

Chapitre 1

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

1.1 À propos de la localisation de MRTF-A

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

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

Classification selon la localisation de MRTF-A Dans un premier temps, les cellules exprimant MRTF-A GFP, la version fluorescente du gène MRTF-A, peuvent être classées en trois groupes : celles pour lesquelles on peut distinguer le noyau en noir (la fluorescence est plus importante dans le cytoplasme), qui seront appelées Cytoplasmiques, celles pour lesquelles on peut distinguer le noyau en vert, appelées Nucléaires, et celles pour lesquelles le noyau ne peut être distingué, appelées Homogènes, comme on peut le voir sur les exemples en figure 1.1.

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

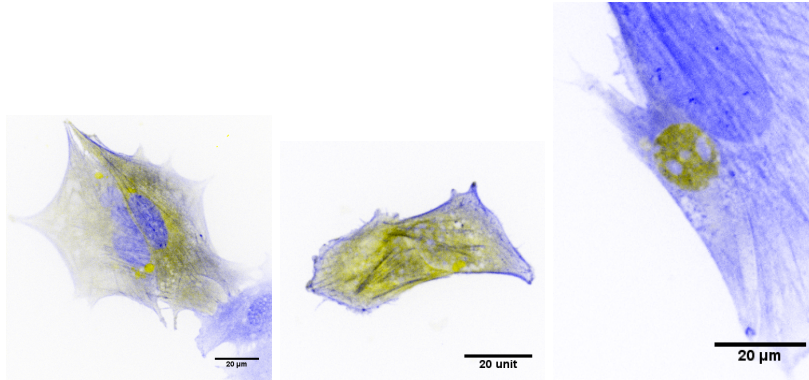


FIGURE 1.1 – Exemples de cellules classées comme MRTF-A Cytoplasmique, Homogène et Nucléaire, de gauche à droite respectivement. En bleu, la phalloïdine marquant les filaments d’actine, en jaune la MRTF-A GFP.

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

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

1.1.1 Influence des moyens d’observation sur l’équilibre entre MRTF-A et l’actine G

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2 Application d'une force locale avec les pinces magnétiques

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

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

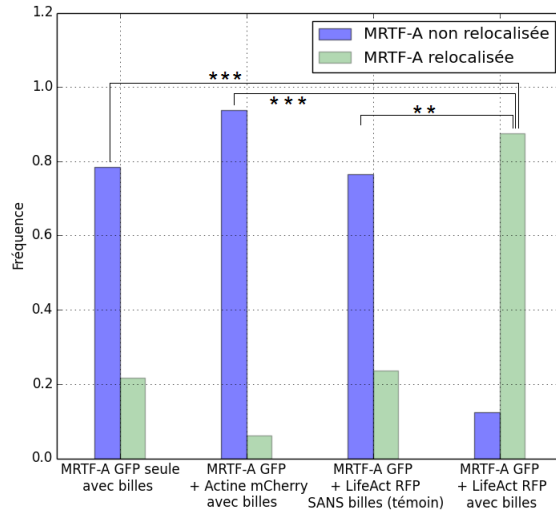


FIGURE 1.2 – Proportion des cellules observées pour lesquelles MRTF-A GFP change (en vert) ou ne change pas (en bleu) de localisation dans la cellule au cours de l'expérience. * : $p < \frac{0.05}{4}$, ** $p < \frac{0.01}{4}$, *** $p < \frac{0.001}{4}$ (réalisés avec un test de Fisher et une correction pour les comparaisons multiples)

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

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

On peut voir sur la figure 1.2 que l'ajout d'actine exogène réduit le nombre de cellules pour lesquelles MRTF-A change de localisation, mais de manière non significative, alors que l'ajout de Life Act RFP a l'effet inverse de manière significative. En effet, en ajoutant de l'actine mCherry, on augmente la quantité totale de G-actine dans la cellule, et ce d'autant plus que l'actine fluorescente polymérise un peu moins bien que l'actine sauvage. Comme plus de G-actine est disponible pour se lier à MRTF-A, celle-ci est d'autant plus susceptible d'être liée à l'actine et donc cytoplasmique. Si la réserve d'actine monomérique est grande, une polymérisation d'actine en réponse à la force appliquée ne sera pas forcément suffisante pour dépléter la réserve de G-actine excédentaire.

