

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 ϵ est proportionnelle à la contrainte σ , 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 η 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 σ 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. Par exemple, dans le cas d'un étirement uniaxial :

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

Dans le cas d'un liquide visqueux cisailé, 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 manières simples 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 η , le premier en parallèle et le second en série. Dans le modèle de Maxwell, lorsque l'on impose une contrainte σ 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 ω , 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' α -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 scrucine, 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' α -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 $J(t)$.

Le dispositif applique des forces du nN à la centaine de nN, ou des déformations jusqu'à plusieurs dizaine de %.

Optical stretcher L'étireur optique se base sur le principe des pièges laser. Lorsqu'un objet est piégé entre deux faisceaux laser gaussiens identiques venant de directions opposées, il est piégé et soumis à un étirement le long de l'axe des faisceaux. Les deux faisceaux doivent pour cela être légèrement plus grands que l'objet lui-même.

Cette technique a été utilisée pour sonder la mécanique de cellules en suspension en observant leur déformation lorsqu'elles passent entre les deux faisceaux. Comme pour le rhéomètre à cellule unique, c'est la cellule dans sa globalité qui est testée, mais cette fois de manière totalement indépendante de l'adhésion.

L'optical stretcher applique des forces de l'ordre de quelques pN.

Cette technique sonde les cellules en l'absence de toute adhésion. Cela peut être un avantage dans le cas de cellules qui sont naturellement en suspension, comme les érythrocytes, mais pour des cellules naturellement adhérentes, cela pose la question de la pertinence des mesures faites dans des circonstances aussi inhabituelles pour elles.

Micropipette L'utilisation de micropipettes est la technique la plus ancienne de rhéologie cellulaire. Dans sa version la plus simple, il s'agit d'aspirer tout ou partie de la cellule dans une micropipette avec une certaine dépression, et d'observer la déformation résultante. Lorsqu'une partie de la cellule est aspirée, ce sont la taille et la forme de la partie aspirée qui sont analysées pour remonter aux paramètres mécanique. Cela peut être fait sur des cellules en suspension ou sur des cellules adhérentes. Une autre méthode pour les cellules en suspension consiste à aspirer la cellule complètement dans la pipette, puis à la relâcher, et d'observer sa relaxation vers sa forme d'origine.

Avec deux micropipettes, il est également possible de sonder les interactions entre deux cellules.

Cette technique permet d'exercer des forces de 10pN à la centaine de nN, ce qui en fait probablement la technique ayant le plus large éventail de possibilités. Sa résolution spatiale est en revanche limitée à des déformations qui sont grandes à l'échelle de la cellule.

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 Cette technique est la première des techniques de billes. Elle utilise des billes ferromagnétiques de taille micrométrique, recouvertes de protéines d'adhésion, pour appliquer un couple sur les cellules.

Les billes, préalablement magnétisées, ancrées sur les cellules, sont soumises à un champ perpendiculaire à leur moment magnétique. En cherchant à s'aligner avec le champ, elles exercent un couple sur les cellules auxquelles elles sont ancrées. L'orientation moyenne des billes est alors mesurée par un magnétomètre. Les couples appliqués vont du Pascal à la centaine de Pascal.

L'avantage et l'inconvénient de cette méthode est qu'elle permet d'observer une grande population de cellules en même temps. Le champ résultant est une moyenne de toutes les rotations de toutes les billes sur les cellules. Mais elle réduit également l'information à cette moyenne, et il n'est pas possible d'obtenir plus de détails sur les comportements à l'intérieur de la population : une population composée de cellules très molles qui laissent la bille s'aligner presque complètement et de cellules très rigides qui ne la laisse quasiment pas tourner pourra donner des résultats identiques à une population composée de cellules qui laissent la bille former un angle de 45° avec le champ.

Un variante de cette technique consiste à observer le mouvement des billes avec un microscope pour en déduire la déformation de la cellule. Cela réduit le nombre de cellules observées, mais permet d'avoir plus d'informations sur la population que la simple moyenne. Cela permet également de mesurer le comportement fréquentiel, en appliquant un champ magnétique oscillant.

Pincés magnétiques Le principe des pincés 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 pincés 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. Il est également possible, lorsqu'on dispose de deux pièges de fixer deux billes aux extrémités d'une cellule en suspension.

