

École doctorale Physique en Île de France

Doctorat de Physique
THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'UNIVERSITE PARIS DIDEROT (Paris 7)
SORBONNE PARIS CITE

présentée par

LORRAINE MONTEL

le 29 septembre 2015

**Rôle de Myocardin-Related Transcription
Factor dans la mécanotransduction de la
cellule musculaire**

Directeur de thèse : **Sylvie HÉNON**

Jury

Hélène Delanoë-Ayari,	Rapporteur
Jean-Baptiste Manneville,	Rapporteur
Nicolas Borghi,	Examinateur
Sylvain Gabriele,	Examinateur
Athanassia Sotiropoulos,	Examinateur
Sylvie Hénon,	Directeur de thèse

Remerciements

Cette thèse représente près de quatre années de travail, depuis le début de mon stage de M2, jusqu'à la fin de la rédaction. Ce manuscrit couvre l'essentiel du travail scientifique accompli durant ce temps, mais seulement une partie de ce qui a fait ces années de thèse. Dans ces remerciements, je vais essayer de couvrir ce qui manque, les personnes, les rencontres, les discussions, qui ont rendu tout cela possible.

Je vais sans doute en oublier, parce que dès qu'on essaie de faire une liste, il manque forcément au moins un élément. Toutes mes excuses d'avance à celui ou celle qui en fera les frais.

Pour essayer d'être un peu rigoureuse, je vais procéder en remontant le temps.

Il en suit logiquement que je remercie en premier lieu les membres du jury, pour avoir accepté d'évaluer mes travaux, pour être venus m'écouter parler de la petite pierre que je souhaite ajouter à l'immense édifice que forme aujourd'hui la recherche scientifique. J'espère que vous repartirez de ma soutenance avec une petite idée, un bout de savoir qui vous aura enrichi. Je remercie tout particulièrement les deux rapporteurs, qui ont eu la tâche plus ardue de lire entièrement les presque deux cents pages de cette thèse, pendant l'été qui plus est. Ils l'ont tous les deux faits avec rigueur et bienveillance, ce en quoi je leur suis très reconnaissante.

Toujours en chronologie inversée, je souhaite également remercier Tiana Jacquemart, stagiaire de M1 avec Sylvie pendant ma période de rédaction, et qui a bien voulu continuer les expériences que je ne pouvais plus faire faute de temps. Tiana, je te souhaite une bonne continuation pour la fin de ton Master, et je te remercie de ta patience avec moi lorsque la fin de thèse commençait à me stresser. L'été précédent, nous avions également accueilli une stagiaire de M1 qu'il me faut remercier, Marion Tesseydre, qui a réalisé avec moi les expériences sur les cellules fixées, puis les a poursuivies sans moi pendant que je partais en congé maternité.

C'est au milieu de cette thèse qu'est née Valentine, pour chambouler toute ma vie. Rien de tel qu'un petit sourire plein de fossettes pour remettre en perspective les ratés expérimentaux ou les puzzles incompréhensibles de la thèse. Alors un grand merci à Valentine, pour sa nature souriante et sa curiosité sans limite, qui ont fait de "regarde, c'est beau" sa première phrase favorite.

Par ailleurs, j'ai eu la chance de faire ma thèse dans un lieu privilégié, un la-

boratoire à l'ambiance conviviale, dans lequel ça me fera un pincement au cœur de ne plus venir travailler. Merci à Loïc de m'avoir accueilli au MSC, à Fabien mon homonyme, en particulier pour ses suggestions de jury et de post-docs, à Alain qui m'a tout appris de la culture cellulaire avec un humour pince-sans-rire, à Laurent qui fabriqué les pièces de mes montages expérimentaux, à François et Atef pour les discussions de mécanique cellulaire . . . Merci à tous mes collègues thésards et post-docs, pour avoir mis une bonne ambiance dans le bureau, dans le labo et en conférences. Merci à Alessandra, avec qui j'ai fait mon premier Western Blot, et à qui je souhaite beaucoup de bonheur maintenant qu'elle va elle aussi avoir bientôt un petit bout à la maison. Merci à David, qui nous apprend à douter de tout, et à Sham pour les discussions complètement improbables en 767A. Merci également à Vicard, Loudjy, Laurie et Laura, d'avoir fait de ce bureau un lieu si agréable. Un grand merci à mes collègues de mécanique cellulaire, Élisabeth, Pauline, Nathalie et Kelly, pour toutes ces discussions intéressantes, à propos de mécanique ou non, et en particulier pour une certaine conférence en Autriche. J'envoie des remerciements tous particuliers à Élisabeth, que j'ai le plus côtoyé pendant ces années au labo, et qui est devenue une véritable amie. Tu me manques maintenant que tu es partie à l'autre bout du monde, mais je te souhaite bonne chance !

À l'origine de cette thèse, et donc de tout ça, il y a Sylvie, qui a accepté de me guider. Je n'arrive pas trop à savoir comment je pourrais te remercier de tout ce que tu m'as apporté pendant ces quatre années. J'ai côtoyé beaucoup de thésards, au laboratoire ou à l'extérieur, et je suis absolument convaincue d'être celle qui a eu la meilleure directrice de thèse. Tu as su me guider lorsque j'en avais besoin, tout en me laissant prendre les choses en main moi-même, me laisser explorer des territoires qui t'étaient inconnus comme la programmation et les bases de données, mais me suggérer au bon moment de changer d'approche lorsque les choses ne fonctionnaient pas.

En dehors du laboratoire, je tiens à remercier mon (grand) cercle d'amis, tous les participants des étés et hivers à Eygliers : mes collègues de promo de l'ENS Cachan Cécile, JB, Rémi Cornaggia, ou des promos d'avant, Daniel, Pascal, Sandrine, Chicco, ceux connus par Patrick, Clément et Sabrina, Rémi Bonnet, Camille, Floraine et Simon et ceux connus ensemble comme Guillaume, Chacha, Béa . . . et tout particulièrement Marie-Charlotte, avec qui on s'est forgées en tant qu'adultes, depuis maintenant 10 ans. Merci à tous pour ces pauses à la montagne, à jouer et à bien manger, qui permettent de s'aérer l'esprit, et de reprendre le moral au moment opportun. Merci également pour toutes les soirées et dîners chez nous, les parties de jeu de rôle, les sorties au parc et les séances de couture.

J'ai évidemment une immense dette envers Patrick, qui partage ma vie au quotidien, pour m'avoir moralement supportée, dans tous les sens du terme, pendant toutes ces années, lorsque j'avais l'impression de ne plus rien comprendre, et que rien ne fonctionnerait jamais. Ta patience est mon ancre dans la tempête. Merci d'être mon équipier dans l'aventure de la famille, et j'espère que la route sera très très longue. Merci également à Chantal et Ange, qui m'ont gentiment accueillie dans leur famille et dans leur maison.

Merci à Claire et Julien, mes amis de toujours, avec qui j'ai grandi et découvert mes passions. Merci également à Valérian, Patrick et Claudine, pour toutes ces vacances passées ensemble. Vous êtes ma seconde famille.

Enfin, merci à ceux sans qui rien de tout cela ne serait arrivé. Merci à mes parents d'avoir su développer et nourrir chez moi la curiosité, la soif de savoir, la persévérance, et l'ambition de faire de la recherche scientifique, et de m'en avoir donné les moyens. Merci à ma sœur d'avoir été toujours là (et d'avoir supporté les discussions scientifiques interminables à table), et d'avoir bien voulu devenir mon amie en plus de ma sœur .

Merci à tous. Vous avez tous apporté votre pierre dans l'édification de cette thèse, et une part vous en revient.

Liste des abréviations

- ABP : Actin Binding Protein, protéine se liant à l'actine
ADN : Acide Désoxyribonucléique, support de l'information génétique
ADP : Adénosine Di-Phosphate
AFM : Atomic Force Microscopy, Microscope à force atomique
AOTF : Acousto-optical tunable filter, Modulateur acousto-optique
Arp2/3 : Complexe formé des Actin Related Proteins 2 et 3 entre autres
ATCC : American Type Culture Collection
ATP : Adénosine Tri-Phosphate
BSA : Bovine Serum Albumine
BSAC : Basic, Sap and Coiled-Coil, autre nom pour la MRTF-A murine
C : localisation majoritairement Cytoplasmique
CarG : séquence CC(A/T)₆GG sur l'ADN où peut se fixer SRF
ChIP seg : séquençage par immunoprécipitation de chromatine
Cox2 : Cyclo-oxygénase 2
Cy3 : Cyanine fluorescente dans le rouge
C2C12 : lignée de myoblastes murins immortalisés
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole, marqueur de l'ADN fluorescent dans le bleu
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium, milieu de culture cellulaire
DN : Dominant Négatif, version déficiente de la protéine qui interfère avec la version saine
DNase : Désoxyribonucléase I, utilisée comme marqueurs de l'actine monomérique
Ddx19 : protéine liée à l'import de MRTF-A
Ecad : cadhéchine épithéliale
EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique, utilisé comme chélateur des ions Calcium
EMT : Epithelial to Mesenchymal Transition, Transition d'un type épithelial à un type mésenchymateux
ERK 1/2 : Extracellular signal-regulated kinases, kinases phosphorylant MRTF-A
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer, technique de microscopie combinant deux fluorophores très proches
GFP : Green Fluorescent Protein, protéine fluorescent dans le vert et qui peut être ajoutée à n'importe quelle protéine à visualiser

GTP : Guanosine Tri-Phosphate
H : localisation majoritairement Homogène
HS : Horse Serum
HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique, solution tampon
IL4/6 : Interleukines 4 et 6
ILK : Integrin-linked kinase
KO : Knock Out, désactivation d'un gène
LIMK : LIM domain kinase, kinase phosphorylant la cofiline
MAL : Magekaryocytic Acute Leukemia, autre nom pour MRTF-A
MAPK : Mitogen-activated protein kinases, qui forment une voie de signalisation activant SRF et ERK1/2
mDia : mammalian Diaphanous, une famille de formines
MEC : Matrice Extra-Cellulaire
MICAL : protéines capables d'oxyder l'actine
MKL : MegaKacyocytic Leukemia, autre nom pour MRTF-A
MRTF : Myocardin-Related Transcription Factor, famille de protéines objet du chapitre 3
MyoD : Facteur de différenciation musculaire N : localisation majoritairement Nucléaire
NES : Nuclear Export Signal, séquence d'acides aminés permettant l'export du noyau vers le cytoplasme
NLS : Nuclear Localisation Signal, séquence d'acides mainés permettent l'import du noyau vers le cytoplasme
NM1 : Nuclear myosin 1
OTT-MAL : version fusionnée de MRTF-A à l'origine de leucémies
PBS : Phosphate buffered saline, solution tampon
PDMS : Polydimethylsiloxane, polymère visqueux pouvant être réticulé en gel
PFA : Paraformaldéhyde, pour la fixation
Pol I/II/III : ARN polymérases
RhoA : Ras homolog gene family, member A, petite GTPase centrale dans l'activation de MRTF-A
ROCK : rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase, phosphorylant la LIMK
RPEL : séquence d'acide aminés permettent de se lier à un ou des monomères d'actine (3 RPEL pour 5 actines)
SiRNA : Small interfering RNA, petits ARN qui permettent d'empêcher la synthèse d'une protéine donnée
SRE : Serum Response Element, promoteur des cibles de SRF
SRF : Serum Response Factor, facteur de transcription
SVF : Serum de Veau Foetal, facteur de croissance
TAD : Transactivation Domain, séquence d'acide amminés d'un facteur de transcription qui peut activer la transcription
T β 4 : Thymosine β 4, protéine séquestrant les monomères d'actine
TCF : Ternary Complex Factors, famille de protéines activant SRF
TGF β : Transforming growth factor β

TNF α : Tumor necrosis factor α
UV : Ultra-Violet
WT : Wild-Type, protéine sauvage

Liste des symboles

- A : préfacteur de la loi de puissance ajustant la fonction de fluage
 a : rayon de la bille
 $\frac{\Delta A}{A}$ Variation d'aire imposée par l'étireur
 α : exposant de la loi de puissance ajustant la fonction de fluage
 \vec{B} : champ magnétique
 d : diamètre de la bille
 E_c : énergie de courbure
 E : module d'Young
 ϵ : déformation relative
 $\dot{\epsilon}$: taux de déformation
 η : viscosité
 $\frac{\eta}{T}$: variation de la viscosité en fonction de la température
 G : module élastique (G' sa partie réelle et G'' sa partie imaginaire)
 γ : conductivité électrique du cuivre
 Γ : fonction gamma
 h : distance entre la bille observée et les parois de la cuve
 \vec{H} : champ d'excitation magnétique
 h_u : épaisseur de la cellule entre la bille et la lamelle
 I, i : intensité du courant électrique
 J : fonction de fluage
 κ : module élastique de courbure
 k_B : constance de Boltzmann
 L : longueur
 l_b : longueur de la bobine
 l_p : longueur de persistance
 \vec{m} : moment magnétique induit dans la bille
 μ_0 : perméabilité magnétique du vide
 n : nombre de spire par mètre de la bobine
 n_c : nombre de couches de fil de la bobine
 ν : coefficient de Poisson
 ω : fréquence de stimulation
 p : facteur géométrique de la fonction de fluage
 R : résistance de la bobine
 $\delta R(t)$: distance entre la position de la bille à l'instant t et sa position à $t = 0$

r_b : rayon de la bobine
 R_e : nombre de Reynold
 r_f : rayon du fil de cuivre
 R_p Rayon du plot de l'étireur
 ρ : masse volumique du fluide
 s : section du fil de cuivre de la bobine ou abscisse curviligne le long d'un filament d'actine
 σ : contrainte
 T : température
 \vec{t} : vecteur tangent à l'abscisse curviligne
 θ : demi-angle d'enfoncement de la bille dans la cellule
 τ : temps de relaxation
 \vec{U} : vitesse du fluide
 V : volume de la bille
 x : coordonnée de la bille selon l'axe X d'application de la force

Table des matières

Introduction et objectifs	21
1 La cellule	25
1.1 Organisation de la cellule eucaryote	26
1.1.1 L'énergie dans la cellule	27
1.1.2 Le noyau	27
1.1.3 La membrane plasmique	30
1.1.4 Cytosquelette	33
1.2 Expression du génome	37
1.2.1 Des gènes aux protéines	37
1.2.2 Régulation de l'expression du génome	39
2 L'actine	43
2.1 Actine G	44
2.1.1 Structure	44
2.1.2 L'actine est une ATPase	45
2.1.3 Localisation et transport	45
2.1.4 Oxydation de l'actine	46
2.1.5 Protéines interagissant avec l'actine G	46
2.2 Actine F	47
2.2.1 Le filament	47
2.2.2 L'équilibre de polymérisation	49
2.2.3 Organisation en réseau de filaments	51
2.3 Rôle mécanique de l'actine : du filament au cytosquelette	54
2.3.1 Mécanique du filament d'actine	54
2.3.2 Mécanique des adhésions focales	57
2.3.3 Mécanique du cytosquelette d'actine	59
2.4 Rôle régulateur de l'actine nucléaire	63
2.4.1 L'actine G nucléaire dans les complexes	64
2.4.2 Les filaments d'actine et la myosine nucléaires	64
3 MRTF-A	67
3.1 MRTF-A, cofacteur de Serum Response Factor	68
3.1.1 Serum Response Factor	68

TABLE DES MATIÈRES

3.1.2	Les cofacteurs de SRF : TCF et MRTF	68
3.2	MRTF-A, indépendamment de SRF	70
	3.2.1 Transition épithélio-mésenchymateuse et domaine SAP	70
	3.2.2 NF- κ B	70
3.3	Structure de MRTF-A	71
	3.3.1 Les motifs RPEL	71
	3.3.2 La région basique et SRF	72
	3.3.3 Leucine zipper et oligomérisation	72
	3.3.4 TAD	73
	3.3.5 Phosphorylation	73
	3.3.6 Isoformes	73
	3.3.7 Conformations	74
3.4	En amont de MRTF-A : voie de signalisation et régulation de l'actine	74
	3.4.1 Actines mutantes	75
	3.4.2 Drogues agissant sur l'actine	75
	3.4.3 Actin-Binding Proteins	76
	3.4.4 La voie RhoA	76
	3.4.5 Un cas particulier : MICAL2	77
3.5	Rôles de MRTF-A	78
	3.5.1 Embryogenèse	78
	3.5.2 Régulation de la masse musculaire	78
	3.5.3 Transition épithéliale-mésenchymateuse	79
	3.5.4 Différenciation des mégacaryocytes	79
	3.5.5 Rythme circadien	79
	3.5.6 MRTF-A et cancers	80
	3.5.7 Réorganisation de la chromatine	80
3.6	Résumé	81
4	De la cellule au muscle	83
4.1	Organisation du muscle squelettique	84
	4.1.1 Du myoblaste au myotube	84
	4.1.2 Une organisation spécifique de l'actine et de la myosine	85
	4.1.3 Rôle de la voie RhoA/MRTF-A/SRF	88
	4.1.4 De la fibre au muscle	89
4.2	La contraction musculaire	91
	4.2.1 Mécanismes moléculaires	91
	4.2.2 Mécanique de la contraction musculaire	93
4.3	Les cellules satellites, MRTF-A et régulation de la masse musculaire	93
5	Rhéologie cellulaire	97
5.1	Rhéologie	98
5.2	Propriétés des réseaux d'actine in vitro	100
5.3	Techniques de rhéologie cellulaire	102
	5.3.1 Les techniques de rhéologie active	103
	5.3.2 Les techniques de rhéologie passive	107

TABLE DES MATIÈRES

5.4	Propriétés rhéologiques de cellules	108
5.4.1	Description	108
5.4.2	Modèles	109
5.5	Autres mesures physiques sur les objets biologiques et mécano-transduction	111
5.5.1	Mesurer les forces générées par les cellules	111
5.5.2	Appliquer des forces pour observer la réponse biologique .	113
6	Méthodes et dispositifs expérimentaux	119
6.1	Culture cellulaire	120
6.1.1	Type cellulaire : les C2C12	120
6.1.2	Les myoblastes primaires	121
6.1.3	Visualiser une protéine dans la cellule : anticorps, marqueurs et protéines fluorescentes	122
6.1.4	Transfections	124
6.1.5	Marquage DAPI sur cellules vivantes	127
6.1.6	Marquage SiRactine sur cellules vivantes	127
6.1.7	Fixation	127
6.1.8	Marquages sur cellules fixées	127
6.2	Pince magnétiques	130
6.2.1	Description	131
6.2.2	Calibration	137
6.2.3	Protocole de mesures mécaniques	141
6.2.4	Dépouillement des vidéos	143
6.2.5	Fonction de fluage	144
6.3	Étirement	147
6.3.1	Description de l'étireur	147
6.3.2	Calibration de l'étireur	149
6.3.3	Le microscope confocal	150
6.3.4	Protocole d'étirement observé en direct	152
6.3.5	Protocole d'étirement fixé	152
6.3.6	Dépouillement des images	155
6.4	Tests statistiques	156
7	Rhéologie locale d'une cellule unique	157
7.1	Évolution de la rigidité de C2C12 sous l'application d'une force .	158
7.1.1	Protocole expérimental	158
7.1.2	Résultats	164
7.2	Rôle des interactions <i>cis</i> des cadhérines dans la formation de contacts intercellulaires	173
8	Changement de localisation de MRTF-A dans les cellules musculaires en réponse à une stimulation mécanique	177
8.1	À propos de la localisation de MRTF-A	178
8.1.1	Influence des moyens d'observation sur l'équilibre entre MRTF-A et l'actine G	179

TABLE DES MATIÈRES

8.2 Application d'une force locale avec les pinces magnétiques	180
8.3 Application d'une déformation globale avec l'étireur : Étude quantitative et dynamique	183
8.3.1 État de référence	184
8.3.2 Effet du rinçage et du montage préalables	185
8.3.3 Résultats pour l'étirement 10%	187
8.3.4 Résultats pour l'étirement 30%	191
8.3.5 Visualisation de l'actine	195
8.3.6 Synthèse des résultats de l'étirement des C2C12 observé en direct	202
8.3.7 Comparaison avec des expériences sur des myoblastes primaires	202
8.4 Application d'une déformation globale avec l'étireur : Étude quantitative sur cellules fixées	205
8.4.1 Résultats pour l'étirement 10% : expulsion de la G-actine hors du noyau	205
8.4.2 Résultats pour l'étirement 30% : une dépolymérisation des filaments d'actine dans le cytoplasme	208
8.5 Synthèse des résultats expérimentaux	209
Conclusions et perspectives	213

Introduction et objectifs

Au moment où s'achève l'écriture de ce manuscrit, se déroule le Tour de France cycliste. En observant les jambes des coureurs, il est parfois difficile de se dire qu'elles sont formées sur la même base que les nôtres. Si l'on peut se douter qu'un champion doit être doté d'une conjonction de caractéristiques génétiques particulières et d'années de travail, il demeure que la plupart d'entre nous, même sans don particulier, peut atteindre des performances sportives étonnantes après un entraînement rigoureux. C'est que notre corps est adaptable, et en particulier nos muscles, qui en réponse à des sollicitations répétées, vont devenir plus forts, plus rapides, plus précis. La musculation constitue l'exemple le plus immédiat et quotidien de la mécanotransduction, cette capacité qu'a notre corps d'interpréter de manière biologique un signal mécanique, et d'y apporter une réponse. Cette capacité se retrouve à toutes les échelles de l'organisme, de l'organe à la cellule qui le compose.