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

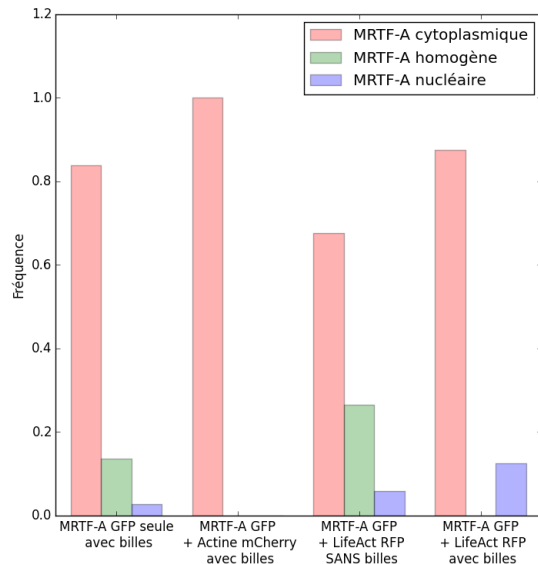


FIGURE 1.3 – Répartition de MRTF-A dans les cellules.

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

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

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

On peut remarquer que la répartition de localisation de MRTF-A entre les différentes expériences est relativement semblable, ce qui implique que le changement d'activité observé sur la figure 1.2 n'est pas dû à l'état initial de MRTF-A dans ces cellules. Cependant, on peut noter une augmentation non significative de la quantité de cellules avec MRTF-A cytoplasmique avec l'actine mCherry,

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

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

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

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

1.3.1 État de référence

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

L'état de référence est construit à partir de cellules qui ont été transfectées en MRTF-A GFP seulement, puis ensemencées et montées comme si elles allaient être étirées. Aucun rinçage n'a été effectué avant expérience pour éliminer l'effet du changement de milieu de culture (la section 1.3.3 aborde ce sujet en détail).

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

On peut observer que la différence de répartition entre les deux états est la même lors des expériences fixées immédiatement après montage et après 5 minutes d'étirement sur la figure 1.4 et constater qu'il n'y a aucune différence entre les deux répartitions. Cela peut indiquer qu'il n'y a aucune réponse de la part des cellules durant les 5 premières minutes, mais cela n'exclut pas une improbable réaction très rapide qui reviendrait à l'équilibre pendant ce laps de temps.

Le lecteur attentif aura remarqué que cette répartition est différente de celle présentée en figure 1.2. Cela est dû aux différences dans la préparation des cellules dans les deux expériences, car la transfection n'était pas faite dans les conditions optimales lors des expériences de pinces magnétiques. La quantité de plasmide ayant pénétré dans les cellules est plus faible, et la quantité de cellules ayant MRTF-A dans le noyau (Homogène ou Nucléaire) l'est également.

L'évolution de l'état de base au cours du temps est présentée sur la figure 1.6. On peut observer que la proportions des différents états reste relativement stable, avec une légère diminution de la quantité de MRTF-A Cytoplasmique

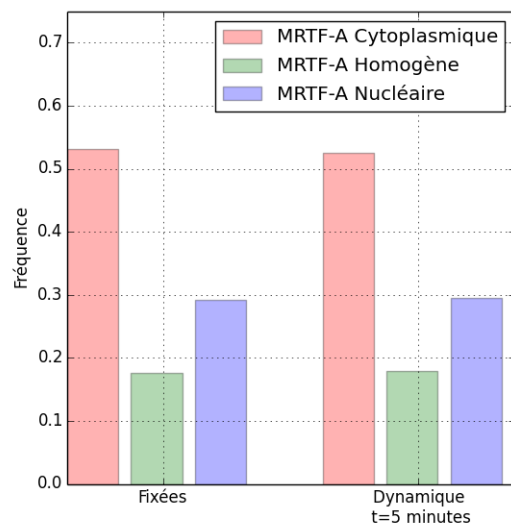


FIGURE 1.4 – Répartition entre les trois états pour des cellules fixées immédiatement après un montage sans rinçage et sans étirement ($n=7$, 963 cellules) et lors de l'observation en direct après 5 minutes d'observation sans étirement ($n=5$, 41 cellules). La différence n'est pas significative ($p=0.995$, G-test).

