés rhéologiques intéressantes, que l'on cherche à dupliquer pour créer de nouveaux matériaux composites.

Les matériaux vivants combinent plusieurs particularités qui en font des objets particulièrement difficiles à étudier du point de vue physique : ils sont intrinsèquement hors de l'équilibre thermodynamique, car ils consomment de l'énergie en permanence, ils ne sont le plus souvent ni homogènes, ni isotropes, sont composés d'une grande diversité de constituants différents, leurs propriétés varient à la fois au cours du temps et d'un individu à l'autre. Tous ces éléments rendent plus complexes la reproductibilité d'une mesure à l'autre, la comparaison de mesures prises par des techniques différentes, l'élaboration de modèles théoriques et de simulations numériques.

### 1.1 Rhéologie

La rhéologie est l'étude de la manière dont les matériaux se comportent lorsqu'ils sont soumis à une contrainte ou à une déformation.

Par exemple, on appelle solide élastique un matériau pour lequel la déformation  $\epsilon$  est proportionnelle à la contrainte  $\sigma$ , et on appelle module d'Young ce coefficient de proportionnalité :

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon}$$

La déformation élastique est parfaitement réversible, c'est-à-dire que si on enlève la contrainte, le matériau revient à sa forme initiale. C'est le cas, aux petites déformations, de solides comme l'acier, le verre, le caoutchouc etc. Au niveau énergétique, la déformation élastique est donc une manière de stocker de l'énergie dans le système par l'intermédiaire de la déformation, énergie qui pourra être récupérée plus tard lorsque le solide reprendra sa forme initiale.

Au contraire, pour les liquides visqueux, la viscosité  $\eta$  représente la relation entre la contrainte et le taux de déformation  $\dot{\epsilon}$  :

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\epsilon}}$$

Le liquide va donc être déformé de manière linéaire au cours du temps. Lorsque que la contrainte est levée, la déformation s'arrête, mais le liquide ne reprend pas la place qu'il occupait avant son application. L'écoulement visqueux est un phénomène irréversible, et l'énergie qui a été fournie pour le faire s'écouler est dissipée.

Le liquide purement visqueux et le solide purement élastique sont des modèles qui ne sont valables que dans certaines conditions. Une barre d'acier est élastique dans une gamme de contraintes et de déformations, au-delà elle est plastique et se déforme de manière irréversible. Cela peut également dépendre de l'échelle de temps à laquelle on se place, par exemple, le manteau de la croûte terrestre peut être considéré comme un solide élastique à une échelle de temps de quelques heures, mais à des échelles de temps géologiques, il peut être considéré comme un liquide extrêmement visqueux ( $\eta \approx 10^{21} \text{Pa.s}$ ).

La fonction de fluage quantifie la déformation d'un matériau en réponse à une contrainte  $\sigma$  constante appliquée à partir d'un temps  $t = 0$ . Dans le cas simple du solide élastique, la fonction de fluage est une constante : à l'application d'une contrainte, le matériau est immédiatement déformé, et cette déformation reste constante par la suite.

$$J(t) = \frac{1}{E}$$

Dans le cas d'un liquide visqueux, la fonction de fluage est une fonction linéaire du temps :

$$J(t) = \frac{t}{\eta}$$

Les cellules vivantes et la plupart des bio-polymères sont des matériaux visco-élastiques, ce qui signifie qu'une partie de l'énergie transmise par la contrainte ou par la déformation va être stockée, et une autre va être dissipée. Il existe plusieurs manière simple de combiner les deux modèles précédents pour créer un modèle de visco-élasticité.

Les deux plus simples sont le modèle de Kelvin-Voigt et le modèle de Maxwell, qui associent un élément élastique de module d'Young  $E$  et un élément visqueux de viscosité  $\eta$ , le premier en parallèle et le second en série. Dans le modèle de Maxwell, lorsque l'on impose une contrainte  $\sigma$  constante, on obtient une superposition des deux fonctions de fluage précédentes :

$$J(t) = \frac{1}{E} + \frac{t}{\eta}$$

et donc une déformation affine au cours du temps. Le matériau se déforme de manière élastique, puis coule en relaxant la contrainte. Dans le modèle de Kelvin-Voigt :

$$J(t) = J_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad \tau = \frac{\eta}{E}$$

Un temps caractéristique du système apparaît, en dessous duquel la réponse est principalement élastique, et au-dessus duquel la déformation est principalement visqueuse.