Cette thèse s'intéresse tout particulièrement à ce phénomène de mécanotransduction à l'échelle de la cellule musculaire. Les cellules d'un muscle en exercice sont soumises à des forces extérieures, elles vont y réagir en formant plus de masse musculaire. Ce champ de recherche se place alors naturellement à la rencontre de la physique, qui étudie particulièrement les forces mécaniques, et de la biologie cellulaire.

Le premier chapitre de cette thèse sera consacré à la description rapide de la cellule animale, des éléments qui la composent et de leur fonctionnement.

Les cellules maintiennent leur forme, se déplacent, se divisent grâce à un réseau de filaments appelé cytosquelette. Ce cytosquelette est essentiel dans la réponse des cellules aux forces extérieures, et détermine en grande partie leur réponse mécanique. L'actine est une protéine du cytosquelette, présente en grande quantité dans les cellules musculaires, qui est à la fois un acteur majeur des propriétés rhéologiques de la cellule et de la contraction musculaire. Elle peut former des filaments semi-rigides, dans une structure dynamique toujours en construction et déconstruction, formant un équilibre entre l'actine seule (en monomères) et l'actine incorporée dans les filaments. Le deuxième chapitre sera consacré à la description de l'actine et des structures qu'elle forme dans la cellule.

À l'aide d'études sur des souris, l'équipe d'Athanassia Sotiropoulos a mis en évidence le rôle d'une voie de signalisation dans l'hypertrophie et l'atrophie des muscles en réponse à une contrainte mécanique. Le facteur de transcription Serum Response Factor, qui contrôle les gènes du cytosquelette et de la

différenciation musculaire, et son cofacteur Myocardin-Related Transcription Factor, sont les deux acteurs centraux de ce phénomène. Or il a déjà été montré que MRTF-A est régulée par l'actine. Ensemble ces deux protéines font le pont entre la sensibilité mécanique de la cellule, au niveau du cytosquelette d'actine, et l'activation des gènes par SRF. Le troisième chapitre de cette thèse expliquera en détail le rôle de MRTF-A, et la manière dont cette protéine interagit avec l'actine pour induire une réponse génétique à un stimulus mécanique.

Dans les cellules musculaires, l'actine est organisée d'une manière extrêmement spécifique, pour permettre la contraction musculaire. Cette organisation sera décrite dans le chapitre 4.

Enfin, le chapitre 5 sera consacré aux propriétés mécaniques des cellules et du cytosquelette d'actine. Il décrira les outils que les physiciens ont élaborés pour exercer et mesurer des forces à des échelles cellulaire et sub-cellulaire, et les lois mécaniques mises en évidence par ces mesures.

Ces cinq premiers chapitres dessinent tout le chemin qui se trouve entre le signal mécanique que va sentir la cellule, et la réponse génétique qu'elle va y apporter : une contrainte mécanique peut être à l'origine d'une réorganisation du cytosquelette d'actine, les modifications de ce dernier vont réguler MRTF-A, qui va à son tour contrôler le facteur de transcription SRF, et déclencher l'expression d'un programme génétique. Plus particulièrement, MRTF-A doit être dans le noyau de la cellule pour pouvoir activer le programme génétique avec SRF. Or la localisation de MRTF-A dans la cellule est régulée par la quantité de monomères d'actine disponible. Lorsqu'il y a une grande quantité de monomères, ceux-ci se lient à MRTF-A et l'empêchent d'aller dans le noyau. Au contraire, lorsque les monomères viennent à manquer, MRTF-A peut être importée dans le noyau et y interagir avec SRF.

L'équipe dans laquelle j'étais en thèse avait déjà constaté auparavant que l'application de contraintes mécaniques répétées sur une cellule musculaire induit une polymérisation du cytosquelette d'actine. Cela, associé aux résultats de l'équipe de l'Institut Cochin, conduit à formuler l'hypothèse suivante : lorsque les cellules musculaires sont soumises à des forces extérieures, leur cytosquelette d'actine se renforce en polymérisant, cette polymérisation d'actine conduit à un manque de monomères pour se lier à MRTF-A, qui est alors libre d'aller dans le noyau se lier à SRF, pour activer le programme génétique de développement musculaire.

L'objectif de ce travail est d'étudier comment les signaux mécaniques vont réguler MRTF-A à travers les modifications du cytosquelette d'actine. Pour cela, la première étape a été de construire des outils nous permettant d'exercer des contraintes mécaniques à l'échelle de la cellule unique, et de mesurer leur réponse mécanique et biologique. Les pinces magnétiques ont permis de caractériser la rhéologie des cellules musculaires, et d'observer la réponse biologique de MRTF-A. L'étireur de cellules a permis d'étudier de manière systématique sur une grande population de cellules la réponse du système à des déformations imposées. Les techniques de microscopie de fluorescence ont été utilisées pour visualiser les deux protéines, actine et MRTF-A, à l'intérieur de la cellule. Toutes ces méthodes expérimentales sont décrites en détail dans le chapitre 6.

Introduction et objectifs

À l'aide de ces outils, nous avons pu caractériser les propriétés mécaniques de myoblastes, qui seront présentées au chapitre 7.

Enfin, au chapitre 8, nous montrerons que l'application de contraintes mécaniques peut induire une polymérisation ou une dépolymérisation du cytosquelette d'actine, conduisant à des changements de localisation de MRTF-A dans les cellules. Nous verrons également que la localisation de MRTF-A dans la cellule est extrêmement sensible à l'équilibre entre les filaments et les monomères d'actine.

Chapitre 1

La cellule



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

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

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

Chez les eucaryotes comme chez les procaryotes, il existe des organismes vivants pouvant être composés d'une ou de plusieurs cellules (GROSBERG et STRATHMANN, 2007). Les plus grands organismes, comme les plantes ou les animaux, peuvent être composés d'un très grand nombre de cellules (de l'ordre de 10^{14}) qui possèdent le même génome mais ont des phénotypes très divers.

1.1 Organisation de la cellule eucaryote

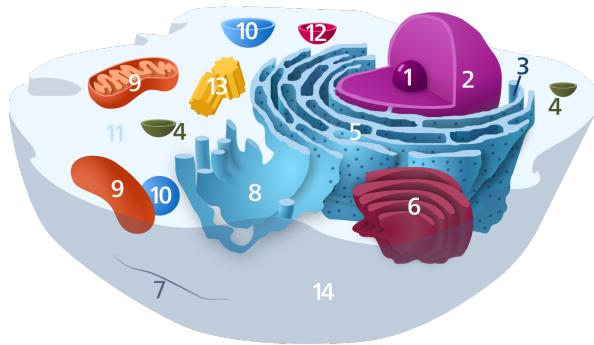


FIGURE 1.1 – La cellule eucaryote. 1. Nucléole 2. Noyau 3. Ribosome 4. Vésicule 5. Réticulum endoplasmique rugueux 6. Appareil de Golgi 7. Cytosquelette 8. Réticulum endoplasmique lisse 9. Mitochondrie 10. Vacuole (cellule végétale uniquement) 11. Cytosol 12. Lysosome 13. Centrosome 14. Membrane Plasmique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

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

en libérant de l'énergie. Les mitochondries seraient d'anciennes bactéries devenues symbiotiques des cellules eucaryotes, elles possèdent leur propre ADN.

1.1.1 L'énergie dans la cellule

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

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

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

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

La cellule animale reçoit principalement son énergie sous forme de glucose par la circulation sanguine. Ce glucose est alors dégradé d'abord dans le cytoplasme, puis en présence de dioxygène dans la mitochondrie. Une molécule de glucose permet d'obtenir une trentaine d'ATP. Lorsque le dioxygène vient à manquer, par exemple lors d'efforts musculaires intenses, la fermentation permet de produire de l'énergie à partir du glucose en produisant de l'acide lactique.

1.1.2 Le noyau

Le noyau est l'organite contenant le matériel génétique de la cellule sous la forme d'ADN (à l'exception de l'ADN mitochondrial). Cependant, bien d'autres molécules que l'ADN sont présentes dans le noyau, et il s'y passe d'autres choses que la transcription ou la duplication de l'ADN.

ADN

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

Le génome des êtres vivants comporte typiquement du million au milliard de paires de base d'ADN. La distance entre deux bases est de 0,34nm. Chez

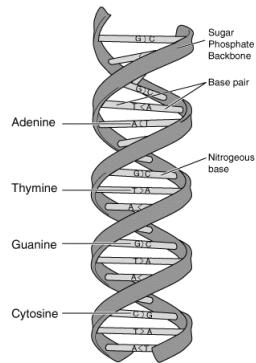


FIGURE 1.2 – Schéma de la structure de l'ADN, par Messer Woland CC-BY-SA-2.5

l'homme, on compte environ 3,2 milliards de paires de bases, ce qui correspond à une longueur d'ADN de l'ordre du mètre, qui doit être stockée dans le noyau cellulaire d'un diamètre de 5 à 7 microns. On conçoit alors qu'une organisation spécifique de l'ADN dans le noyau soit nécessaire pour faire tenir une molécule aussi grande dans un compartiment aussi étroit.

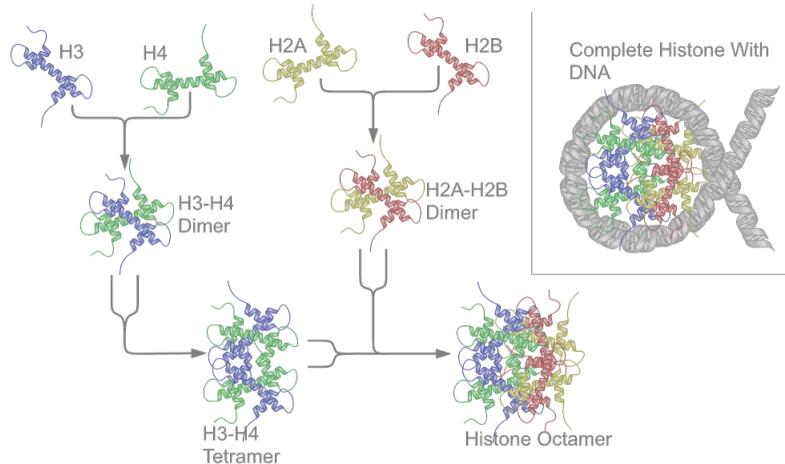


FIGURE 1.3 – Enroulement de l'ADN autour d'un complexe d'histones, illustré par Richard Wheeler (CC BY-SA 3.0). Les histones 2A (en jaune) et 2B (en rouge) forment ensemble un dimère, et deux dimères forment un tétramère. Il en est de même pour les histones 3 (en bleu) et 4 (en vert). Un tétramère d'histones 2A/2B et un tétramère d'histones 3/4 s'associent ensemble pour former un octamère complet, qui est donc formé de deux histones de chacun des quatre types, autour duquel l'ADN peut s'enrouler.

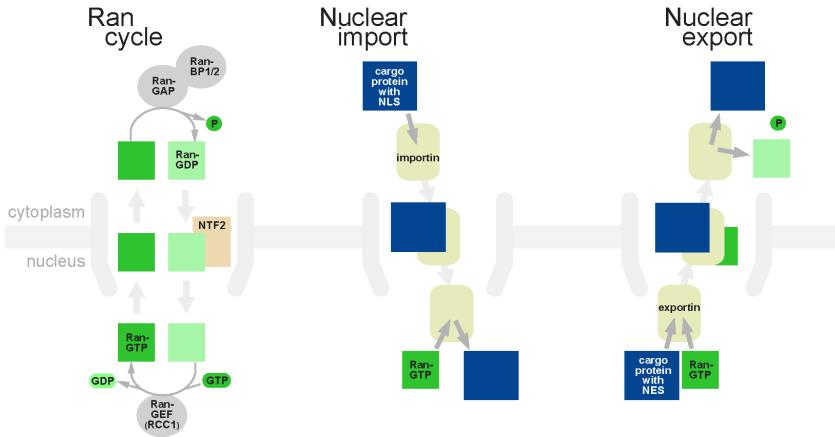


FIGURE 1.4 – Schéma du transport nucléo-cytoplasmique par les karyophérines. Les importines reconnaissent la séquence NLS sur la protéine à transporter (le cargo) et passent avec elle le pore nucléaire. À l'arrivée, la RanGTP permet de libérer le cargo. Les exportines reconnaissent la séquence NES et s'associent à une RanGTP dans le noyau. Puis elles font passer avec elles le cargo vers le cytoplasme, où le cargo et la RanGTP hydrolysée sont libérées. RanGTP est la GTPase qui fournit l'énergie à ce système d'import actif.

L'ADN est enroulé autour de protéines appelées histones comme du fil autour d'une bobine, formant une structure appelée nucléosome, comme représenté sur la figure 1.3. Ces nucléosomes empilés forment une structure bien plus compacte que l'ADN libre, appelée la chromatine. Certains acides aminés qui composent les histones peuvent subir des réactions chimiques comme l'acétylation ou la méthylation, qui ont un rôle dans la régulation de la transcription du génome. L'acétylation des histones peut changer l'état de la chromatine : l'hétérochromatine est la forme compacte où l'ADN ne peut pas être transcrit, l'euchromatine est la forme plus étendue dans laquelle l'ADN est accessible pour la transcription.

Transport nucléo-cytoplasmique

Le noyau est séparé du reste du cytoplasme par une membrane formée de deux bicouches lipidiques, dont une illustration détaillée est visible plus loin en figure 1.8. Elle contient des complexes de protéines qui servent de portes d'entrée et de sortie et qui sont appelées pores nucléaires. Les protéines de taille inférieure à 40 kDa peuvent passer par diffusion passive par les pores nucléaires.

Les protéines de plus grande taille doivent faire appel à des transporteurs spécifiques pour aller d'un côté de la membrane à l'autre (illustration en figure 1.4). Les importines se lient à la protéine à importer au niveau d'une zone appelée « Signal de Localisation Nucléaire » (NLS). L'importine interagit avec le pore nucléaire et le couple importine-cargo va ainsi passer à travers le pore nu-

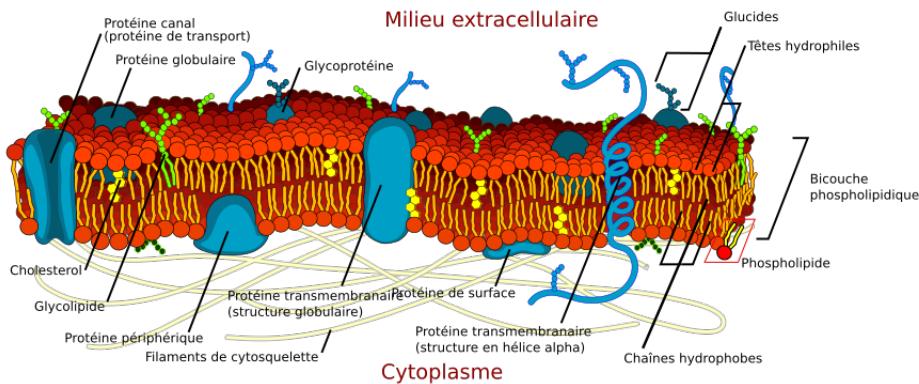


FIGURE 1.5 – Schéma de la membrane plasmique

cléaire. Une fois dans le noyau, l'importine va se lier à la RanGTP et se dissocier du cargo, qui est libéré dans le nucléoplasme. L'importine est alors à nouveau exportée du noyau et la GTP hydrolysée en GDP. De même, une protéine possédant une séquence d'export nucléaire (NES) sera liée à une exportine-GTP, et le couple pourra passer vers le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, la GTP est hydrolysée en GDP et le cargo relargué. L'exportine revient dans le noyau par diffusion.

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

1.1.3 La membrane plasmique

La membrane plasmique sépare le milieu intérieur de la cellule de l'extérieur. Elle est composée d'une bicoche de phospholipides amphiphiles dans laquelle sont enchâssées des protéines transmembranaires qui permettent de réguler les échanges avec le milieu (figure 1.5).

Transport transmembranaire

La membrane permet de réguler le passage de molécules d'un côté à l'autre de manière active ou passive. Il existe une très grande variété de transporteurs d'espèces chimiques à travers la membrane.

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

Les ions comme le calcium, le potassium ou le magnésium sont transportés par des canaux spécifiques. Le mouvement des ions permet de polariser la membrane et de faire passer un signal électrique et est essentiel dans le fonc-

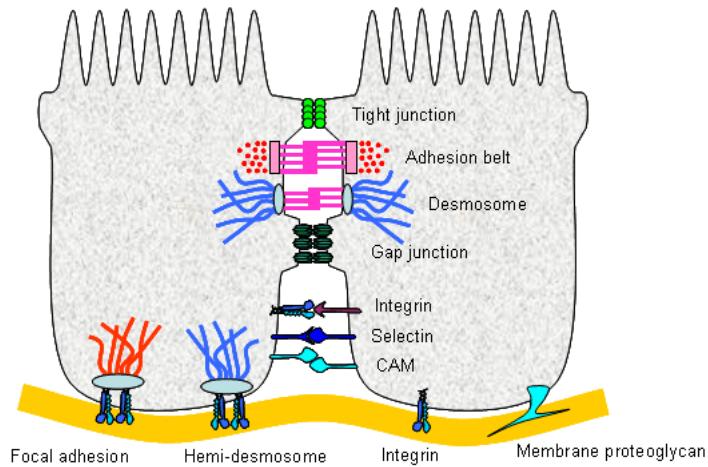


FIGURE 1.6 – Schéma résumant les différents types de jonctions cellule-cellule ou cellule-matrice.

tionnement du système nerveux et dans la contraction musculaire. Des canaux spécialisés, les aquaporines, laissent passer l'eau pour moduler la pression osmotique.