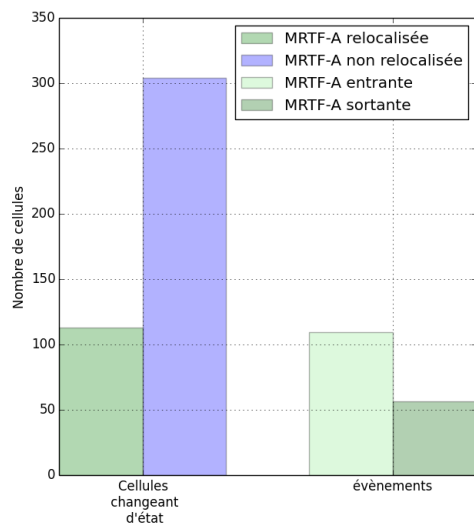


FIGURE 1.5 – Quantité de cellules changeant au moins une fois d'état et direction de ces changements

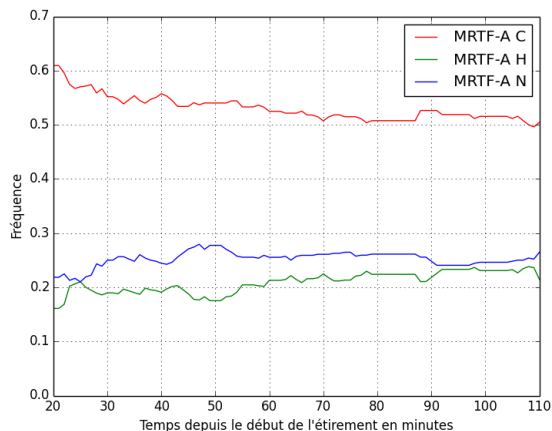


FIGURE 1.6 — Évolution de la proportion de cellules ayant MRTF-A dans chacune des trois localisations au cours du temps lors d’une expérience témoin où l’on a monté à l’avance la lamelle dans l’étireur et où l’on applique aucune contrainte.

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

1.3.2 Effet de la sur-expression d’actine mCherry

De manière similaire à ce qui était observé figure 1.2 pour les expériences de pinces magnétiques, la sur-expression d’actine causée par l’introduction d’un plamide d’actine mCherry cause des changements importants et significatifs à la localisation de MRTF-A dans la cellule.

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

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

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

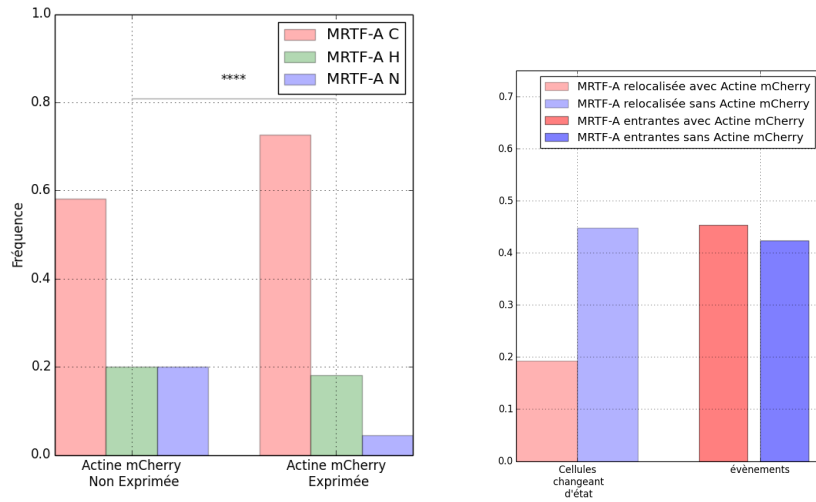


FIGURE 1.7 – Répartition initiale pour des cellules issues des même expériences exprimant ou non le plasmide Actine mCherry. **** : $p < 10^{-4}$

FIGURE 1.8 – Quantité de cellules changeant au moins une fois d'état et direction de ces changements, pour les même expériences, selon que l'Actine mCherry est exprimée ou non.

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

1.3.3 Effet du rinçage et du montage préalables

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

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

On peut voir sur la figure 1.9 que lorsque les cellules sont rincées juste avant l'expérience (Montées Rincées vs Montées Non Rincées), il y a significativement moins de cellules pour lesquelles MRTF-A est majoritairement cytoplasmique. Comme son nom l'indique, Serum Response Factor est puissamment activé par le sérum, et ici le seul rinçage avec du milieu neuf suffit à activer la voie de signalisation MRTF-A/SRF et changer la localisation de MRTF-A d'une partie des cellules. On également constater que lorsque le rinçage est effectué la veille (Prémontées Rincées vs Prémontées Non Rincées), il n'y a plus aucun effet.