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)

La microscopie à force atomique a initialement été développée comme une manière d'observer des échantillons avec une résolution 1000 fois meilleure que celle de la microscopie optique, avec une résolution verticale atteignant celle d'un atome. Elle repose sur un levier élastique flexible qui va scanner la surface de l'échantillon pour mesurer sa topographie. En cela, la microscopie à force atomique est par rapport à notre sens du toucher ce que la microscopie optique est à notre vue. Un laser est réfléchi sur le bout du levier et le déplacement du reflet permet de mesurer la déflexion du levier avec une très grande précision.

Mais le levier peut également être utilisé comme une sonde pour appliquer des forces en appuyant sur une cellule. La raideur du levier est calibrée, ce qui permet à partir de sa déflexion de mesurer une force. La pointe d'un microscope à force atomique est en général extrêmement fine, pour permettre la résolution nanométrique de l'AFM. Mais pour stimuler une cellule vivante, cette pointe peut être trop fine et endommager les cellules, c'est pourquoi une bille est parfois fixée sur la pointe. Lors d'études sur les contacts entre deux cellules, une cellule a également pu être fixée sur le levier pour servir d'intermédiaire.

Selon la taille de la pointe, l'AFM va pouvoir sonder la cellule à des échelles locales, voir très locales, de l'ordre de la taille de la pointe (de la dizaine à la centaine de nanomètres), avec des forces allant du pN à la centaine de nN. Selon l'indentation, c'est-à-dire la profondeur à laquelle la pointe va être enfoncée, les éléments du cytosquelette sondés seront également différents. La pointe peut être utilisée pour observer la fonction de fluage, une relaxation, ou peut être mise en oscillations pour observer le régime fréquentiel.

Endosomes magnétiques

Toutes les cellules peuvent absorber des particules extérieures avec lesquelles elles rentrent en contact par un mécanisme appelé endocytose. L'objet est enveloppé dans une invagination de la membrane plasmique, et se retrouve dans la cellule à l'intérieur d'une bulle de membrane.

En introduisant des nanoparticules magnétiques par ce moyen dans le cytoplasme des cellules, il devient possible de sonder la rhéologie de l'intérieur de la cellule. Soumises à un champ magnétique, les nanoparticules magnétiques s'alignent pour former des aiguilles, qui sont mises en rotation par un champ magnétique tournant. L'observation de cette rotation permet d'obtenir $G(\omega)$.

Cette technique permet de faire des mesures dans plusieurs endroits simultanément dans la même cellule, et également de faire de la rhéologie passive lorsqu'aucune force n'est appliquée. Elle sonde la cellule à une échelle sub-micrométrique, en s'affranchissant de l'influence du cortex et de l'adhésion, mais est influencée par les mouvements actifs auxquels sont soumis les endosomes de la part de la cellule.

1.3.2 Les techniques de rhéologie passive

Les techniques de rhéologie passives ont l'avantage de ne pas perturber les cellules pendant l'expérience avec une force ou une déformation imposée.

Il est à noter que certaines techniques présentées dans la partie rhéologie active peuvent également être utilisées en rhéologie passive. C'est par exemple le cas du rhéomètre à cellule unique et des endosomes magnétiques.

Les techniques de rhéologie passives reposent sur l'observation du mouvement brownien de particules à l'intérieur des cellules. Ces particules peuvent avoir des tailles de l'ordre du nm au micron, être composées de différents matériaux comme de l'or, des polymères, de la silice ou des oxydes de fer, et être introduites dans la cellule par injection, endocytose, phagocytose ou être adhérentes.

La rhéologie passive suppose que les billes sont soumises au mouvement brownien dans un milieu visco-élastique à l'équilibre thermodynamique, et peut à l'aide du théorème fluctuation-dissipation calculer $G(\omega)$. Cependant, l'hypothèse de l'équilibre thermodynamique, souvent vérifiée aux temps courts, ne l'est pas aux temps plus longs, lorsque les moteurs moléculaires sont actifs.

En comparant les résultats de mesures effectuées en rhéologie passive et active avec les prédictions du théorème fluctuation-dissipation, on peut également avoir accès à l'énergie déployée par la cellule pour développer des mouvements actifs.

- 1.4 Propriétés rhéologiques de cellules
- 1.5 Autres mesures physiques sur les objets biologiques et mécanotransduction
 - 1.5.1 Mesurer les forces générées par les cellules
 - 1.5.2 Appliquer des forces pour observer la réponse biologique