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

Signalisation

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

Adhésion

La plupart des cellules font partie d'un tissu et adhèrent à d'autres cellules voisines et aux protéines de la matrice extra-cellulaire par l'intermédiaire de protéines transmembranaires. Les différents types de jonctions avec les autres cellules et avec la matrice extra-cellulaire sont illustrées sur la figure 1.6

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

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

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

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

Les cadhérines forment une famille de protéines exprimées partout dans l'organisme à tous les stades de son développement. Il existe une trentaine de gènes de cadhérines, et encore plus de protéines exprimées grâce à l'épissage. Ces différentes protéines sont spécifiques selon le type cellulaire. Les cadhérines de deux cellules voisines peuvent interagir par leur domaine extra-cellulaire pour former une jonction (interaction trans). Les cadhérines peuvent également interagir par leur domaine transmembranaire entre cadhérine d'une même membrane et former des amas (interaction cis)(voir l'article en annexe). Les cadhérines permettent de maintenir l'intégrité mécanique d'un tissu de cellules en connectant les cytosquelettes de cellules voisines entre eux. Les cadhérines desmosomales lient les réseaux de filaments intermédiaires, alors que les cadhérines classiques lient les réseaux d'actine (cet aspect sera développé dans le chapitre sur l'actine).

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

du déclenchement de voies de signalisation en réponse aux signaux reçus par les intégrines.

1.1.4 Cytosquelette

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

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

Microtubules

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

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

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

Les microtubules jouent un rôle prépondérant lors de la mitose. Ils s'assemblent en un fuseau au bout duquel se trouve les centrosomes. Au centre

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

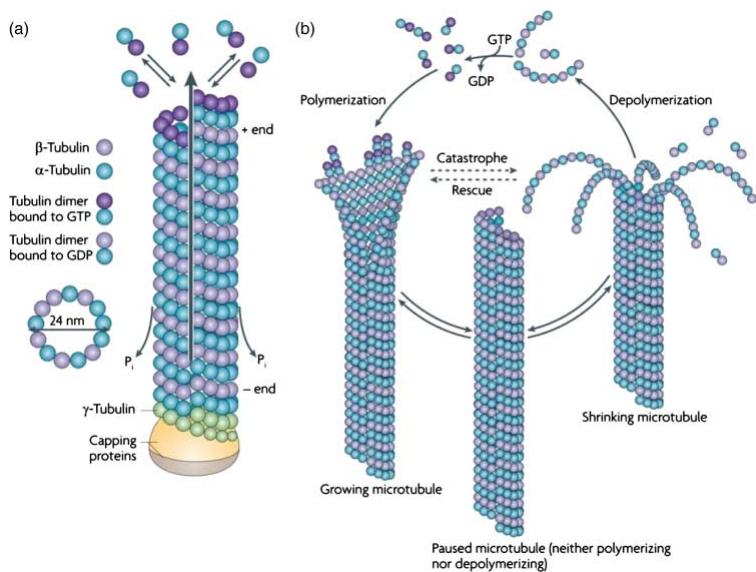


FIGURE 1.7 – Construction et destruction des microtubules, d'après HUBER et al., 2013.

s'alignent les paires de chromosomes, qui sont séparés et emmenés vers les centrosomes. La plupart des drogues perturbant les microtubules bloquent la mitose et sont utilisées pour cette raison dans les traitements anti-cancéreux.

Par ailleurs, les flagelles et les cils, par exemple le flagelle du spermatozoïde, sont composés d'un faisceau de microtubules animé par les moteurs moléculaires.

Filaments intermédiaires

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

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

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

Les plus connus des filaments intermédiaires sont sans doute les kératines, exprimées dans les cellules épithéliales et qui sont le constituant principal des

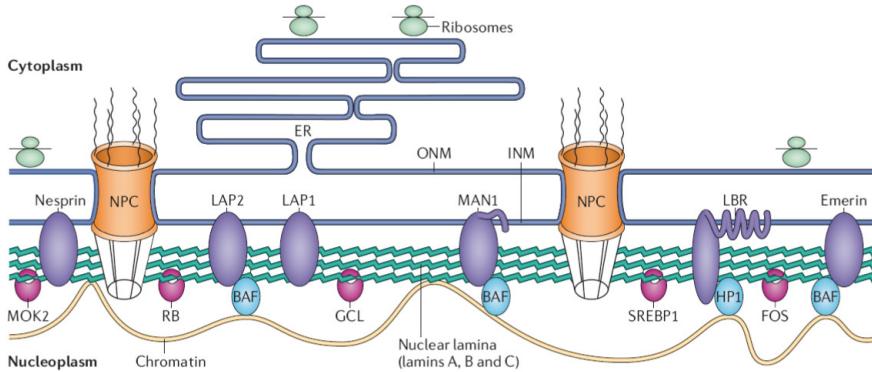


FIGURE 1.8 – Les lamines (filaments verts) soutiennent l’organisation de la membrane nucléaire (en bleu : ONM Outer Nuclear Membrane, INM Inner Nuclear Membrane). Des protéines comme l’émerine ou la nesprine (ovales violets) sont enchaînées dans l’INM et dans le réseau de lamines, tout comme les pores nucléaires : (NPC Nuclear Pore Complex) qui permettent le trafic nucléocytoplasmique. La membrane nucléaire extérieure se replie pour former le Reticulum Endoplasmique (ER), siège de la traduction de l’ARN en protéine par les ribosomes (en vert). Le réseau de lamines est également relié à la chromatine à l’intérieur du noyau. . Illustration par COUTINHO, FALCÃO-SILVA, GONÇALVES et da NÓBREGA, 2009

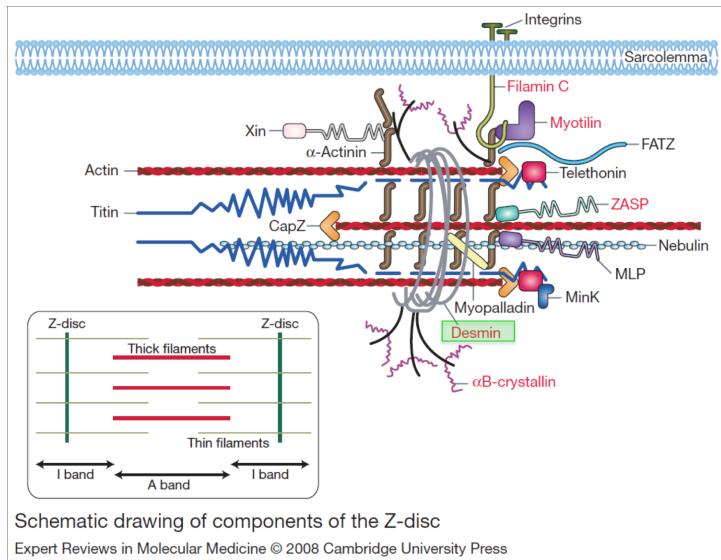
poils et des ongles des mammifères (la kératine des reptiles et des oiseaux ne présente pas d’homologie avec celle des mammifères).

La vimentine est exprimée dans toutes les cellules d’origine mésenchymateuse. Elle joue un rôle dans la localisation des vésicules bien que ne participant pas directement à leur transport, puisqu’on ne connaît pas de moteur moléculaire associé aux filaments intermédiaires (STYERS, KOWALCZYK & FAUNDEZ, 2005). Elle est également impliquée dans la régulation de l’adhésion et de la migration cellulaire (LYNCH, LAZAR, ISKRATSCH, ZHANG et SHEETZ, 2013, HELFAND et al., 2011). L’expression de vimentine est souvent un marqueur de la transition épithélio-mésenchymateuse.

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

Les lamines

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



Schematic drawing of components of the Z-disc

Expert Reviews in Molecular Medicine © 2008 Cambridge University Press

FIGURE 1.9 – Schéma de l'organisation d'un sarcomère. On peut voir les filaments de desmine (en gris) s'enrouler autour de la structure formée par les filaments d'actine (en rouge) au niveau du disque Z. Toute cette structure est décrite en détail au chapitre 4.

Les lamines forment un réseau soutenant la membrane nucléaire interne, dans laquelle sont ancrés les pores nucléaires (figure 1.8). Par l'intermédiaire de protéines comme la nesprine, le réseau laminaire est couplé mécaniquement au cytosquelette d'actine de la cellule et il est couplé à l'actine nucléaire par l'émerine, protéine qui coiffe la pointe des filaments d'actine et augmente leur polymérisation. Le réseau de lamines est nécessaire au maintien de l'intégrité du noyau et définit ses propriétés mécaniques. Les lamines organisent également la chromatine à l'intérieur du noyau et contribuent à réguler l'expression du génome (DECHAT et al., 2008).

La progeria est liée à des mutations sur le gène de la lamine A et le syndrome de dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss à des mutations de l'émerine.

Filaments intermédiaires dans les cellules musculaires

Quatre types de filaments intermédiaires sont exprimés dans la cellule musculaire : la desmine, la vimentine, la lamine et la synésine. La desmine et la vimentine ont des structures suffisamment proches pour pouvoir former des hétéro-dimères et s'associer dans des filaments. La synésine ne peut former que des hétéro-dimères avec les autres filaments intermédiaires.

La desmine, la vimentine et la synésine ont un rôle dans l'organisation des fibres musculaires qui sera développé dans le chapitre consacré au muscle.

Actine

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

Toutes les cellules eucaryotes expriment des actines, qui sont hautement conservées de la levure jusqu'à l'humain. Ce sont également des protéines très exprimées, et l'actine peut représenter jusqu'à 15% de la masse de protéines dans une cellule (ALBERTS et al., 2002).

La membrane plasmique est une bicouche lipide qui a de faibles modules élastiques. Un réseau dense et très branché d'actine forme une couche rigide sous la membrane et confère sa forme à la cellule : le cortex d'actine. Ses propriétés sont essentielles dans les déformations des cellules et dans leur interaction avec un substrat. Dans le volume de la cellule, l'actine forme un réseau moins dense. *In vitro* on peut observer des faisceaux de filaments appelés fibres de stress. Dans le muscle, l'actine et ses moteurs associés (les myosines) forment une organisation spécialisée responsable de la contraction musculaire, appelée sarcomère, qui sera décrite dans le chapitre dédié au muscle.

L'actine interagit avec un très grand nombre de protéines, ce qui confère au réseau un caractère particulièrement dynamique. L'actine n'est pas limitée à un rôle mécanique, elle a également des rôles de régulation de l'expression du génome et d'organisation de l'ADN.

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

1.2 Expression du génome

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

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

1.2.1 Des gènes aux protéines

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

La transcription

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

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

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

La maturation de l'ARN

Après sa transcription, l'ARN subit plusieurs transformations. Des éléments sont ajoutés à ses deux extrémités, pour assurer sa stabilité et sa reconnaissance par les ribosomes. L'ARN transcrit comprend deux types de séquences, les introns et les exons. Seuls les exons contiennent l'information des acides aminés pour coder la protéine. L'ARN va subir une étape d'épissage : les introns sont retirés de l'ARN jusqu'à ce qu'il ne reste que l'enchaînement des exons. Lors de cette étape, tous les exons peuvent être rassemblés, ou seulement une partie d'entre eux. Les protéines synthétisées par ces reconstitutions différentes seront différentes : on parle d'épissage alternatif. Un même gène peut donc coder pour des protéines différentes grâce au jeu de l'épissage. Par exemple, il existe chez la drosophile un unique gène qui peut coder pour plus de 38 000 protéines différentes (SCHMUCKER et al., 2000), ce qui est du même ordre de grandeur que le nombre total de gènes dans le génome de la drosophile.

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

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

Une des techniques utilisées pour supprimer l'expression d'un gène est de bloquer l'ARNm produit par la transcription de ce gène avec un ARN qui va le compléter paire à paire pour former un double brin (siRNA). Cela empêche alors sa traduction en protéine.

La traduction

Le code génétique est la correspondance entre des triplets de nucléotides, les codons, et les acides aminés qui composent les protéines.

La traduction commence au codon start le plus proche du début de l'ARN messager. La plupart du temps, chez les eucaryotes, il s'agit d'un triplet AUG, codant pour une Méthionine, cependant on découvre de plus en plus de séquences qui commencent avec un codon start alternatif. C'est le cas par exemple de la protéine Myocardin-Related Transcription Factor A, qui a deux variants d'épissage, l'un débutant par un codon GTG (Valine) (SCHARENBERG et al., 2014).

Le travail de traduction est assuré par le ribosome, un assemblage complexe de protéines et d'ARN et par des ARN de transfert. Les ARN de transferts sont l'assemblage d'un ARN replié en croix et d'un acide aminé. À une extrémité, l'ARN présente un triplet anti-codon, le complémentaire d'un codon du code génétique. À l'autre se trouve l'acide-aminoé correspondant à ce codon.

Au début de la traduction, le ribosome se fixe sur le codon start, puis, il va chercher un ARN de transfert dont le triplet anti-codon correspond au premier triplet sur la séquence à traduire. Comme quelqu'un qui teste différentes clés pour ouvrir une serrure, le ribosome va chercher l'ARN de transfert qui lui permet de faire correspondre un acide aminé à un codon. Lorsqu'il l'a trouvé, il attache l'acide aminé au précédent de la séquence, et ainsi de suite jusqu'à arriver à un codon stop.

On parle souvent *du* code génétique, car il est commun à un grand nombre d'êtres vivants, mais il en existe des variantes apparues au cours de l'évolution. En particulier, dans les cellules eucaryotes, l'ADN des mitochondries utilise un autre code génétique que celui de l'ADN de la cellule elle-même.

Modifications post-traductionnelles

Les protéines commencent à se replier dès le début de leur synthèse par le ribosome. Mais certaines requièrent l'aide d'autres protéines, appelées chaperons, pour arriver au repliement correct. D'autres encore nécessitent des modifications chimiques après la traduction.

Tous les acides aminés peuvent faire l'objet de modifications post-traductionnelles. La plus connue est sans doute la phosphorylation, ajout d'un groupe phosphate à un acide aminé par des enzymes, les kinases. La phosphorylation joue le rôle de bouton on/off pour un grand nombre de protéines dans des voies de signalisation. Ce sera le cas des voies de signalisation qui seront présentées au chapitre 3, faisant intervenir les kinases ROCK, LIMK ou ERK1/2. Autre exemple de modification, l'oxydation de l'actine sera également évoquée au chapitre 2.

1.2.2 Régulation de l'expression du génome

Réorganisation de la chromatine

L'ADN est stocké dans la cellule sous une forme condensée, la chromatine. Selon leur état biochimique (acétylation, méthylation) les histones forment un enroulement plus ou moins compact de l'ADN. Par exemple, chez les femelles mammifères, l'un des deux chromosomes X est désactivé afin de ne pas avoir

deux fois plus de transcription des gènes portés par ce chromosome qu'un organisme mâle. Il est condensé définitivement sous forme d'hétérochromatine.

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

Les facteurs de transcription

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

Un facteur de transcription reconnaît une séquence spécifique sur l'ADN en amont du gène régulé, le promoteur. Les promoteurs en amont d'un gène vont déterminer quels facteurs de transcription vont être capables d'activer la transcription. Des gènes partageant le même promoteur vont être activés par les mêmes facteurs de transcription et répondre aux mêmes stimuli.

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

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

Les facteurs de transcriptions se lient directement à l'ADN, ils doivent donc être présents dans le noyau pour accomplir leur fonction. Certains facteurs de transcriptions sont ainsi régulés par leur localisation : lorsqu'ils sont confinés hors du noyau, ils ne peuvent pas être actifs. C'est le cas du récepteur des œstrogènes, qui est présent dans le cytoplasme en l'absence d'hormones et va être transporté dans le noyau lorsqu'il sera lié aux œstrogènes.

Un facteur de transcription peut recruter d'autres protéines, comme des coactivateurs (ou des corépresseurs) qui vont amplifier (ou diminuer) l'activation de la transcription. Ces cofacteurs peuvent alors eux-mêmes réguler l'activité transcriptionnelle par leur activité (en particulier leur état de phosphorylation) ou par leur localisation. C'est le cas du mécanisme de régulation de Serum Response Factor, qui sera détaillé dans le chapitre 3.

Un facteur de transcription peut également recruter des protéines qui vont changer localement l'état de compacité de la chromatine, afin de rendre le gène

plus facilement ou plus difficilement accessible.

Chapitre 2

L'actine



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

Elle se présente dans la cellule sous deux formes principales : en monomères (actine G pour globulaire) ou en filaments (actine F). Elle interagit avec un grand nombre de protéines appelées Actin-Binding Proteins.

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

Mais l'actine est également un composant des trois ARN Polymérases PolI, PolII et PolIII, qui transcrivent l'ADN en ARN pendant la première étape de l'expression du génome (YE, ZHAO, HOFFMANN-ROHRER et GRUMMT, 2008, W. A. HOFMANN et al., 2004 HU, 2004). Elle est indispensable à la réorganisation de la chromatine qui précède l'expression (revue par FARRANTS, 2008) mais aussi à l'export de l'ARN (W. HOFMANN et al., 2001).

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

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

2.1 Actine G

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

La protéine transcrit a un poids moléculaire de 42 kDa, et est produite en grande quantité dans les cellules, où elle pèse environ pour 1 à 5 % de la masse protéique, mais cela peut aller jusqu'à 15% de la masse d'une cellule musculaire.

2.1.1 Structure

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

Elle est composée de 4 sous-domaines organisés en deux lobes (figure 2.1). Les sous-domaines 2 et 4 forment l'extrémité – du filament, les sous-domaines 1 et 3 forment l'extrémité +. Entre les deux lobes se trouve le site de liaison à l'ATP. À côté de ce site se trouve une zone d'interaction avec les cations divalents (Ca^{2+} ou Mg^{2+}).

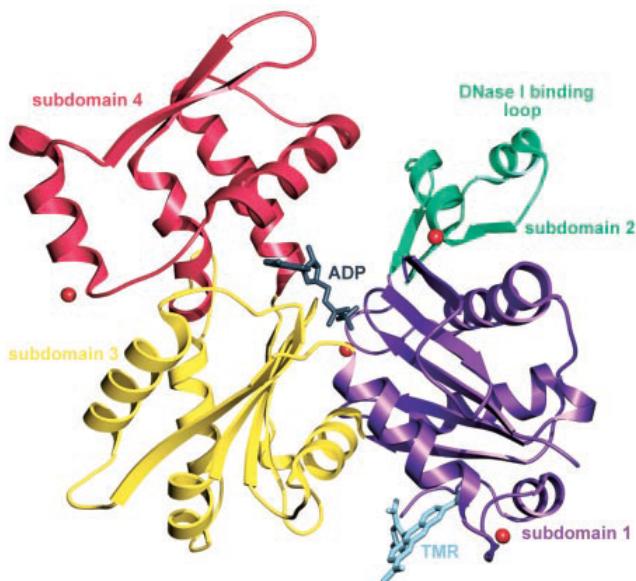


FIGURE 2.1 – Monomère d'actine ADP, d'après OTTERBEIN, 2001

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

2.1.2 L'actine est une ATPase

L'actine, après sa fabrication, n'est prête à jouer son rôle qu'avec l'ajout d'une ATP au centre de sa structure. En plus de ses deux formes, globulaire ou filamenteuse, l'actine est capable d'hydrolyser l'ATP en ADP.