Ces deux modèles peuvent être ensuite complexifiés, en combinant plusieurs éléments visqueux et plusieurs éléments élastiques, en parallèle et/ou en série.

Lorsque la sollicitation mécanique n'est plus une contrainte constante, mais sinusoïdale de fréquence  $\omega$ , on parle plutôt en terme de module visco-élastique :

$$G(\omega) = \frac{\sigma(\omega)}{\epsilon(\omega)} = G'(\omega) + iG''(\omega)$$

$G'$  est le module de stockage, et correspond à la part élastique de la réponse, tandis que  $G''$  est le module de perte, qui quantifie la dissipation. Pour un solide élastique on a  $G' = E$  et  $G'' = 0$ , alors que pour un liquide visqueux  $G' = 0$  et  $G'' = \omega\eta$ .

## 1.2 Propriétés des réseaux d'actine *in vitro*

Une des approches utilisées par les physiciens pour aborder l'étude des objets biologiques consiste à rechercher le système le plus simple pour lequel les propriétés observées dans le vivant peuvent être reproduites. En partant d'un très petit nombre de protéines purifiées, re-mélangées *in vitro*, on peut reconstruire des modèles simplifiés du cytosquelette, dans le but de comprendre quels éléments, et quelles associations d'éléments sont à l'origine des propriétés des cellules.

Dans le cas de l'actine, cela peut être un gel d'actine purifiée, auquel on peut ajouter des protéines réticulantes, comme l' $\alpha$ -actinine, la scruine ou la filamine, des moteurs moléculaires comme les myosines ou Arp2/3 pour créer des réseaux branchés.

Les gels d'actine purifiée et polymérisée, même en l'absence de tout réticulant se rigidifient sous contrainte. Deux mécanismes principaux expliquent ce comportement. D'une part, les filaments d'actine semi-flexibles, lorsqu'ils sont étirés, perdent des degrés de liberté de fluctuation, et cela crée une élasticité entropique

**storm\_2005** Plus la contrainte est grande, et plus les possibilités se réduisent, et plus le gel se rigidifie. D'autre part, les filaments semi-flexibles peuvent fluer, et acquièrent ainsi une élasticité de courbure. Au-delà de 20% de déformation, les gels d'actine cèdent, et leur module élastique diminue brutalement de manière irréversible **janmey\_1994** Il est à noter que les valeurs de modules élastiques mesurées pour les gels d'actine sont apparemment extrêmement dépendantes des conditions de purification, de stockage et de polymérisation de l'actine.

L'ajout de réticulants permanents, comme la scrupine, rend le gel quasiment exclusivement élastique, avec un module qui dépend principalement de la concentration en réticulants. Les réticulants dotés d'un temps caractéristique d'interaction entre deux filaments, comme l' $\alpha$ -actinine ou la filamine, n'augmentent pas autant la rigidité des gels d'actine. La réponse en fréquence de ces mélanges est également modifiée par la cinétique d'interaction entre les filaments et les réticulants, car une molécule avec des temps de détachement courts permet plus de dissipation et de relaxation des contraintes qu'une protéine interagissant longtemps. Les gels réticulés ont un comportement encore plus non-linéaire que les gels d'actine simple, allant jusqu'à des rigidités multipliées par 100 pour des gels avec de la filamine.