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

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

1.3.4 Résultats pour l'étirement 10%

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

On peut observer sur la figure 1.10 que dès le début, la proportions de cellules ayant MRTF-A dans le cytoplasme est inférieure à celle du témoin, et ne fait que diminuer. Au contraire, les cellules ayant MRTF-A répartie de manière homogène sont plus nombreuses et croissent.

On peut confirmer cette tendance en observant les figures 1.11 et 1.12, sur lesquelles on voit une vague importante d'évènements $C \rightarrow H$ et $H \rightarrow N$ (donc entrants) se produire lors de l'étirement 10%. Le nombre total d'évènements

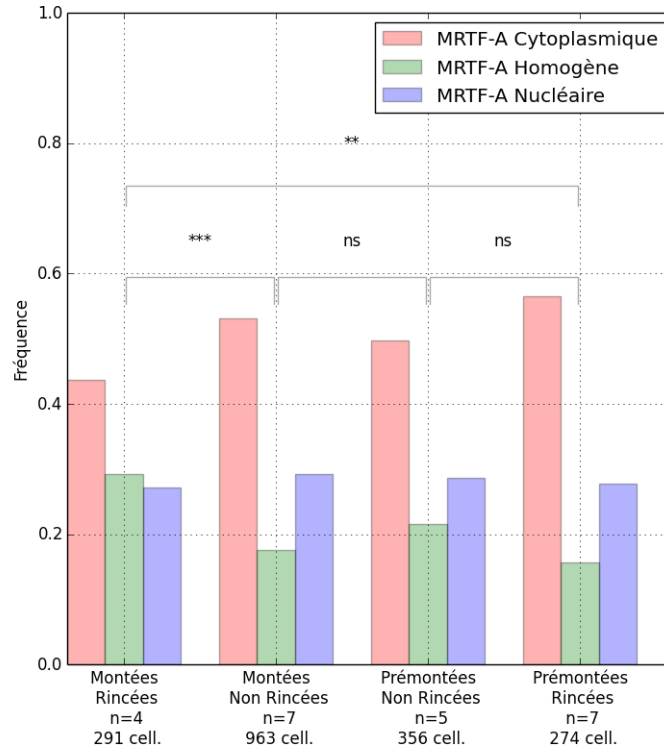


FIGURE 1.9 – Influence sur la localisation de MRTF-A des contraintes mécaniques dues au montage de la lamelle dans l'étireur (Montage) et de la variation de concentration en sérum due au remplacement du milieu de culture par du milieu neuf au moment du montage (Rinçage). Montées : montage à $t - 5$ minutes, Prémontées : montage à $t - 18$ heures, rinçage au même moment. Tous les tests ont été réalisés avec un G-test d'indépendance χ^2 et une correction de Bonferroni pour les comparaisons multiples. ** : $p < \frac{0.01}{4}$ et *** : $p < \frac{0.001}{4}$

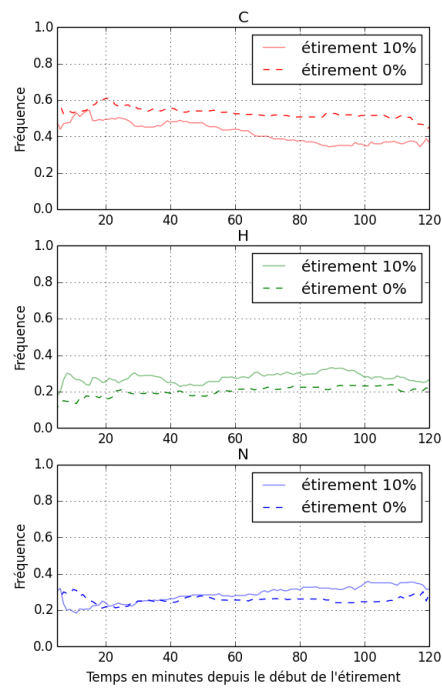


FIGURE 1.10 – Comparaison de l'évolution de la fréquence de chaque localisation de MRTF-A au cours du temps après 10% d'étirement ou dans les expériences témoin (n=5 et 141 cellules dans les deux cas)