Les deux formes d'actine, ATP et ADP sont capables de former des filaments et de s'incorporer à des filaments.

2.1.3 Localisation et transport

L'actine a longtemps été étudiée pour son rôle dans le cytoplasme, en tant que composant du cytosquelette. Cependant de l'actine est également présente dans le noyau de la cellule, où elle a des rôles essentiels. L'actine peut polymériser dans les deux compartiments (MCDONALD, 2006, BAARLINK, WANG et GROSSE, 2013), bien que l'on ne trouve pas de grands filaments organisés dans le noyau.

L'actine est à une taille intermédiaire pour les pores nucléaires : elle n'est pas tout à fait assez petite pour diffuser facilement à travers. Elle est donc

transportée activement entre le noyau et le cytoplasme. Son import nécessite la liaison à la cofilin, et est médiée par l'importine 9 (DOPIE, SKARP, RAJAKYLÄ, TANHUAÑPÄÄ et VARTIAINEN, 2012). Son export nécessite la profilin et est médiée par l'exportine 6 (DOPIE et al., 2012).

2.1.4 Oxydation de l'actine

Les protéines MICAL sont capables d'ajouter deux atomes d'oxygène sur la Méthionine qui se trouve en 44e position de la chaîne d'acides aminés de l'actine. Cet acide aminé est au centre d'une zone de la protéine qui relie les monomères dans un filament. L'oxydation spécifique de cet acide aminé déstabilise les filaments et l'actine oxydée est incapable de se lier à d'autres actines pour former de nouveaux filaments (HUNG, PAK et TERMAN, 2011).

2.1.5 Protéines interagissant avec l'actine G

La profilin est une petite protéine (autour de 15kDa) qui peut se lier à l'extrémité + de l'actine G, l'empêchant de former un nouveau filament ou de se lier à l'extrémité - d'un filament existant. Bien qu'elle se lie au monomère, son action est globalement favorable à la croissance des filaments (POLLARD et COOPER, 1984). La profilin facilite le remplacement d'une ADP par une ATP dans le monomère auquel elle est attachée. Or l'actine ATP polymérisé mieux que l'actine ADP, l'action de la profilin va donc recycler l'actine ADP dépolymérisée des anciens filaments en actine ATP prête à allonger de nouveaux filaments. De plus, les élongateurs de filaments comme les formines et VASP vont préférentiellement utiliser de l'actine liée à la profilin pour faire croître les filaments (FERRON, REBOWSKI, LEE et DOMINGUEZ, 2007, ROMERO et al., 2004). La profilin joue également un rôle dans la localisation de l'actine : l'exportine 6 va se lier spécifiquement au complexe actine-profilin et le faire passer de l'intérieur vers l'extérieur du noyau (DOPIE et al., 2012).

Les thymosines β 4 sont de toutes petites protéines d'environ 5kDa dont le rôle principal est de maintenir un réservoir d'actine monomérique (SAFER, GOLLA & NACHMIAS, 1990). Elles se lient principalement aux actines ATP et les empêchent de polymériser.

Les CAP (Adenylate Cyclase Associated Protein) sont également des catalyseurs de l'échange d'un ADP contre un ATP dans les monomères d'actine (MAKKONEN, BERTLING, CHEBOTAREVA, BAUM et LAPPALAINEN, 2013).

Les cofilines sont une famille de petites protéines qui lient à l'actine G et à l'actine F. Elles ont une préférence pour l'actine ADP. Le complexe cofiline-actine est plus facilement recruté par les CAP, qui vont dissocier le complexe et remplacer l'ADP par une ATP sur l'actine. Les cofilines sont suffisamment petites pour passer par les pores nucléaires par diffusion, elles sont cependant dotées d'un signal de localisation nucléaire. Cela leur permet d'être importées dans le noyau lorsqu'elles sont liées à d'autres protéines plus massives. Ainsi, le complexe cofiline-actine est importé dans le noyau par l'importine 9 (DOPIE et al., 2012).

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

Les Myocardin-Related Transcription Factors sont des cofacteurs de transcriptions qui peuvent former un complexes avec trois ou cinq monomères d'actine (Stephane MOUILERON, GUETTLER, LANGER, TREISMAN et McDONALD, 2008). Leur rôle n'est pas de réguler l'équilibre dynamique de l'actine mais d'agir comme un détecteur de la concentration de monomères d'actine disponibles. En fonction de l'état de polymérisation du cytosquelette, les MRTF vont réguler l'activité de Serum Response Factor, un facteur de transcription contrôlant les gènes de l'actine et d'un grand nombre d'ABP qui régulent sa dynamique. Les MRTF sont un maillon d'une boucle de rétro-action qui contrôle la dynamique de l'actine à long terme par l'expression des gènes (SALVANY, MULLER, GUCCIONE et RORTH, 2014). Les mécanismes détaillés de ce contrôle et ses conséquences seront décrits dans le chapitre 3.

2.2 Actine F

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

2.2.1 Le filament

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

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

L'actine ATP est plus facilement polymérisée alors que l'actine ADP est plus facilement dépolymérisée. Les actines ATP incorporées dans un filament sont ensuite hydrolysées, et deviennent donc plus facilement dépolymérisables. Les deux bouts du filament ont alors des affinités différentes pour les monomères. En présence d'une grande quantité de monomères disponibles, le filament peut croître par les deux bouts, mais dans une concentration intermédiaire, le filament va croître par ajout de monomères à son extrémité + et décroître par dépolymérisation à l'extrémité –. L'équilibre entre les deux cinétiques de réaction détermine si la taille du filament croît ou non.

Cet équilibre est connu comme le « tapis roulant » de l'actine : lorsque les deux cinétiques sont égales, le filament avance par remplacement des monomères

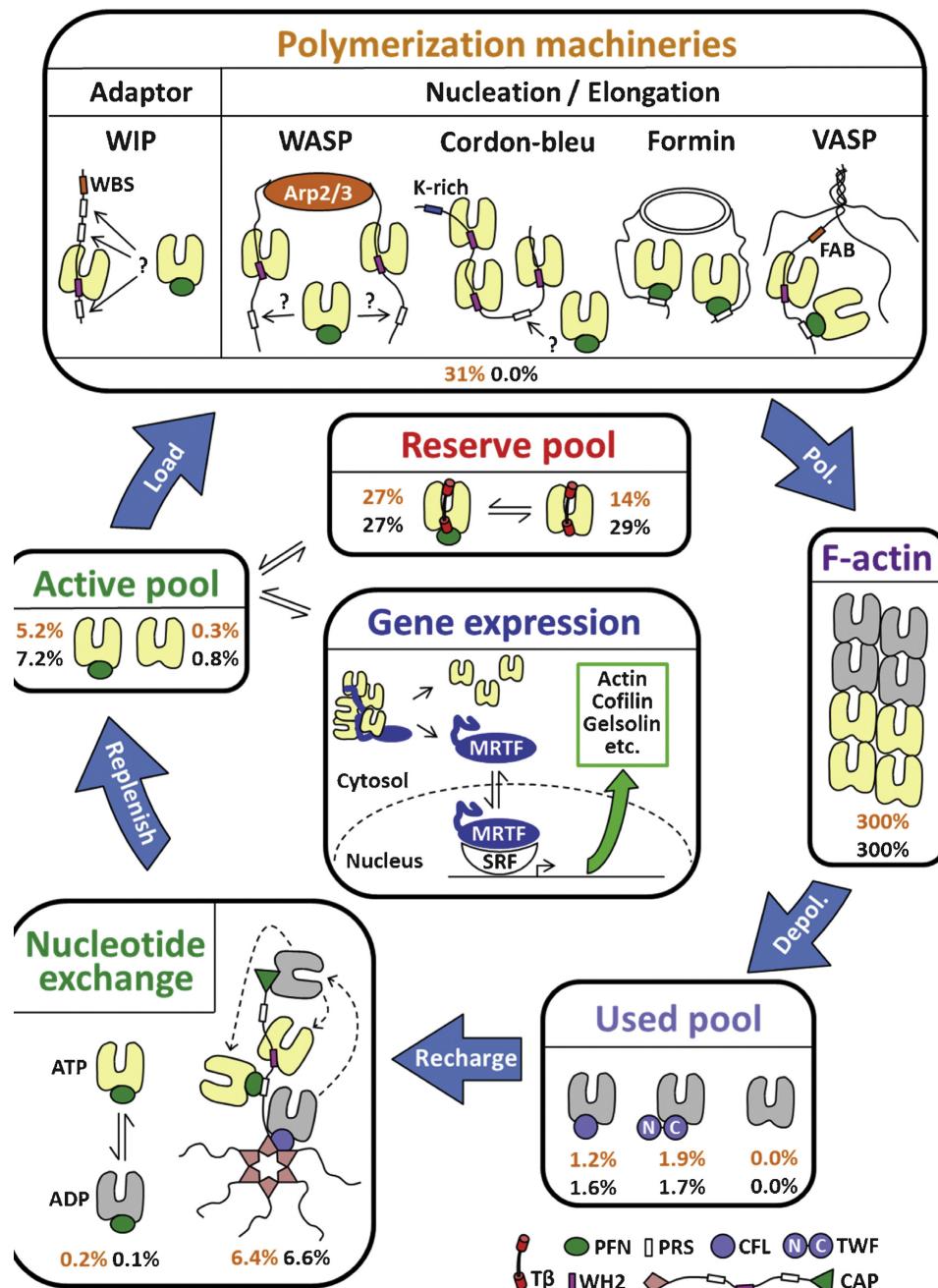


FIGURE 2.2 – Cycle de polymérisation et dépolymérisation de l'actine dans la cellule sous l'effet des différentes protéines liées à l'actine, d'après la revue de XUE et ROBINSON, 2013. PFN : profiline, PRS : proline rich sequence, CFL : cofiline, TWF : twinfiline, WH2 : Wiskott-Aldrich syndrome homology region 2, T β : thymosine β . Les pourcentages en orange représentent la proportion de monomères d'actine associé avec chacune des Actin Binding Proteins (avec 100% de monomères et 3 fois plus d'actine dans les filaments). Les proportions en noir représente la part d'actine monomérique associée avec les différentes protéines à l'exclusion des protéines ayant des domaines WH2.

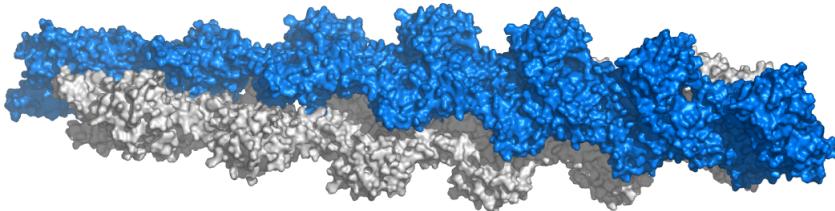


FIGURE 2.3 – Structure d'un filament d'actine basée sur le modèle de HOLMES, POPP, GEBHARD et KABSCH, 1990, illustré par Thomas Splettstoesser

en gardant une longueur constante.

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

2.2.2 L'équilibre de polymérisation

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

Les nucléateurs

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

Afin de dépasser cette barrière, d'autres protéines jouent le rôle de nucléateurs. Le complexe Arp2/3 (Arp pour Actin Related Protein) est le plus connu de ces nucléateurs. Il se lie au côté d'un filament et Arp2 et Arp3 miment un dimère d'actine. D'autres monomères peuvent alors se fixer sur cette base et un nouveau filament peut croître. Ce nouveau filament est de plus attaché avec un angle d'environ 70 ° au filament initial, créant un réseau branché (BLANCHOIN et al., 2000).

Les formines se fixent à l'extrémité barbée d'un filament et y ajoutent successivement des monomères d'actine. Les formines peuvent nucléer un nouveau filament en stabilisant un dimère et en y ajoutant d'autres monomères (PRING, EVANGELISTA, BOONE, YANG et ZIGMOND, 2003).

Les élongateurs

Une fois les filaments formés, des facteurs d'élongation comme les formines ou Ena/VASP, peuvent ajouter des monomères liés à la profiline à l'extrémité barbée du filament. Certaines formines avancent le long du filament tout en le construisant à partir de complexes actine-profiline (OTOMO et al., 2005).

Protéines de coiffage (capping proteins)

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

Protéines de fragmentation (severing proteins)

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

La cofiline se lie aux filaments d'actine ADP et entraîne une configuration où la rotation des monomères les uns par rapport aux autres est plus grande (MCGOUGH, POPE, CHIU et WEEDS, 1997). Cela déstabilise les filaments et les casse.

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

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

Les protéines MICAL forment une famille de protéines dépolymérisant l'actine, découvertes récemment dans les neurones (HUNG et al., 2011). En oxydant l'actine des filaments, elle les dépolymérisé. Comme l'actine oxydée ne peut plus former de nouveaux filaments, la destruction du cytosquelette par MICAL ne peut pas promouvoir la croissance du réseau.

MICAL2 est un membre de la famille des protéines MICAL qui est particulièrement localisé dans le noyau. L'actine qu'elle oxyde, en plus d'être dépolymérisée, est expulsée du noyau et ne peut plus y entrer (LUNDQUIST et al., 2014). MICAL2 organise donc la régulation de l'actine nucléaire en appauvrissant le réservoir d'actine nucléaire en filaments et en monomères.

Stabilisateurs des filaments

Les tropomyosines sont des protéines qui vont former également des filaments. Ces filaments vont s'enrouler autour des filaments d'actine et les protéger : ils bloquent l'activité des cofilines et avec la troponine ils régulent l'association avec les myosines, en particulier dans la contraction musculaire (voir le chapitre 4).

Les nébulines sont des protéines stabilisantes dont le but est de fixer la longueur du filament d'actine auquel elles vont se lier, à la manière d'un étalon de mesure (OTTENHEIJM et GRANZIER, 2010, voir figure 2.4).

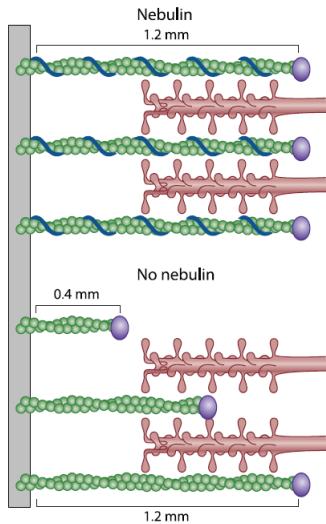


FIGURE 2.4 – Rôle de la nébuline dans le maintien de la longueur des filaments adéquate dans les cellules musculaires, d'après OTTENHEIJM et GRANZIER, 2010.

2.2.3 Organisation en réseau de filaments

Les filaments d'actine en évolution permanente sont liés entre eux mais également à la membrane plasmique et aux autres filaments du cytosquelette (microtubules et filaments intermédiaires).

Ancrage à la membrane

Les cellules sont liées mécaniquement entre elles par des protéines transmembranaires, en particulier les cadhérines, qui relient leurs réseaux d'actine. Les caténines font la liaison entre les cadhérines et les filaments d'actine.

L'ancrage du cytosquelette à la matrice extra-cellulaire se fait par l'intermédiaire d'une structure extraordinairement complexe, les adhésions focales. Au niveau des adhésions focales, des dizaines de protéines interagissent entre elles pour relier les intégrines encastrées dans la membrane et les filaments d'actine. Je ne vais pas faire ici l'inventaire des protéines impliquées dans ces adhésions. À l'intérieur des adhésions focales, une signalisation complexe est à l'œuvre qui permet, en réponse à des forces extérieures, de construire une structure mécano-sensible capable de déclencher des cascades de signalisation dans toute la cellule (GEIGER, SPATZ et BERSHADSKY, 2009). En particulier, les petites GTPases Rac, Rho et Ras sont activées par des signaux provenant des adhésions focales soumises à des signaux mécaniques et régulent l'architecture du cytosquelette. Je reviendrai plus loin sur la mécanique des adhésions focales.

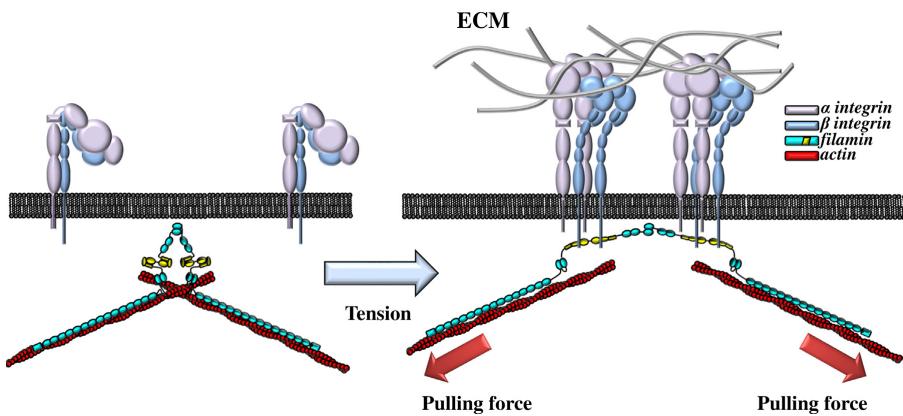


FIGURE 2.5 – Représentation d'un dimère de filamentine se dépliant sous tension par (JANOŠTIAK, PATAKI, BRÁBEK et RÖSEL, 2014)

Protéines de pontage

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

La filamentine est un homodimère qui lie deux filaments d'actine. Elle peut se déformer sous la contrainte (FURUIKE, ITO et YAMAZAKI, 2001), ce qui permet de doter le réseau d'actine à la fois d'une élasticité et d'une mécanosensibilité supplémentaire (KAINULAINEN, 2002). La filamentine peut également se lier à la membrane pour y ancrer le réseau d'actine (YAMAZAKI, FURUIKE et ITO, 2002).

Lorsque son interaction avec les filaments est forte, l'α-actinin peut lier des filaments en réseaux, alors que lorsque sa vitesse de dissociation est grande elle forme plutôt des faisceaux (WACHSSTOCK, SCHWARTZ et POLLARD, 1993). Elle fait partie des protéines qui organisent les filaments d'actine dans les cellules musculaires, et sera donc évoquée à nouveau dans le chapitre 4.

Protéines de faisceau

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

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

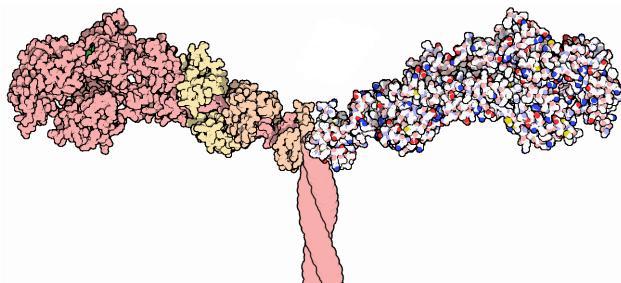


FIGURE 2.6 – Structure d'une myosine à deux têtes : en rouge la chaîne lourde, en jaune et orange les deux chaînes légères. Les queues des deux chaînes lourdes sont enroulées l'une autour de l'autre. Illustration tirée de l'article du mois de la Protein Data Bank sur la myosine (GOODSELL, 2010)

Lien avec les autres filaments du cytosquelette

Le cytosquelette d'actine est relié aux réseaux de filaments intermédiaires et aux microtubules par des protéines capables de se lier à deux ou aux trois types de filaments. Par exemple, la plectine et les nesprines permettent de connecter les microtubules et les filaments d'actine au réseau de lamines de la membrane nucléaire, et donc de transmettre les contraintes jusqu'au noyau (WICHE, 1998, TAPLEY et STARR, 2013). Les WHAMM en sont un autre exemple, elles se lient aux microtubules et à la membrane et nucléent des filaments d'actine.