L'ajout de moteurs dans le réseau d'actine est encore une question de physique tout à fait différente. En plus de lier les filaments entre eux à la manière d'un réticulant classique, les myosines consomment de l'ATP et produisent des déplacements de filaments les uns par rapport aux autres, sans qu'il soit nécessaire de leur appliquer une contrainte extérieure. Un gel d'actine, de filamine et de myosine peut alors se rigidifier sans contrainte, uniquement sous l'action des moteurs moléculaires mettant en tension le réseau **koenderink** La consommation d'ATP par les myosines place également le gel hors de l'équilibre thermodynamique. Dans les concentrations d'ATP qui permettent aux myosines de faire coulisser les filaments les uns par rapport aux autres, le théorème fluctuation-dissipation n'est alors plus valable **mizuno** alors qu'il l'est sans ajout de myosines, ou lorsque la fréquence de stimulation est supérieure à 10 Hz.

### 1.3 Techniques de rhéologie cellulaire

De très nombreuses techniques ont été développées pour sonder les propriétés mécaniques des cellules *in vitro*, mais elles ne sondent pas toutes exactement la même chose.

En premier, les techniques peuvent être classées en deux catégories : les techniques de rhéologie active, où l'on applique une contrainte ou une déformation extérieure à la cellule, et les techniques de rhéologie passive, où il n'y a aucune contrainte ou déformation imposée.

Les techniques se distinguent également par l'échelle à laquelle elles sondent les cellules : certaines techniques sont globales, comme la micropipette ou le rhéomètre à cellule unique, d'autres sont locales comme les pinces optiques, et même parfois très locales, comme l'AFM. Selon la taille caractéristique de

l'élément sondé, ce ne sont pas les mêmes éléments du cytosquelette qui sont caractérisés : une technique sondant la réponse locale à la surface de la cellule verra principalement le cortex cellulaire, tandis qu'une bille enfoncée profondément au milieu du corps cellulaire verra le cytosquelette interne.

Certaines techniques appliquent la contrainte par l'intermédiaire des protéines d'adhésion, ce qui est le cas de la majorité des techniques de billes par exemple, tandis que d'autres peuvent sonder directement la mécanique cellulaire, comme l'AFM ou l'étireur optique (optical stretcher). Cet aspect est particulièrement important pour étudier la mécanotransduction : savoir si le signal mécanique est médié ou non par les diverses adhésions (à la matrice extracellulaire, aux autres cellules) est une information essentielle pour comprendre le phénomène. Cependant, la présence de ces adhésions oblige à faire des hypothèses sur les liaisons avec la cellule qui peuvent parfois affecter grandement les valeurs mesurées.

Parmi les techniques de rhéologie active, certaines appliquent des contraintes, d'autres des couples, et d'autres encore des déformations. Ces différences peuvent parfois rendre les comparaisons difficiles entre les résultats, lorsqu'il faut replacer les mesures sur une échelle commune à des techniques différentes.

Dans chacune des deux principales catégories, les techniques seront présentées dans un ordre approximatif de la technique la plus globale à la plus locale.

### 1.3.1 Les techniques de rhéologie active

#### Les techniques globales

Les techniques de rhéologie globales stimulent la cellule dans son entier, ou sur la majeure partie de son volume. Elles ont l'avantage de considérer les cellules comme un tout.

**Rhéomètre à cellule unique (Single Cell Rheometer)** Le rhéomètre à cellule unique est composé de deux fines plaques de verre recouvertes de protéines adhérentes entre lesquelles est placée une cellule. La déflexion de la lamelle du haut est mesurée, soit directement sur l'image de microscopie, soit indépendamment, et permet de connaître ou de fixer la force appliquée aux cellules.

Même s'il est présenté dans les techniques de rhéologie active, le rhéomètre à cellule unique peut être également utilisé en rhéologie passive. La cellule est alors attrapée entre les deux plaques et laissée libre de s'étaler. La force qu'elle exerce sur les plaques est déduite de la déflexion de la lamelle souple, ce qui permet de quantifier la force totale que la cellule peut déployer pour s'ancrer à son substrat.

Lorsqu'il est utilisé en rhéologie active, il peut appliquer une contrainte sinusoïdale ou constante, et donc mesurer le module visco-élastique  $G(\omega)$  ou la fonction de fluage  $J(t)$ .