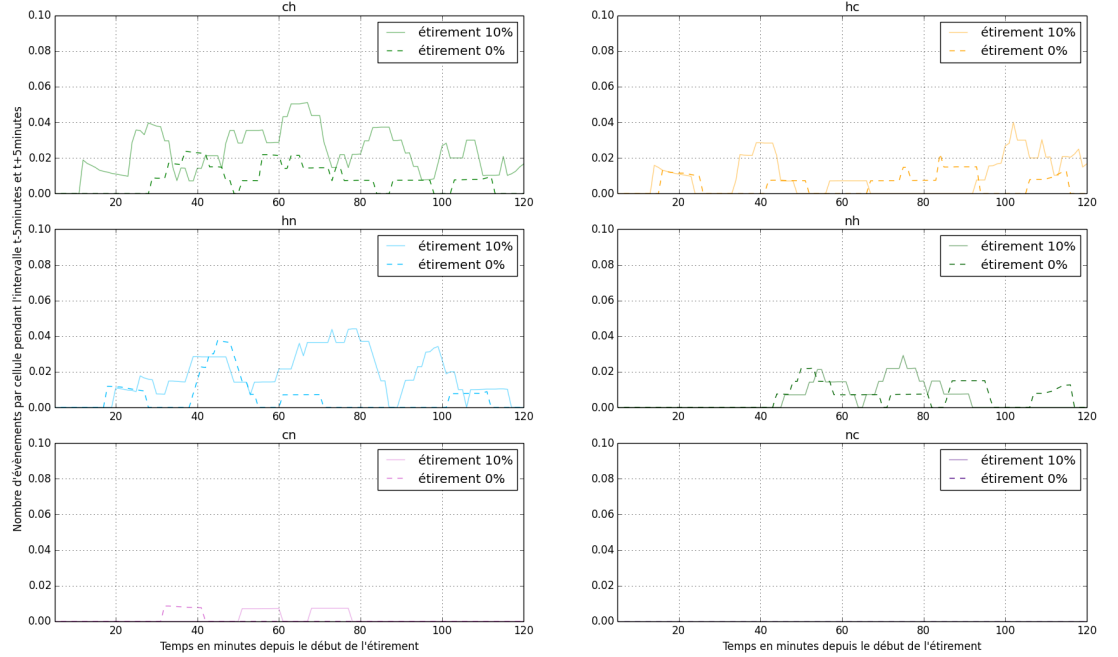


FIGURE 1.11 – Nombre d'événements ayant eu lieu pendant la fenêtre $[t-5\text{min}, t+5\text{min}]$ pour chaque type de transition possible divisé par le nombre de cellules observées.

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

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

1.3.5 Résultats pour l'étirement 30%

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

En effet, si l'on observe l'évolution des trois populations différents par rapport au témoin, on peut voir sur la figure 1.13 que la quantité de cellules avec MRTF-A cytoplasmique augmente, et que celles où MRTF-A est homogène diminue, contrairement au témoin et à l'expérience 10%.

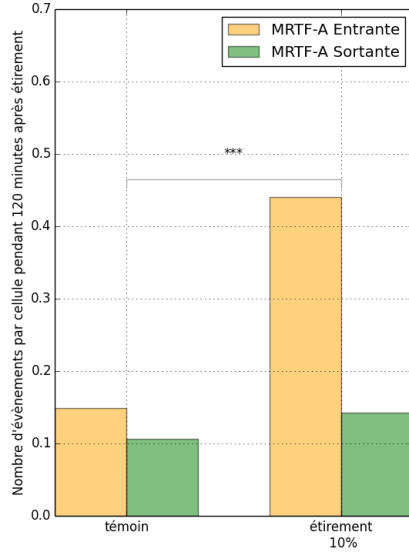


FIGURE 1.12 – Nombre d'événements entrants ou sortants par cellule observée pendant 120 minutes, pour l'étirement 10% et pour le témoin. $p=0.0003$

De plus, sur la figure 1.14, on peut constater qu'il y a dès le début de l'expérience un pic net dans le nombre d'événements sortants $H \rightarrow C$ entre 20 et 40 minutes. Un pic d'événements sortants devrait être lié à une grande quantité de G-actine libérées dans ces cellules, de manière très rapide, ce qui nous amène naturellement à poser l'hypothèse d'une destruction brutale du cytosquelette en réponse à une déformation trop forte, suivie d'une reconstruction que l'on commence à voir à partir de 80 minutes d'étirement, avec l'augmentation des transitions $C \rightarrow H$.