Moteurs moléculaires : myosines

Les myosines sont des moteurs moléculaires qui se déplacent sur l'actine en consommant de l'ATP. Il en existe chez tous les eucaryotes, mais leur homologie n'est pas aussi grande que celle de l'actine, car elles ont des fonctions différentes. Dans le génome humain, on dénombre une quarantaine de gènes pour la myosine, qui forment 17 groupes.

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

Les myosines ont une tête qui peut se lier à l'actine en filament, un cou qui sert de levier et de régulateur, et une queue qui sert souvent à former un dimère, et éventuellement à se lier à un cargo. On les appelle « chaînes lourdes » par opposition aux « chaînes légères », qui ne sont pas à proprement parler des myosines mais qui sont des protéines qui vont se lier au cou des « chaînes lourdes » pour les réguler. On peut en voir une représentation par la Protein Data Bank en figure 2.6.

Par exemple, pour la contraction musculaire, deux chaînes lourdes de myosine II s'associent en dimère par leur queue, et quatre chaînes légères s'ajoutent au niveau des deux cou. Les queues de milliers de myosines sont tressées en un filament épais, qui va coulisser par rapport au filament d'actine, appelé en

comparaison filament fin, sous l'action du cycle de la myosine (voir figure 2.7). La structure et la contraction musculaires seront détaillées dans le chapitre 4.

Le dimère a alors deux têtes pouvant se lier à l'actine, et va s'en servir pour avancer le long du filament, à la manière dont un alpiniste plante un piolet, se hisse puis détache le piolet pour le replanter plus loin, successivement pour les deux bras. Le cycle de la myosine est présenté en figure 2.7.

Certaines myosines ont un rôle analogue à celui des moteurs moléculaires associés aux microtubules et transportent des molécules le long des filaments, en général en direction de l'extrémité +, seule la myosine VI se déplace en sens inverse. Certaines autres, comme les myosines I n'ont qu'une seule tête.

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

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

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

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

2.3.1 Mécanique du filament d'actine

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

Longueur de persistance

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

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

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

La longueur de persistance dépend de l'énergie thermique disponible pour agiter le filament : elle diminue lorsque la température augmente.

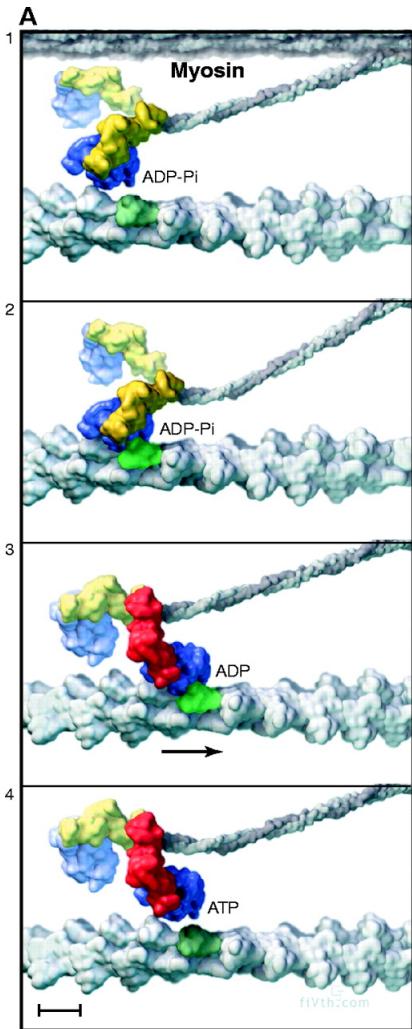


FIGURE 2.7 – Reconstitution du cycle de la myosine à l'aide des données de la Protein Data Bank par (VALE et MILLIGAN, 2000). Ici deux myosines forment un dimère doté de deux têtes et d'une longue queue qui lui permet de se lier au filament épais, composé de milliers de queues de myosines. 1 → 2 : La tête de myosine liée à un ADP + phosphate se lie au filament d'actine. 2 → 3 : Le phosphate est libéré, causant un changement de conformation du levier (en jaune sur l'image 2, en rouge sur l'image 3) qui fait coulisser un filament par rapport à l'autre. 3 → 4 : L'ADP est remplacé par un ATP, ce qui provoque le détachement du filament d'actine. 4 → 1 : L'ATP est hydrolysé en ADP+Pi, ce qui arme la tête de myosine, préparant le cycle suivant. La barre représente 6nm.

On peut également définir l'énergie de courbure d'un filament de longueur L , de rayon a et de module élastique de courbure κ :

$$E_c = \frac{\kappa}{2L} \int_0^L \left(\frac{\partial \theta}{\partial s} \right) ds \approx \frac{\kappa L}{2R^2}$$

où R le rayon de courbure du filament. On définit alors la longueur de persistance comme la longueur pour laquelle l'énergie de courbure devient comparable à l'énergie thermique :

$$E_c(L = l_p, R = l_p) = \frac{k_B T}{2} = \frac{\kappa l_p}{2l_p^2}$$

$$l_p = \frac{\kappa}{k_B T}$$

Le filament d'actine subit un vieillissement par l'hydrolyse de l'ATP des monomères qui le composent. Le changement de conformation induit par l'hydrolyse de l'actine a des conséquences sur les propriétés mécaniques du filament. Un filament d'actine ATP a une longueur de persistance de 15 micromètres, contre 9 micromètres pour un filament d'actine ADP (ISAMBERT et al., 1995). Le vieillissement du filament le rend donc plus déformable et plus souple. Les protéines attachées au filament peuvent également, en stabilisant une conformation, changer sa rigidité. Un filament stabilisé par la phalloïdine ou par la tropomyosine voit sa longueur de persistance augmentée à 18 et 20 microns respectivement (ISAMBERT et al., 1995). Au contraire, la conformation stabilisée par la cofiline n'a qu'une longueur de persistance de 2,2 microns (MCCULLOUGH, BLANCHOIN, MARTIEL et DE LA CRUZ, 2008).

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

Couplage traction-torsion

L'hélice que forme le filament peut adopter des conformations différentes, en particulier en ce qui concerne l'angle de rotation entre les monomères successifs. Une force tirant sur le filament va alors favoriser une conformation à faible torsion, ce qui va rendre la fixation de la cofiline, qui stabilise le filament dans une conformation à grande rotation, beaucoup plus difficile. Il en résulte que la cofiline est moins efficace sur les filaments qui sont en tension (HAYAKAWA, TATSUMI et SOKABE, 2011), induisant une préservation automatique des filaments sous contrainte par rapport aux filaments libres. Au contraire, la formine mDia1, qui est un élongateur des filaments, et la profilin sont plus efficaces sur les filaments soumis à une tension (HIGASHIDA et al., 2013). La conformation de l'actine est alors un senseur de contrainte qui va encourager la préservation et l'élongation des filaments qui ressentent une force de traction.

Les filaments d'actine semi-flexibles peuvent également être courbés, en particulier au voisinage de la membrane. À cause de l'organisation hélicoïdale des monomères, la courbure d'un filament d'actine exerce également une torsion sur ce filament, ce qui rend leur modélisation encore plus complexe. Des observations *in vitro* sur des filaments d'actine courbés et immobilisés montrent que le facteur de nucléation Arp2/3 se lie préférentiellement au côté convexe d'un filament d'actine courbé (RISCA et al., 2012).

Les myosines

Le cycle de la myosine (voir 2.7) est lui-même dépendant des forces qui peuvent être appliquées à la myosine. L'application d'une force de 1,6pN poussant la myosine vers sa conformation finale divise par deux la durée que la myosine va passer attachée au filament (VEIGEL, MOLLOY, SCHMITZ et KENDRICK-JONES, 2003). Inversement, l'application de la même force en sens opposé multiplie par deux la durée d'attachement. En fait, la durée que la myosine passe attachée au filament d'actine dépend exponentiellement de la force exercée, dans la gamme -2pN – 2pN (VEIGEL et al., 2003).

Le régime de fonctionnement des myosines va donc être dépendant de la tension du réseau.

La croissance du filament comme source de force

La croissance des filaments peut elle-même être une source de forces. Par exemple, un filament en croissance proche de la membrane plasmique s'appuie sur elle et sur le réseau d'actine derrière lui dans la cellule. Ces forces peuvent être utilisées pour pousser la membrane plasmique, créant une protrusion comme un filopode ou un lamellipode. Sous l'effet de l'agitation thermique, un monomère pousse la membrane. Si l'extrémité barbée d'un filament se trouve à proximité, le monomère peut alors rejoindre le filament. Ce qui était une fluctuation thermique devient alors une déformation pérenne de la membrane plasmique par le filament d'actine. La bactérie *Listeria Monocytogenes* utilise également ce mécanisme pour se déplacer à l'intérieur des cellules qu'elle infecte : elle possède à sa surface la protéine ActA qui recrute Arp2/3 pour initier la polymérisation d'actine et VASP pour allonger les filaments.

2.3.2 Mécanique des adhésions focales

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

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

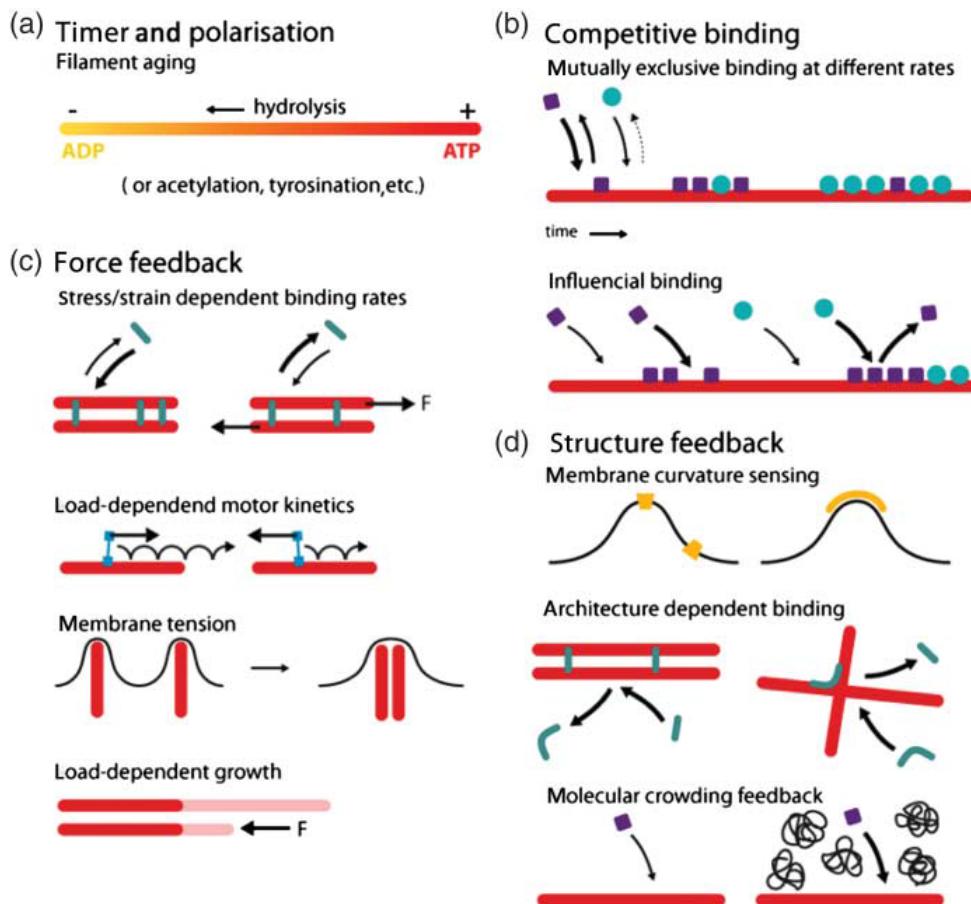


FIGURE 2.8 – Présentation des différentes sources de sensibilité mécanique du cytosquelette d'actine au niveau du filament lui-même et des protéines interagissant avec lui, d'après la revue de (HUBER et al., 2013)

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

En présence d'une force, les intégrines forment des agrégats et leur affinité pour le ligand augmente grâce à un changement de conformation. La taline relie les intégrines aux filaments d'actine. Dans la conformation initiale, elle est repliée sur elle-même. Lorsqu'elle est mise sous tension entre les intégrines et l'actine, elle se déplie, laissant apparaître des domaines de liaisons à la vinculine qui n'étaient pas précédemment accessibles (del RIO et al., 2009). L'arrivée des vinculines dans les adhésions focales dépend de la tension au niveau de l'adhésion (PASAPERA, SCHNEIDER, RERICHA, SCHLAEPFER et WATERMAN, 2010) et

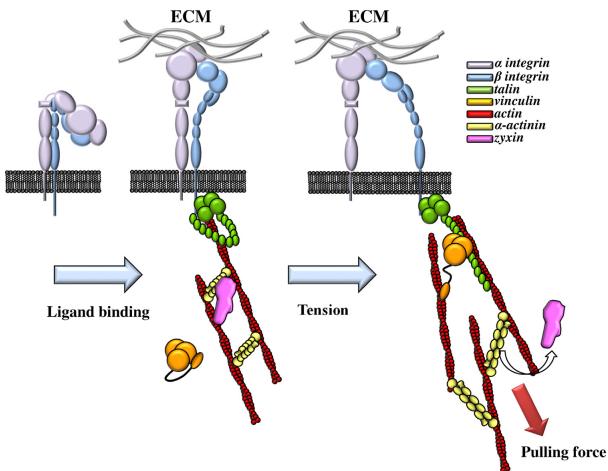


FIGURE 2.9 – Dépliement de la taline sous tension, qui fait apparaître les sites cryptiques de liaison à la vinculine, d'après (JANOŠIAK, PATAKI, BRÁBEK et RÖSEL, 2014)

permet leur renforcement (GALBRAITH, 2002).

De façon similaire, la filamine, qui lie entre eux des filaments d'actine, peut être dépliée lors de tensions sur les filaments (FURUIKE et al., 2001). Son domaine de liaison aux intégrines devient alors accessible, et la filamine ancre alors le cytosquelette à la matrice extra-cellulaire par l'intermédiaire des intégrines (YAMAZAKI et al., 2002). De plus, cela cause un changement de conformation des intégrines qui favorise la formation d'agrégats, renforçant l'adhésion. Cela est illustré par la figure 2.5.

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

2.3.3 Mécanique du cytosquelette d'actine

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

Ces structures vont exercer des forces sur l'extérieur pour se tracter ou se propulser à l'aide de blebs ou de lamellipodes, maintenir la forme cellulaire en mettant sous tension le cortex sous la membrane plasmique et/ou en s'ancrant au substrat par les adhésions focales, ou au contraire changer complètement de forme lors de la phagocytose.

Les cellules musculaires, qui exercent des forces pendant la contraction des

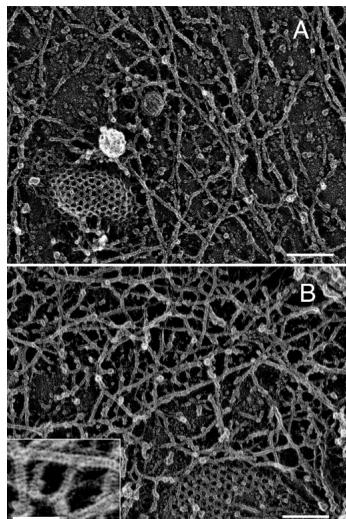


FIGURE 2.10 – Image en microscopie électronique du cortex d'actine sous la membrane, par MORONE, 2006. La barre d'échelle de l'image du haut représente 100nm, celle du bas 50 nm. On peut également voir une cavéole.

muscles, ont une organisation très spécifique du cytosquelette d'actine qui sera décrite au chapitre 4.

Le cortex

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

Le cortex est constitué d'un mélange entre un réseau ramifié par Arp2/3 et des faisceaux de filaments alignés. Il est attaché à la membrane plasmique par des protéines comme celles de la famille ERM (ezrine, radixine, moesine) (BIRO et al., 2013).

Il contient également des myosines qui mettent le réseau sous tension. Cette tension crée une pression vers l'intérieur de la cellule contrée par une différence de pression osmotique. L'équilibre entre les deux forces explique la forme ronde des cellules lorsqu'elles entrent en mitose (STEWART et al., 2011). Lorsque le cortex d'actine est brisé ou détaché de la membrane localement, cette pression interne de la cellule provoque la formation d'une protrusion de la cellule appelée bleb (PALUCH, PIEL, PROST, BORNENS et SYKES, 2005).

Les blebs sont un moyen qu'a la cellule d'explorer l'espace. La protrusion de membrane est alors complétée par un réseau d'actine et des adhésions à partir desquels la cellule va pouvoir progresser vers l'avant (CHARRAS & PALUCH, 2008). Ce mode de déplacement a été particulièrement étudié chez les amibes comme *Dictyostelium*, c'est pourquoi il est dit « amiboïde ».

Ils peuvent également être le moyen d'équilibrer les forces dans une cellule en

division, pour positionner correctement le fuseau mitotique (SEDZINSKI et al., 2011).

Le cortex et la membrane sont intimement couplés mécaniquement, au point qu'il est souvent difficile de séparer l'influence mécanique de la tension de la membrane de celle du cortex (CAMPILLO et al., 2012). En aspirant le cortex dans une micropipette il est possible de tester sa résistance mécanique et de constater qu'elle dépend de l'activité des myosines (BERGERT, CHANDRAOSS, DESAI et PALUCH, 2012).

Le lamellipode

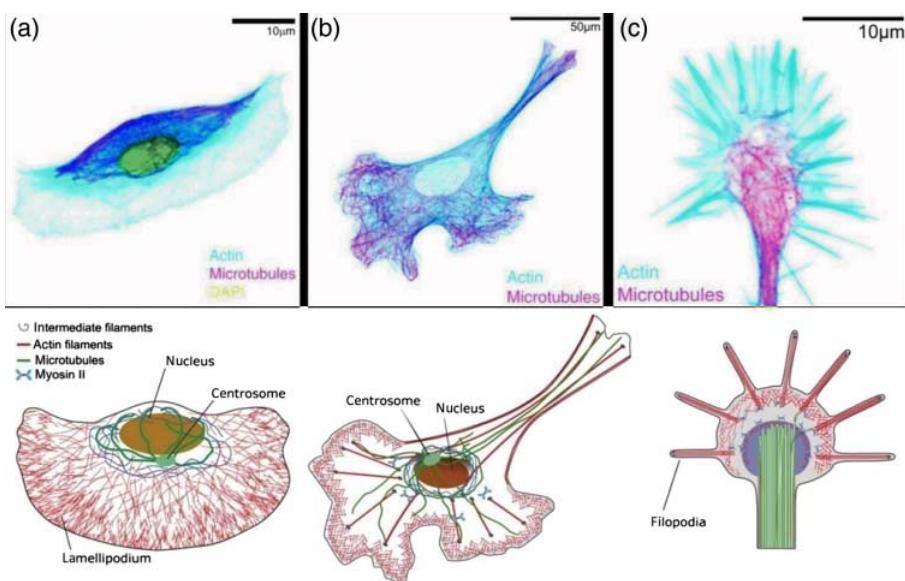


FIGURE 2.11 – Images en microscopie de fluorescence et schéma représentatif d'un lamellipode de kératocyte, d'un lamellipode de fibroblaste et des filopodes d'un neurone, d'après HUBER et al., 2013.