#### Optical stretcher

## Micropipette

### Les techniques de billes

Ces techniques utilisent des billes micrométriques recouvertes de protéines d'adhésion qui se lient aux récepteurs de la membrane et servent d'intermédiaire pour exercer des contraintes sur les cellules.

Que la force soit appliquée sur la bille par un laser ou par un champ magnétique, le principe reste le même. La contrainte est transmise à la cellule par l'intermédiaire des protéines d'adhésion, ce qui signifie que les voies de mécanotransductions activées au niveau des adhésions vont également être stimulées. La stimulation est donc plus ou moins locale, selon le rapport entre la taille de la cellule et la taille de la surface de contact avec la bille.

Les estimations de modules visco-élastiques obtenues par des techniques de billes sont souvent très dépendantes des hypothèses qui sont faites sur la densité de liaisons au niveau de la surface de contact et du modèle mécanique qui permet d'obtenir une relation contrainte-déformation à partir de la relation entre la force exercée sur la bille et le déplacement de celle-ci. De plus, les billes sont plus ou moins enfoncées dans la cellule, selon les ligands, les types cellulaires, les temps d'incubations, et cela change la nature des éléments du cytosquelette qui vont être sondés : le cortex pour une bille en surface, le lamellipode pour une bille sur le bord en progression, le noyau pour une bille enfoncée au contact de celui-ci. . .

### Magnétocytométrie

**Pinces magnétiques** Le principe des pinces magnétiques est d'utiliser des billes de taille micrométrique qui contiennent des nanoparticules de fer qui les rendent super-paramagnétiques. Ces billes soumises à un champ magnétique créé par un électro-aimant sont attirées vers lui avec une force qu'il faut calibrer à l'avance. La force exercée sur une bille peut alors être réglée en modifiant le courant électrique parcourant l'électro-aimant. Ces billes sont fonctionnalisées avec des protéines d'adhésion (intégrines, cadhérines, ICAM . . .), elles vont donc sonder le cytosquelette par l'intermédiaire de ces protéines. Elles sont calibrées à l'avance de façon à connaître la relation entre le courant passant

Les pinces magnétiques peuvent appliquer des forces de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de pN lorsqu'elles sont placées hors de la chambre expérimentale, mais peuvent monter à quelques nN ou à la dizaine de nN lorsqu'elles sont placées à seulement une dizaine de microns de la cellule. Leur précision est subordonnée principalement à la variabilité de la charge magnétique d'une bille à l'autre, selon leur contenu en nanoparticules de fer. L'électro-aimant ne peut qu'attirer les billes, ce qui signifie que lorsqu'il n'y a qu'un seul électro-aimant, la force ne peut être appliquée que dans une seule direction et un seul sens.

Durant le début de ma thèse, j'ai construit et utilisé des pinces magnétiques afin de sonder la rhéologie cellulaire de myoblastes en culture. Les détails de la

conception, de l'utilisation et des résultats de ces pinces sont décrits dans les chapitres suivants.

**Pincas optiques** Les pinces optiques utilisent des billes de silice qui sont piégées dans le faisceau focalisé un laser infra-rouge. La bille est en permanence soumise à une force de rappel élastique qui la ramène vers le centre du piège. En mesurant l'écart entre la position de la bille et le centre du piège, on peut connaître la force exercée par le piège sur la bille.

Les pinces optiques peuvent appliquer des forces de la dizaine à la centaine de pN dans n'importe quelle direction du plan focal, avec une précision sur la force appliquée bien meilleure de celle des pinces magnétiques, au prix d'une gamme de forces plus réduites.

**Microscopie à force atomique (AFM)**

**Autres techniques**

**Cell poking**

**Ablation laser**

### **1.3.2 Les techniques de rhéologie passive**

**Techniques utilisant le substrat**

**Traction Force Microscopy**

**Surfaces micro-texturées**

**Techniques utilisant des objets intra-cellulaires**

**Billes en diffusion**

**Micro-aiguilles**

## **1.4 Propriétés rhéologiques de cellules**

## **1.5 Mécanotransduction**