Comme l'autre expérience d'étirement, une grande partie des cellules changent au moins une fois d'état pendant les deux heures d'observation, comme on peut le voir sur la figure 1.15, mais il y a nettement moins de déséquilibre entre les événements entrants et sortants ($p=0.014$, figure 1.16).

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

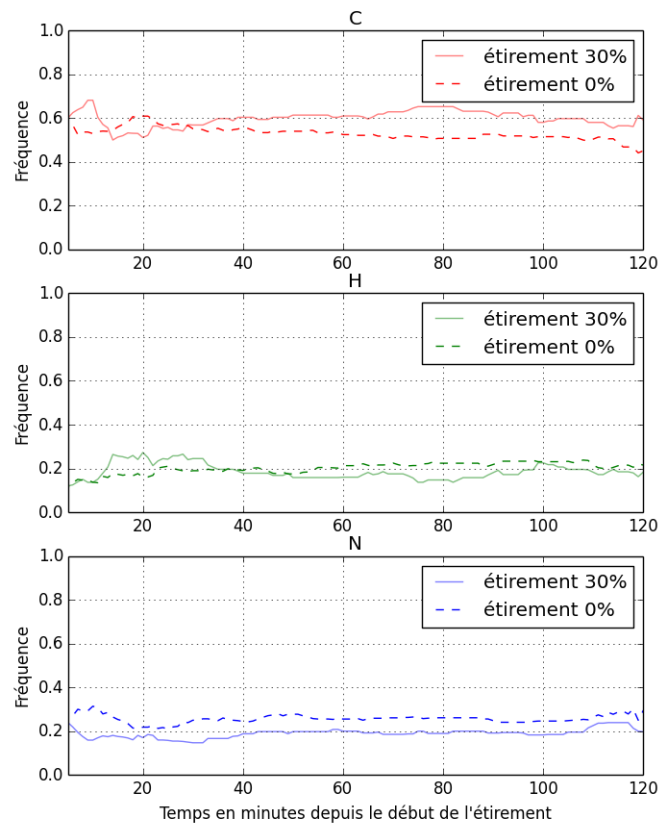


FIGURE 1.13 – Comparaison de l'évolution de la fréquence de chaque localisation de MRTE-A au cours du temps après 30% d'étirement ou dans les expériences témoin ($n=5$ et 141 cellules pour le témoin, $n=3$ et 102 cellules pour l'étirement 30%)