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

Sous la membrane, la GTPase Rac active Arp2/3 par l'intermédiaire du complexe WAVE, formant un réseau ramifié (LEBENSOHN et KIRSCHNER, 2009). La croissance des filaments pousse alors le bord de la cellule vers l'avant, en s'appuyant sur les adhésions focales à l'arrière du lamellipode. La croissance du réseau ramifié créé par Arp2/3 est maintenu sous contrôle par les protéines de coiffage qui bloquent l'elongation excessive des filaments.

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

À l'arrière de la cellule, le réseau d'actine est détruit sous l'action conjuguée de la tension de membrane (RAUCHER et SHEETZ, 2000) et des myosines (WILSON et al., 2010) et les adhésions disparaissent afin de permettre à la cellule d'avancer.

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

Les filopodes

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

Un filopode peut se former à partir de la convergence de filaments provenant d'un réseau branché au bord de la cellule (SMALL, HERZOG et ANDERSON, 1995). Cependant, Arp2/3 n'est pas indispensable à la formation des filopodes (C. WU et al., 2012). Des protéines comme la fascine associent alors ces filaments en faisceau rigide, dont la croissance déforme la membrane plasmique.

Les filopodes servent à explorer l'espace, initiant le contact avec la matrice extra-cellulaire ou avec d'autres cellules voisines. Certaines bactéries exploitent ce comportement pour être capturées et internalisées par la cellule (ROMERO et al., 2011). Après contact avec la bactérie, le filopode se rétracte rapidement, ramenant la bactérie vers sa cible. La force exercée par un filopode en rétraction peut atteindre 10pN, à des vitesses de l'ordre de 100nm/s (VONNA, WIEDEMANN, AEPFELBACHER et SACKMANN, 2007, ROMERO et al., 2011).

Fibres de stress

Les fibres contractiles sont constituées de faisceaux de filaments anti-parallèles liés par l' α -actinine, associés à des myosines, trois éléments que l'on retrouve pour organiser les myofibres responsables de la contraction musculaire. LAZARIDES et BURRIDGE, 1975 observe des marquages de l' α -actinine dans des myofibres et dans des cellules non musculaires et souligne une organisation périodique de l' α -actinine qui est similaire dans les fibres de stress et dans les sarcomères.

Ces fibres sont mises sous tension par les myosines qui font coulisser les filaments les uns par rapport aux autres. Les adhésions focales et les jonctions adherens sont souvent connectées à des fibres de stress qui vont les maintenir sous tension. Comme déjà mentionné dans la section 2.3.2, cette tension va activer des cascades de signalisation qui va renforcer ces adhésions.

La création de fibres de stress et leur fonction de renforcement des adhésions est régulée par la petite GTPase RhoA, dont je reparlerai plus en détail dans le chapitre suivant. RhoA active des formines qui favorisent l'élongation des filaments, désactive la cofilin, ce qui contribue à préserver les longs filaments de la polymérisation, et augmente l'activité des myosines qui mettent les fibres sous tension.

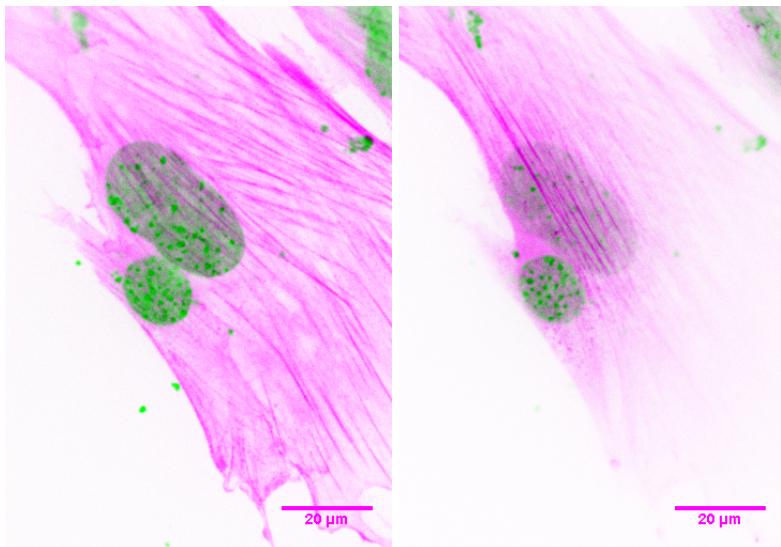


FIGURE 2.12 – Fibres de stress marquées avec de la phalloïdine (en rose) sur deux myoblastes C2C12 étalés sur du PDMS. En vert, l'ADN du noyau. L'image de gauche montre les fibres sur la face ventrale de la cellule, l'image de droite les fibres sur la face dorsale, au-dessus du noyau.

Les fibres de stress sont des structures qui apparaissent essentiellement dans les cellules étalées sur un substrat plan, beaucoup plus rarement dans une matrice à trois dimensions.

2.4 Rôle régulateur de l'actine nucléaire

L'actine nucléaire est plus difficile à observer que l'actine cytoplasmique, c'est pourquoi son existence et son rôle ont été ignorés pendant longtemps. Aujourd'hui, l'amélioration des techniques de microscopie et le développement de techniques spécifiques (comme des sondes dotées d'un NLS) permettent de confirmer l'existence d'actine nucléaire tant en monomères qu'en filaments (McDONALD, 2006, BAARLINK et al., 2013). De plus, un grand nombre de protéines liées à l'actine, comme la profiline, la cofiline, Arp2/3, N-WASP, les formines, MICAL et des myosines, sont également présentes dans le noyau, créant toutes les conditions pour qu'un véritable nucléosquelette soit constitué dans la cellule. La profiline et la cofiline aident respectivement à l'export et à l'import des monomères d'actine par les pores nucléaires, jouant ainsi un double rôle de régulation de l'actine nucléaire.

2.4.1 L'actine G nucléaire dans les complexes

80% de l'actine nucléaire est sous forme de monomères (McDONALD, 2006). Ces monomères vont s'incorporer dans un grand nombre de complexes indispensables à la transcription de l'ADN en ARN et à la maturation de l'ARN.

Chez les eucaryotes, la transcription de l'ADN en ARN est effectuée par trois ARN Polymérasées. Il a été montré que l'actine est nécessaire à l'activité des trois ARN Polymérasées (YE et al., 2008, W. A. HOFMANN et al., 2004 HU, 2004).

L'actine est également liée aux ribonucléoprotéines hnRNP présentes sur les pré-ARN messagers pendant et après leur transcription (KUKALEV, NORD, PALMBERG, BERGMAN & PERCIPALLE, 2005). Les hnRNP empêchent ces ARN messagers qui doivent encore subir des étapes de maturation de se replier sur eux-mêmes (ce qui pourrait interférer avec leur traitement) ou d'être exportés avant d'avoir été traités. Elles peuvent également se lier à la machinerie d'épissage.

Les complexes de remodelage de la chromatine font passer la chromatine d'un état très compact impossible à transcrire à un état où l'expression des gènes devient possible. L'actine fait partie de plusieurs types de complexes de remodelage de la chromatine comme SWI/SNF, RSC et BAF (revue par FARRANTS, 2008).

Enfin, l'actine monomérique bloque également l'activité de la DNase I dans le noyau et l'empêche de couper l'ADN en petits morceaux (LAZARIDES et LINDBERG, 1974).

2.4.2 Les filaments d'actine et la myosine nucléaires

20% de l'actine nucléaire est présente sous la forme de filaments (McDONALD, 2006). Les nucléateurs comme Arp2/3 (YOO, WU et GUAN, 2006) et les formines (BAARLINK et al., 2013) sont présents dans le noyau, aux côtés d'elongateurs spécifiques comme l'émerine (HO, JAALOUK, VARTAINEN et LAMMERDING, 2013). Des myosines, comme la Nuclear Myosin 1 (NM1) (NOWAK et al., 1997) et la myosine VI sont présentes dans le noyau et ont un rôle essentiel dans la transcription.

L'actine, mais également N-WASP et Arp2/3 sont nécessaires à la transcription efficace par l'ARN Polymérase II (YOO et al., 2006). Les drogues empêchant la formation de filaments comme la latrunculine ou la cytochalasine D perturbent la transcription par PolII (McDONALD, 2006).

La NM1 et l'actine se lient à PolII pour la transcription des gènes ribosomaux. La NM1 remodèle localement la chromatine dans une conformation favorable à la transcription (NOWAK et al., 1997).

Enfin, l'émerine, qui relie des filaments d'actine aux lamines qui enveloppent le noyau, joue un rôle essentiel dans l'organisation de l'hétérochromatine (revue par GIENI et HENDZEL, 2009).

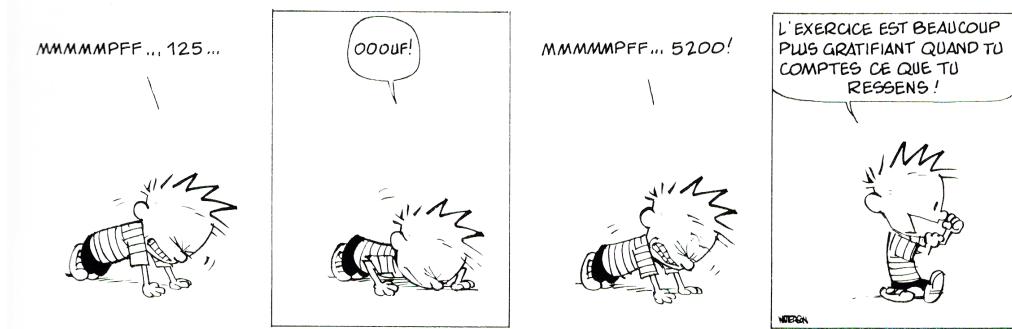
Le noyau contient tous les éléments nécessaires à la formation d'un nucléosquelette mécaniquement fonctionnel : nucléateurs, elongateurs, protéines de pon-

CHAPITRE 2. L'ACTINE

tage et moteurs moléculaires. Ce nucléosquelette est relié au cytosquelette par différentes protéines de la membrane nucléaire qui lient l'actine F, les filaments intermédiaires, les microtubules et les centrosomes. Dans le cas de l'actine, les nesprines et Sun 1 et 2 font la liaison entre les filaments d'actine du cytoplasme et les lamines, qui font la liaison avec les filaments nucléaires et la chromatine grâce à l'émerine.

Chapitre 3

MRTF-A



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

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

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

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

3.1 MRTF-A, cofacteur de Serum Response Factor

3.1.1 Serum Response Factor

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

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

3.1.2 Les cofacteurs de SRF : TCF et MRTF

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

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

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

Ternary Complex Factors

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

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

La famille Myocardine

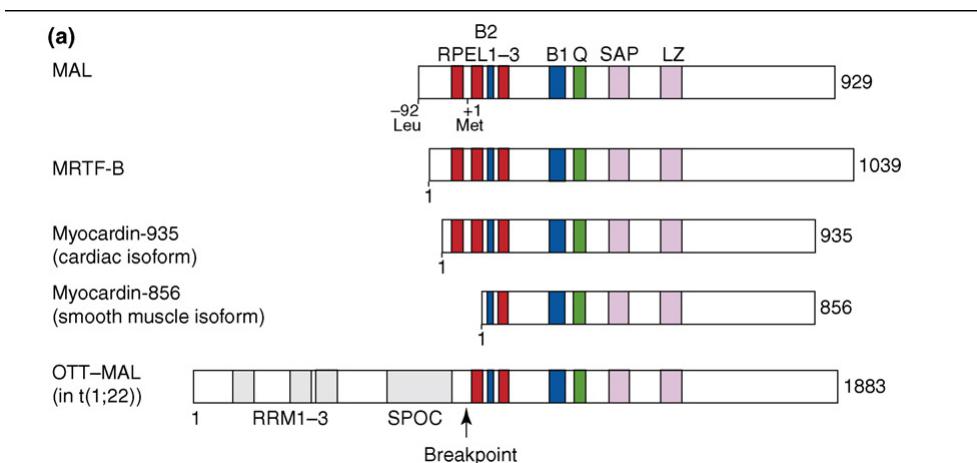


FIGURE 3.1 – La famille de la myocardine d'après POSERN et TREISMAN, 2006

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

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

Les Myocardin-Related Transcription Factors A et B sont exprimées dans un grand nombre de tissus : muscles cardiaques, lisses et squelettiques, neurones, cellules épithéliales, mégacaryocytes ... Contrairement à la myocardine,

les MRTF peuvent être séquestrées dans le cytoplasme, ce qui les empêche d'activer SRF et la transcription. La régulation de la localisation de MRTF est assurée par l'actine, qui peut former un complexe avec la partie N-terminale des MRTF.

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

D'autres manières de réguler SRF

Si ces deux familles de cofacteurs sont les principales voies de régulation de SRF, il possède encore d'autres coactivateurs et corépresseurs, dont je ne parlerai pas ici (POSERN et TREISMAN, 2006). Des micro-ARN peuvent également réguler leur activité au niveau des ARN messagers transcrits (CHEN et al., 2006). SRF peut aussi être clivé en deux parties non fonctionnelles (DREWETT et al., 2001), phosphorylé de sorte qu'il soit incapable de se lier aux MRTF ni à l'ADN (IYER et al., 2003), ou être séquestré dans le cytoplasme (LANGE et al., 2005).

3.2 MRTF-A, indépendamment de SRF

Le principal partenaire des MRTF est SRF, cependant, de nouveaux partenaires minoritaires sont apparus récemment.

3.2.1 Transition épithélio-mésenchymateuse et domaine SAP

L'activation de la transcription de la tenascine C en réponse à une stimulation mécanique et à TGF β a été liée à MRTF-A (MAIER et al., 2008). Cependant, cette réponse est indépendante de SRF, ou du domaine liant MRTF-A à SRF (ASPARUHOVA, FERRALLI, CHIQUET et CHIQUET-EHRISMANN, 2011), elle dépend du domaine SAP. S'il est possible que SAP soit capable de lier MRTF-A à l'ADN (ARAVIND et KOONIN, 2000), savoir si MRTF-A est capable d'être un facteur de transcription à lui seul, ou s'il a un partenaire facteur de transcription encore inconnu est une question ouverte. Les données de ESNAULT et al., 2014 vont cependant dans le sens d'une absence d'effet indépendant de SRF, montrant que la question est encore controversée.

3.2.2 NF- κ B

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

3.3 Structure de MRTF-A

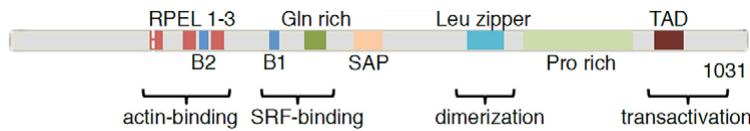


FIGURE 3.2 – Structure de MRTF-A (SCHARENBERG et al., 2014)

3.3.1 Les motifs RPEL

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

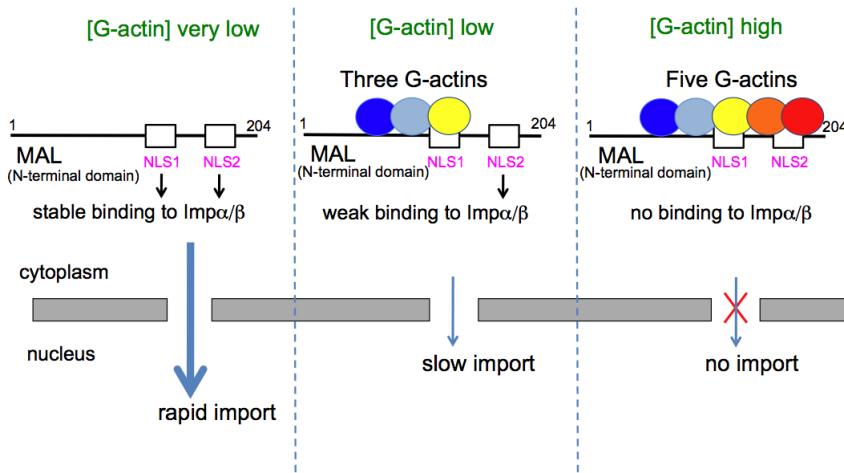


FIGURE 3.3 – D'après HIRANO et MATSUURA, 2011

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

trouve SRF. En présence de suffisamment de monomères d'actine, leur liaison aux domaines RPEL recouvre le NLS et MRTF-A reste cytoplasmique (POSERN, SOTIROPOULOS et TREISMAN, 2002, MIRALLES, POSERN, ZAROMYTIDOU et TREISMAN, 2003, POSERN et al., 2004).

MRTF-A est exportée du noyau par Crm1 (VARTIAINEN, GUETTLER, LA-RIJANI et TREISMAN, 2007, K. HAYASHI et MORITA, 2013). Cependant, ces deux articles se contredisent sur la question de la liaison à l'actine : le premier observe qu'une surexpression de l'actine augmente la vitesse d'export, le second montre que la liaison entre Crm1 et MRTF-A est empêchée lorsque MRTF-A est liée à l'actine. Récemment, RAJAKYLÄ et al., 2015 ont découvert par une élégante expérience de FRET que la protéine Ddx19 est indispensable à MRTF-A pour changer de conformation préalablement à son import (voir figure 3.6). Une explication possible qui serait compatible avec les deux observations apparemment contradictoires concernant l'export serait que pour être exportée, MRTF-A doit retrouver sa configuration repliée, et qu'elle ne puisse le faire qu'en se liant à l'actine. Elle devrait ensuite perdre tout ou partie des actines liées à ses RPEL pour se lier à Crm1 et être exportée. En particulier, sur la figure 3.3, le NES se situerait plus à droite encore que le NLS2. La conformation à 3 actines laisserait donc plus facilement apparaître le NES.

La drogue anti-cancéreuse CCG1423 se lie aux motifs RPEL de MRTF-A, MRTF-B et de la myocardine, et bloque leur import dans le noyau (Ken'ichiro HAYASHI, WATANABE, NAKAGAWA, MINAMI et MORITA, 2014).

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

3.3.2 La région basique et SRF

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

3.3.3 Leucine zipper et oligomérisation

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

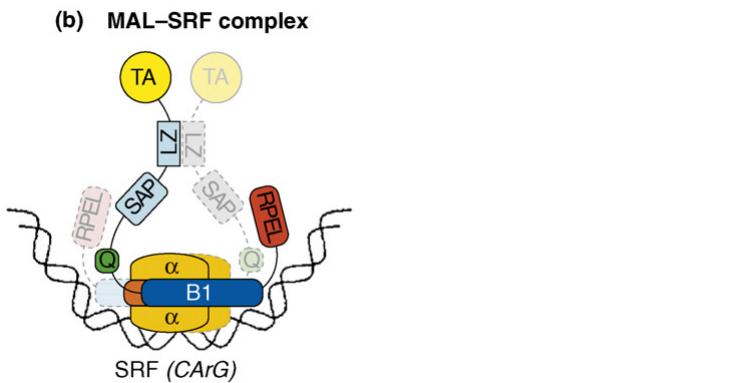


FIGURE 3.4 – D’après POSERN et TREISMAN, 2006

PRYWES, 2003). OTT-MAL est également capable de former des hétérodimères avec les MRTF, et donc de perturber leur équilibre.

3.3.4 TAD

SRF n'est lui-même qu'un transactivateur faible, c'est pourquoi il a besoin de ses cofacteurs pour démarrer la transcription de ses gènes cibles. Le TAD de MRTF-A a pour fonction d'aider SRF lors de cette étape.

3.3.5 Phosphorylation

MRTF-A peut être phosphorylée par ERK1/2 (MIRALLES et al., 2003, Bo CEN et al., 2004). MUEHLICH et al., 2008 montrent qu'un mutant non phosphorylable est incapable de se lier à l'actine et est constitutivement nucléaire, car il ne peut pas être exporté. Les données de K. KALITA, KHAREBAVA, ZHENG et HETMAN, 2006 montrent également que MRTF-A doit être phosphorylée pour se lier à SRF et activer la transcription.

Dans les neurones, la phosphorylation de MRTF-A par ERK1/2 est même la voie principale de régulation de son activité, car la protéine est toujours nucléaire, mais elle n'active SRF qu'une fois phosphorylée (K. KALITA et al., 2006).

3.3.6 Isoformes

D'après SCHARENBERG et al., 2014, il existe 2 isoformes de MRTF-A chez l'humain, une version longue (MRTF-A_L) et une courte (MRTF-A_S). La version longue présente 80 acides aminés avant le premier motif RPEL, contre 15 seulement pour la version courte. Cette dernière contient deux TAD de 9 acides aminés (9aaTAD), un à l'extrémité C-terminale, et un à l'extrémité N-terminale

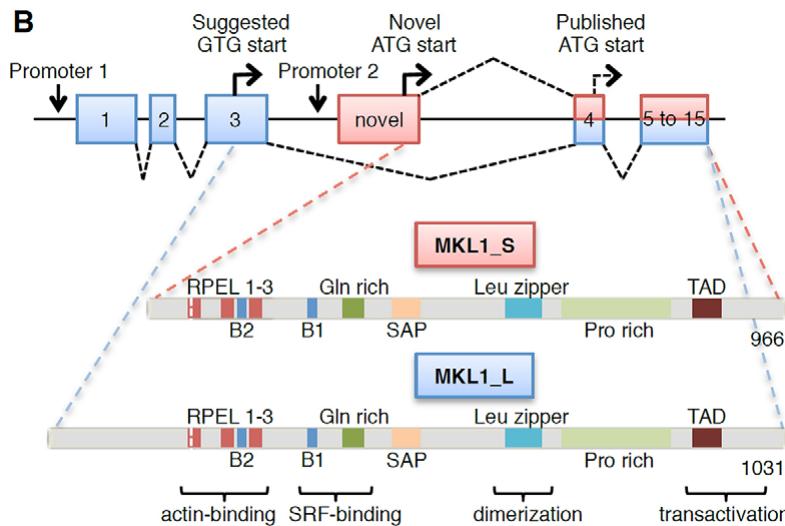


FIGURE 3.5 – D'après SCHARENBERG et al., 2014 : les deux isoformes de MRTF-A

spécifique à cet isoforme. Une surexpression de MRTF-A_S est observée en réponse à TGF- β ou à une contrainte cyclique dans les cellules épithéliales. Elle est liée à une expressions de gènes cibles qui seraient spécifiques à cet isoforme, en particulier des gènes codant pour des protéines de la matrice extra-cellulaire.

3.3.7 Conformations

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

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

La régulation de l'activité de MRTF-A se fait principalement par sa localisation intracellulaire qui dépend essentiellement du réservoir d'actine monomérique disponible. Lorsque l'actine G est disponible pour former un complexe

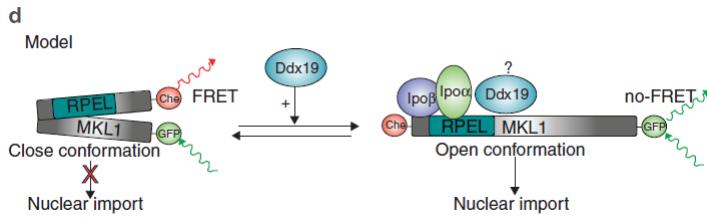


FIGURE 3.6 – Modèle proposé par RAJAKYLÄ et al., 2015

pentamérique avec MRTF-A, ce complexe est confiné dans le cytoplasme où il ne peut jouer aucun rôle dans la transcription. Lorsque l'actine G n'est pas disponible, MRTF-A est importée dans le noyau et peut se lier à SRF pour activer la transcription de ses gènes cibles.

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

3.4.1 Actines mutantes

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

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

Les mutants non-polymérisables comme R62D ont le même effet que la surexpression de l'actine, mais en plus efficace (POSERN et al., 2002, MIRALLES et al., 2003, VARTIAINEN et al., 2007, COLLARD et al., 2014).

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

Récemment, des expériences avec des actines R62D-NLS, localisées exclusivement dans le noyau, ont montré que les formines mDia1 activent SRF en réponse au sérum en polymérisant l'actine nucléaire (BAARLINK et al., 2013).

3.4.2 Drogues agissant sur l'actine

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

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

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

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

3.4.3 Actin-Binding Proteins

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

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

Les thymosines β séquestrent les monomères d'actine avec une stoechiométrie de 1 :1. Mais elles empêchent l'intégration des monomères dans le complexe avec MRTF-A. Lors d'une sur-expression de T β 4, MRTF-A est donc nucléaire et SRF activé (Tsuyoshi MORITA et HAYASHI, 2013).

3.4.4 La voie RhoA

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

RhoA a deux cibles principales : ROCK (Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase 1) et les formines mDia (mammalian Diaphanous). La phosphorylation de ROCK entraîne la phosphorylation de LIMK (LIM domain kinase) qui désactive la cofilin. L'activation des formines et le blocage de la cofilin

concourent à la formation de filaments d'actine plus longs et plus nombreux et à la réduction des réserves de monomères d'actine (ZHAO et al., 2007).

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

3.4.5 Un cas particulier : MICAL2

La signalisation par MRTF-A/B est importante pour le développement des neurones (Katarzyna KALITA, KUZNIEWSKA et KACZMAREK, 2012), cependant contrairement aux fibroblastes et aux myoblastes, les neurones font l'expérience de contraintes et de réorganisation du cytosquelette beaucoup plus limités. Il n'y a que rarement formation de fibres de stress dans les neurones par exemple. La polymérisation d'actine dans ces cellules n'est pas suffisante pour déclencher la voie MRTF-A de la même manière que dans d'autres types cellulaires.

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

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

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

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

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

3.5 Rôles de MRTF-A

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

3.5.1 Embryogenèse

Les MRTF sont exprimées dès le jour 10 du développement de l'embryon (D.-Z. WANG et al., 2002), dans tous les tissus. La délétion de MRTF-B entraîne l'échec de la gastrulation, et donc une fin précoce de l'embryogenèse (Katarzyna KALITA et al., 2012). Au contraire, 60% des mutants MRTF-A^{-/-} sont viables et atteignent l'âge adulte, les autres étant perdus pendant l'embryogenèse car souffrant de défauts cardiaques. Les mutants survivants sont dépourvus de ces anomalies cardiaques, et vivent jusqu'à l'âge adulte (S. LI, CHANG, QI, RICHARDSON et OLSON, 2006, SUN et al., 2006). Cependant, les femelles souffrent d'un défaut de formation de la glande mammaire, lié à une apoptose précoce des cellules myoépithéliales qui déclenchent l'éjection du lait. Il apparaît donc que chez la souris, tandis que MRTF-B est indispensable à l'embryogenèse, l'absence de MRTF-A peut être compensée dans la plus grande partie des tissus. Les souris possédant un gène mutant dominant négatif de MRTF-A (qui agit également sur MRTF-B, car les deux protéines peuvent former des dimères) exprimé spécifiquement dans le muscle sont en revanche de plus petite taille, ne bougent pas et ne survivent que quelques jours, principalement à cause des défauts de musculature de leur diaphragme (Shijie LI et al., 2005).

3.5.2 Régulation de la masse musculaire

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

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

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

3.5.3 Transition épithéliale-mésenchymateuse

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

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

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

3.5.4 Différenciation des mégacaryocytes

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

3.5.5 Rythme circadien

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

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

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

3.5.6 MRTF-A et cancers

Le rôle de MRTF-A dans l'invasion, les métastases et la prolifération cancéreuse est complexe. Dans l'exemple du cancer du sein, on a attribué à MRTF-A un rôle antiprolifératif en tant que facteur de transcription de l'Eplin α (Epithelial protein lost in Neoplasm), protéine qui est inversement corrélée avec la mortalité et l'invasion cancéreuse (Laura LEITNER, SHAPOSHNIKOV, DESCOT, HOFFMANN et POSERN, 2010). Cependant, dans les cancers du sein sensibles aux oestrogènes, l'activation de MRTF-A favorise la transition vers un type insensible au contrôle hormonal (KERDIVEL et al., 2014) et MRTF et SRF sont nécessaires à l'adhésion, à la motilité et à l'invasion dans des lignées issues de cancers du sein et de mélanomes (MEDJKANE, PEREZ-SANCHEZ, GAGGIOLI, SAHAI et TREISMAN, 2009). CCG1423 est d'ailleurs une drogue anti-cancéreuse qui bloque la voie RhoA/MRTF/SRF.

L. LEITNER et al., 2011 montre bien le rôle complexe que peut avoir la régulation d'un élément du cytosquelette dans différents contextes : MRTF-A augmente l'adhésion dans deux types cellulaires, des cellules épithéliales non-invasives et des cellules tumorales de cancer du sein, mais l'effet sur la motilité est opposé dans les deux types. Dans les cellules mammaires épithéliales, l'augmentation de l'adhésion causée par la surexpression de MRTF-A cloue les cellules sur place : l'adhésion est trop forte et les cellules ne sont plus capables de se détacher pour avancer. Inversement, l'adhésion était le facteur limitant dans les cellules tumorales. Avec la surexpression de MRTF-A, elles adhèrent mieux et se déplacent plus efficacement.

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

Le cas particulier d'OTT-MAL

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

3.5.7 Réorganisation de la chromatine

En plus de son rôle de régulateur de la transcription des cibles de SRF, plusieurs effets de MRTF-A sur l'organisation de la chromatine ont été mis en

évidence récemment. L'activation de MRTF-A et de différents mutants montre une augmentation de l'acétylation de l'histone H3, de la quantité d'euchromatine et de l'activité transcriptionnelle (FLOURIOT et al., 2014). Cette fonction de MRTF-A nécessite son domaine C-terminal. Les fibroblastes 3T3 cultivés sur des motifs de grande taille montrent une plus grande quantité de MRTF-A dans le noyau, associée à une histone déacétylase HDAC3 séquestrée dans le cytoplasme et une plus grande activité transcriptionnelle (JAIN, IYER, KUMAR et SHIVASHANKAR, 2013).

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

3.6 Résumé

En résumé, dans la cellule, SRF peut être régulé par l'intermédiaire de la localisation de MRTF-A. Cette localisation est déterminée par la quantité de monomères d'actine qui sont disponibles dans le cytoplasme et dans le noyau pour se lier à MRTF-A. Lorsque MRTF-A est liée à l'actine, elle ne peut pas être importée dans le noyau, mais elle peut en être exportée. Elle est alors séquestrée dans le cytoplasme. Lorsque MRTF-A n'est pas liée à l'actine, elle peut alors être importée dans le noyau, et ne peut plus en être exportée. Elle est alors séquestrée dans le noyau, et elle peut activer SRF.

La voie RhoA, qui active ROCK et les formines mDiA, contrôle le niveau de polymérisation de l'actine, son activation conduit à l'accumulation de MRTF-A dans le noyau.

L'accumulation nucléaire de MRTF-A se fait par deux moyens : il faut la faire entrer dans le noyau, et l'empêcher d'en sortir. La polymérisation de l'actine contrôlée par RhoA dans le cytoplasme permet à MRTF-A d'être importée dans le noyau. La polymérisation de l'actine contrôlée par RhoA dans le noyau, ou l'activité de MICAL-2 qui dépolymérise et expulse l'actine nucléaire, permettent d'empêcher MRTF-A de sortir du noyau.

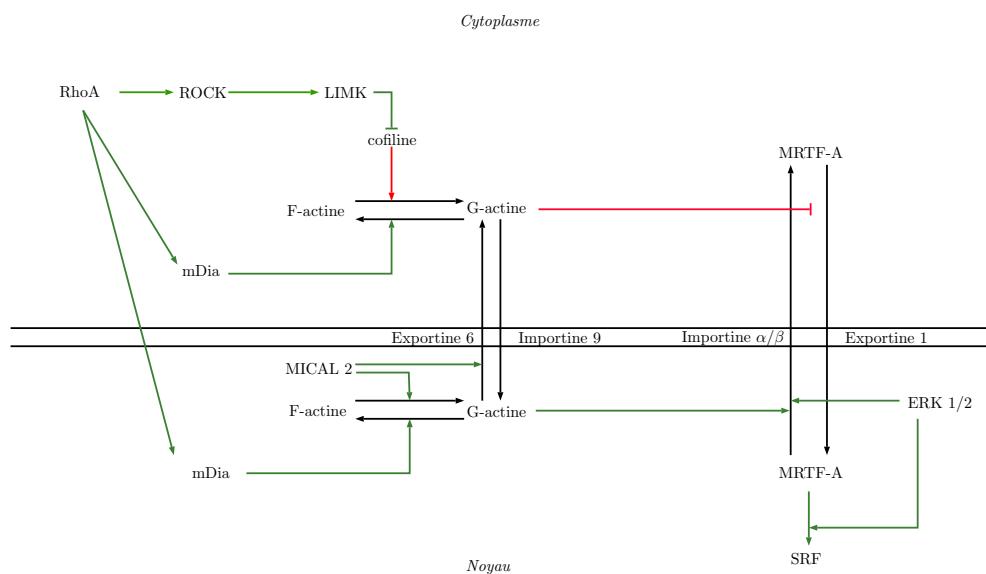
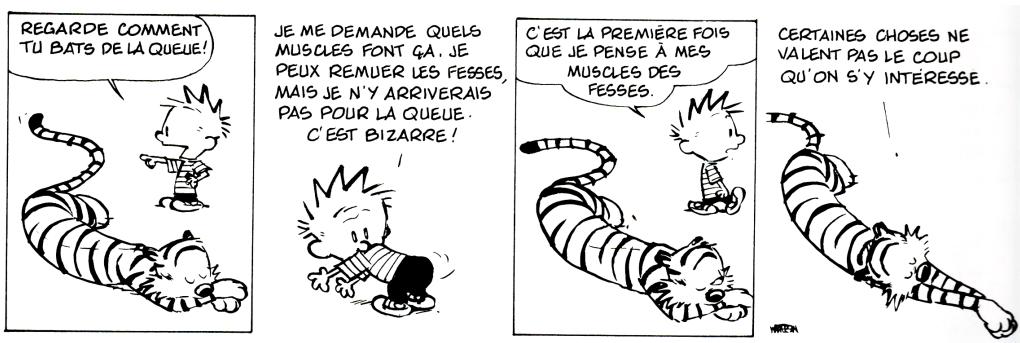


FIGURE 3.7 – Schéma récapitulatif non exhaustif des voies de signalisation activant MRTF-A

Chapitre 4

De la cellule au muscle



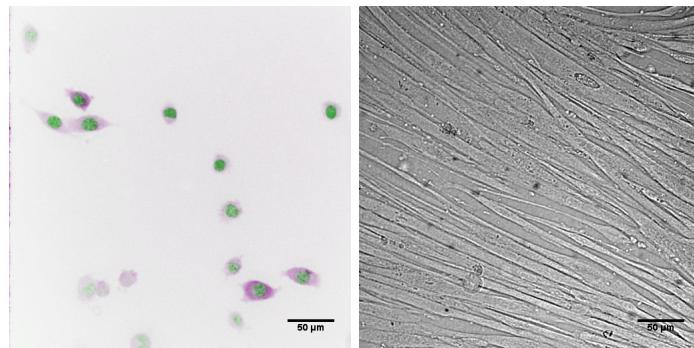


FIGURE 4.1 – Myoblastes primaires infectés avec un plasmide MRTF-A GFP, et myotubes obtenus à partir de myoblastes primaires après 4 jours de différenciation *in vitro* par Alessandra Pincini. En vert, le noyau marqué au DAPI, en magenta MRTF-A GFP.

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

4.1 Organisation du muscle squelettique

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

4.1.1 Du myoblaste au myotube

Les myoblastes sont les cellules progénitrices du muscle. Les C2C12 sont une lignée immortalisée de myoblastes murins, mais des myoblastes primaires

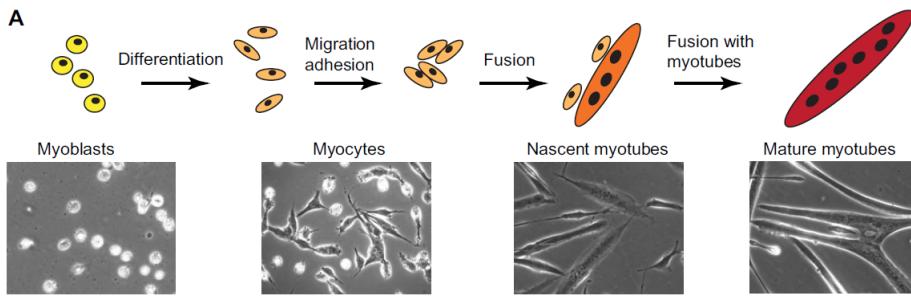


FIGURE 4.2 – Étapes successives de la différenciation des myoblastes en myotubes chez la souris, d'après ABMAYR et PAVLATH, 2012.

peuvent également être mis en cultures *in vitro*. La différenciation se produit quand les myoblastes sont suffisamment nombreux et que les facteurs de croissance qui les maintiennent en prolifération viennent à manquer.

Les myoblastes vont alors s'aligner les uns avec les autres, sortir du cycle cellulaire et devenir des myocytes. Certains de ces myocytes deviendront des cellules fondatrices de myotubes. Les autres myocytes vont alors fusionner avec eux lors d'un processus asymétrique qui mène à la formation de myotubes poly-nucléés de plusieurs centaines de microns de long. Les myoblastes étendent autour d'eux des lamellipodes et des filopodes pour contacter les cellules voisines. Au niveau de ces contacts, les compositions en lipides de la membrane change, on trouve un grand nombre de protéines comme les M- et N-cadhérines, les intégrines et les filaminas qui assurent un lien avec le cytosquelette (revue par ABMAYR et PAVLATH, 2012). Ce dernier est réorganisé localement : un réseau dense se forme sous la membrane, mis sous tension par la myosine 2A (DUAN et GALLAGHER, 2009). Le myoblaste envahit le myotube à l'aide de structures podosome-like quasiment exclusivement composées d'actine en filaments, avant que des pores se forment entre les deux cellules pour achever la fusion.

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

4.1.2 Une organisation spécifique de l'actine et de la myosine

À l'intérieur d'une myofibre totalement différenciée, l'actine est organisée en unités appelées les sarcomères.