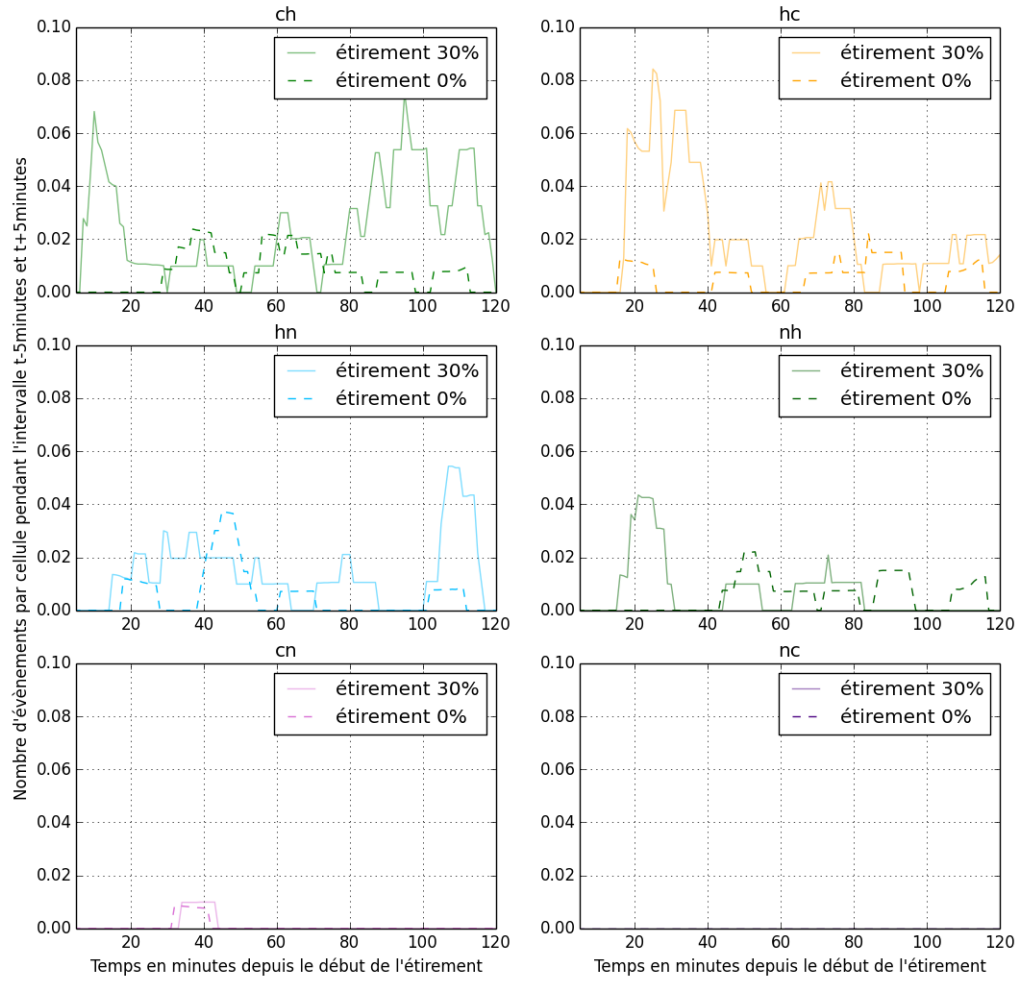


FIGURE 1.14 – Nombre d'événements ayant eu lieu pendant la fenêtre $[t-5\text{min}, t+5\text{min}]$ pour chaque type de transition possible divisé par le nombre de cellules observées.

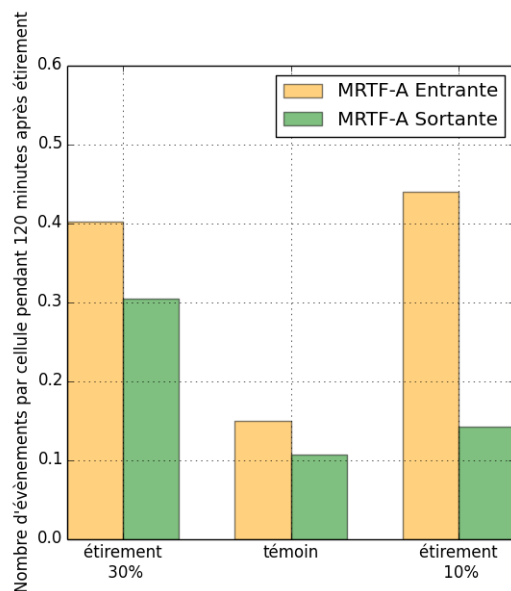


FIGURE 1.15 – Quantité de changements d'état par cellule pour les trois conditions différentes

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

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

1.4.1 Résultats pour l'étirement 10%

1.4.2 Résultats pour l'étirement 30%

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

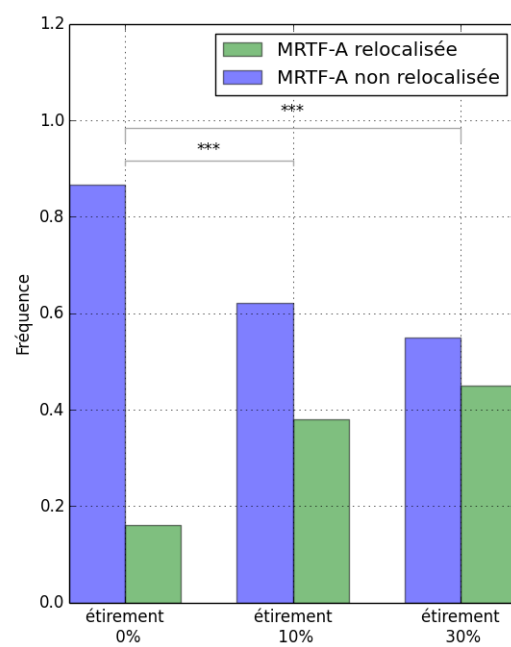


FIGURE 1.16 – Comparaison pour les deux étirements et le témoin de la quantité de cellules qui changent d'état au moins une fois