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

Afin que les filaments d'actine, dont nous avons vu au chapitre 2 qu'ils sont ordinairement très dynamiques, maintenant leur taille, ils sont coiffés aux deux

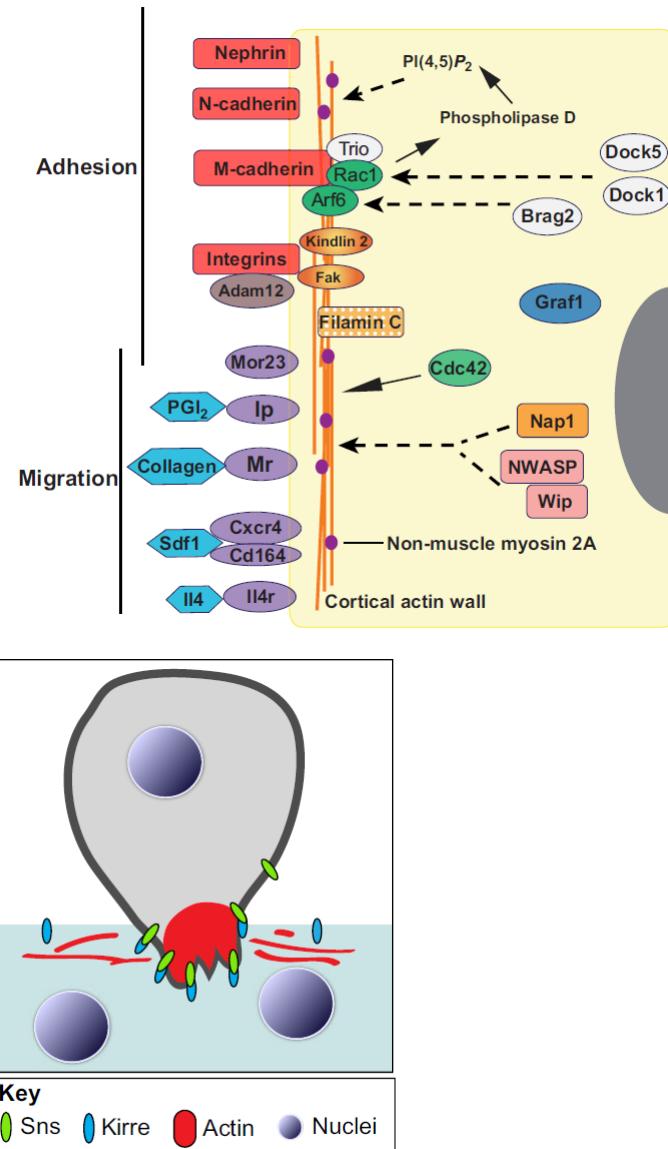
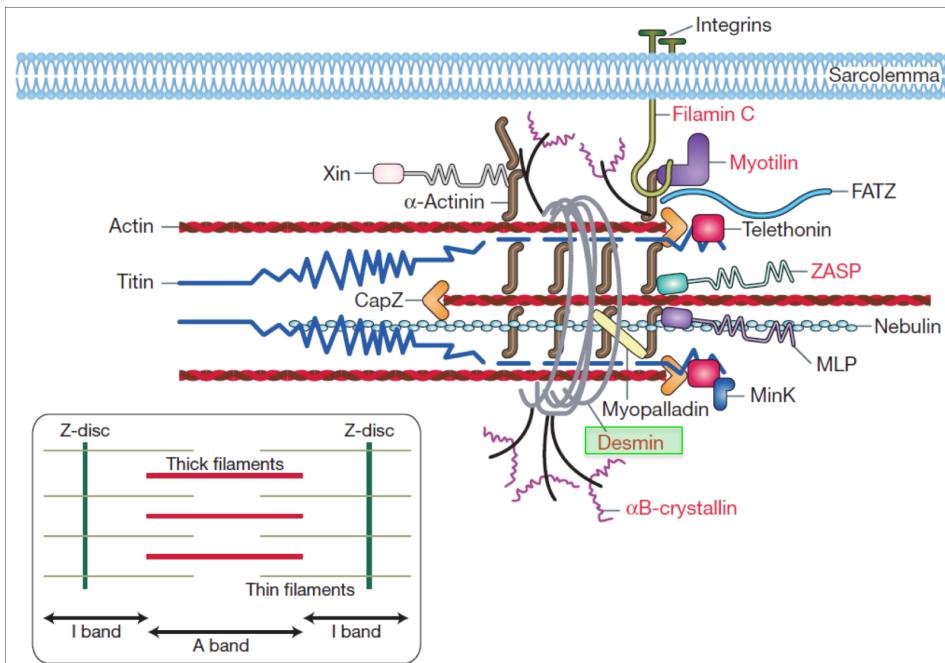


FIGURE 4.3 – Protéines impliquées dans la différenciation des myoblastes et invasion d'un myotube par un myocyte avant la fusion.



Schematic drawing of components of the Z-disc

Expert Reviews in Molecular Medicine © 2008 Cambridge University Press

FIGURE 4.4 – Organisation schématique du disque Z, d'après FERRER et OLIVÉ, 2008

extrémités par CapZ d'un côté et par la tropomoduline de l'autre. On pense que les nébulines, de très longues protéines qui peuvent se lier à environ 200 actines en filament, servent d'échelle pour fixer la longueur des filaments d'actine dans les sarcomères.

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

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

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

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

4.1.3 Rôle de la voie RhoA/MRTF-A/SRF

Parmi les gènes cibles de SRF, on trouve un grand nombre de protéines indispensables à la constitution des sarcomères : tous les différents gènes d'actine et en particulier l' α Skeletal Actin , des myosines (MHC9,myo16,myoIE), des α -actinines, des intégrines et des tropomyosines (SELVARAJ et PRYWES, 2003,CHARVET et al., 2006,ESNAULT et al., 2014).

MyoD, facteur de transcription de la famille des Myogenic Regulatory Factors et marqueur de la différenciation en cellule musculaire, contient un Serum Response Element (L'HONORE et al., 2003) et est activé par MRTF-A/SRF (MOKALLED, JOHNSON, CREEMERS et OLSON, 2012).

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

In vivo dans des souris ayant une délétion conditionnelle de SRF dans les muscles, on observe une diminution de l'expression de la tropomyosine et de

l'α actine du muscle squelettique, corrélés à des défauts dans la croissance des myofibres, une désorganisation des sarcomères et une hypotrophie musculaire (CHARVET et al., 2006, Shijie LI et al., 2005).

Les souris dominant négatif MRTF-A sont viables mais présentent une hypotrophie musculaire qui dépend du niveau d'expression de MRTF-A, une fibrose, et des noyaux positionnés au centre des fibres musculaires, ce qui les désorganise (Shijie LI et al., 2005). *In vitro*, la différenciation des C2C12 nécessite également la présence des MRTF (SELVARAJ & PRYWES, 2003), de SRF et de RhoA (WEI et al., 1998).

KAWAUCHI et al., 2012 détaillent un peu plus ces voies de signalisation impliquées dans la différenciation musculaire, en montrant que la signalisation passe par p130Cas, les intégrines β3 et ILK, qui désactivent à la fois ERK1/2 (ce qui empêche la phosphorylation de MRTF-A et donc promeut son accumulation nucléaire, et met hors-jeu les TCF), et la cofiline (ce qui promeut l'actine polymérisée). Ils montrent que p130Cas contribue à maintenir l'actine polymérisée et MRTF-A présent dans le noyau alors que la différenciation se fait dans un milieu pauvre en sérum, où RhoA est diminué.

4.1.4 De la fibre au muscle

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

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

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

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

Différents types de muscles

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

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

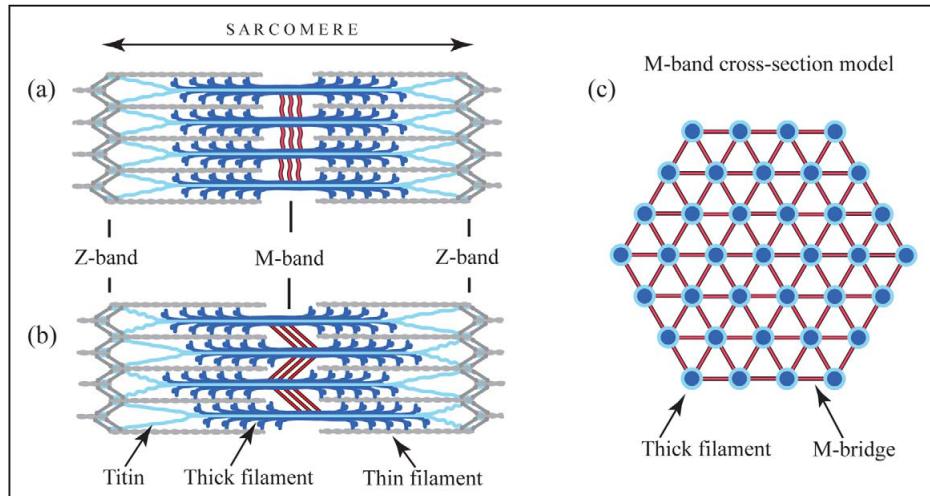


FIGURE 4.5 – Organisation dans les deux plans des filaments de myosine au niveau de la bande M, d'après TSKHOVREBOVA et TRINICK, 2012

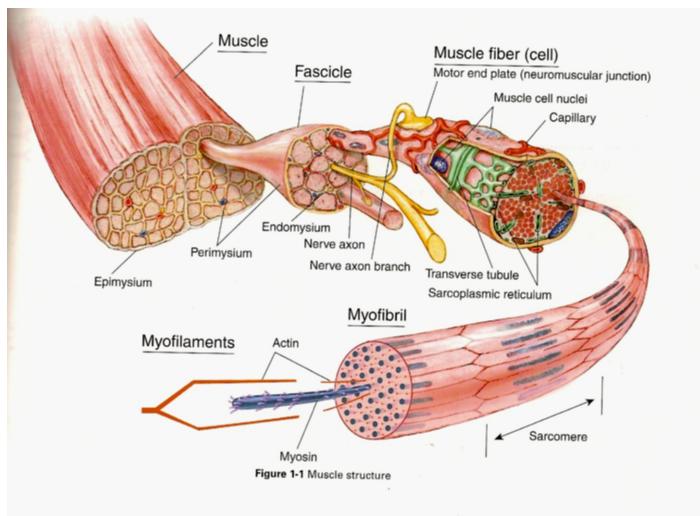


FIGURE 4.6 – Illustration de la structure globale du muscle.

4.2 La contraction musculaire

4.2.1 Mécanismes moléculaires

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

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

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

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

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

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

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

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

Pendant la contraction, les protéines du disque M, du disque Z et la titine, qui maintiennent l'alignement des filaments d'actine et de myosine, ont été étirées. Ces protéines peuvent être dépliées pendant la contraction et stocker de l'énergie élastique qui sera rendue lorsque les têtes de myosine seront détachées des filaments d'actine. Lorsque la contraction s'arrête, les filaments coulissent à nouveau dans l'autre sens sous l'action de l'élasticité de ces protéines, et le sarcomère reprend sa longueur initiale.

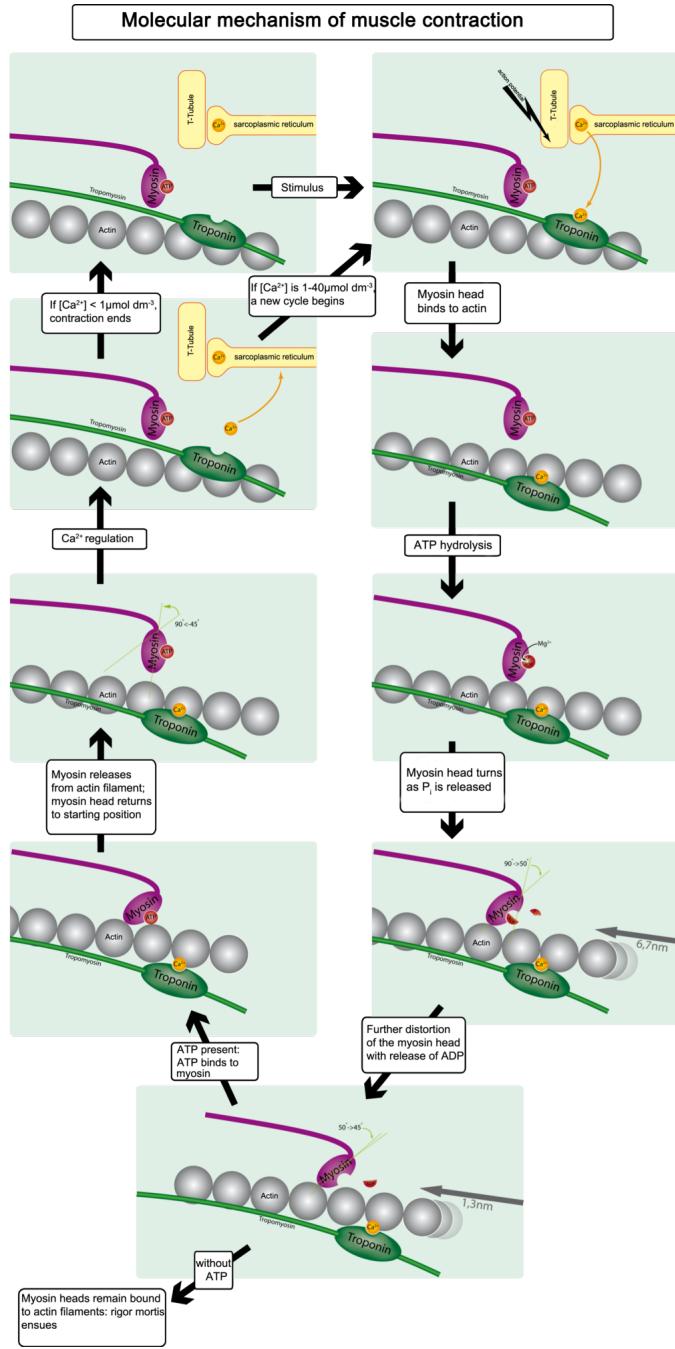


FIGURE 4.7 – Illustration du cycle de la contraction musculaire, réalisée par Hank van Helvete (CC BY-SA 2.5)

4.2.2 Mécanique de la contraction musculaire

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

Le modèle de Hill (HILL, 1938), élaboré bien avant que les mécanismes internes de la contraction musculaire soient connus, permet de relier la vitesse de contraction d'un muscle aux forces qu'il est capable de développer.

Hill constate que pour un muscle de taille donnée se raccourcissant d'une longueur x , l'énergie dissipée dans le muscle est proportionnelle à x : $W_d = ax$. a est proportionnel à la section du muscle (et donc au nombre de myofibres), et comme la force maximale P_0 supportée par le muscle également, le rapport entre les deux est constant :

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

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

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

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

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

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

avec b une constante mesurée dans les expériences.

Cette relation peut se réécrire :

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

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

Non seulement la loi de Hill est vérifiée pour les muscles striées, mais elle l'est également au niveau du myoblaste unique (MITROSSILIS et al., 2009) et même au niveau d'un unique filament d'actine déplacé par 8 têtes de myosine du muscle squelettique (DEBOLD, PATLAK et WARSHAW, 2005), ce qui confirme l'hypothèse de Huxley qui attribue ce comportement aux propriétés du complexe acto-myosine.

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

Le muscle est un tissu plastique : il peut augmenter ou diminuer sa masse en réponse aux sollicitations mécaniques qui lui sont imposées. Nous en faisons tous quotidiennement l'expérience : la pratique d'activités physiques augmentent

la taille de nos muscles, tandis qu'une immobilisation prolongée, comme par exemple suite à une fracture, conduit à une diminution rapide de notre masse musculaire. L'équipe d'Athanassia Sotiropoulos à l'Institut Cochin, avec laquelle nous avons collaboré, a caractérisé le rôle central de SRF dans ce phénomène.

Entre la lame basale et les myofibres, on peut trouver des cellules satellites, qui contrairement aux autres cellules présentes dans le muscle, sont moins engagées sur la voie de différenciation et peuvent toujours proliférer. Les myoblastes C2C12 et primaires sont issues des cellules satellites prélevées sur des souris. Les cellules satellites sont responsables de la réparation et de la croissance des muscles adultes. En effet, les myofibres sont des cellules qui ne se reproduisent plus, et après les deux phases de création de myofibres pendant la vie embryonnaire, le nombre de fibres musculaires reste constant. Cependant, lorsqu'elles sont activées en réponse à une blessure ou à une sollicitation importante du muscle, les cellules satellites prolifèrent, et une partie d'entre elles se différencient et fusionnent avec les fibres musculaires.

Pour étudier la réponse à une stimulation mécanique, des souris ont été soumises à une hypertrophie compensatoire : un des muscles de la patte ne peut plus faire son travail (parce qu'il est dénervé ou que le tendon est sectionné), et les autres sont obligés de compenser son manque d'activité en développant plus de force. En réponse à cette surcharge de travail, SRF est activé dans les myofibres *in vivo* par l'intermédiaire de MRTF-A (GUERCI et al., 2012). L'activation de SRF dans les myofibres produit un signal paracrine composé d'Interleukines 6, qui encourage la prolifération des cellules satellites, et d'interleukines 4 qui les fait fusionner avec les fibres musculaires. Dans les fibres musculaires mutantes où SRF est désactivé, le nombre de noyaux par fibre n'augmente pas, ce qui signifie qu'il n'y a pas de fusion des cellules satellites avec les myofibres. La surexpression d'IL6 chez les mutants restaure la prolifération, mais pas la fusion des cellules satellites. Surexprimer IL4 ou Cox2, qui est en aval de SRF et en amont de l'IL4, permet de restaurer la fusion et l'hypertrophie chez les mutants.

Au contraire, lors d'une absence de signaux mécaniques induite par la dénervation, l'actine G s'accumule dans le noyau des fibres musculaires et l'activité de SRF diminue (COLLARD et al., 2014). Le rôle de MICAL-2 est normalement d'exclure l'actine du noyau, et son activité est réduite pendant l'atrophie, ce qui contribue donc à l'accumulation nucléaire d'actine constatée. L'accumulation d'actine G dans le noyau favorise l'export de MRTF-A, qui est confiné dans le cytoplasme dans les muscles dénervés. Cela explique le déficit d'activité de SRF, qui ne peut pas être atteint par son cofacteur.

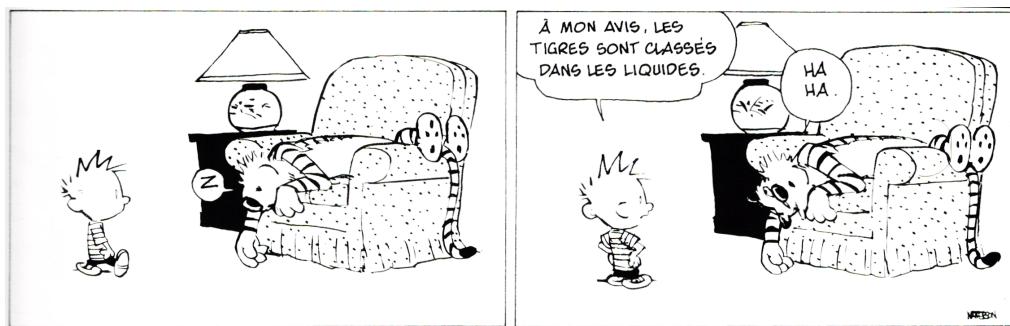
La désactivation de SRF, l'injection de CCG1423 (drogue inhibant MRTF/SRF), ou l'expression d'une actine non polymérisable conduisent tous à une aggravation de l'atrophie musculaire, ce qui montre que cette voie de signalisation protège l'organisme de la destruction de ses propres muscles.

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

couple MRTF/SRF qui est nécessaire.

Chapitre 5

Rhéologie cellulaire



Les propriétés mécaniques des objets biologiques (cellules, tissus, gels de biopolymères ...) a été étudiée 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, d'une échelle moléculaire à une échelle macroscopique.

Il est aisément de voir à quel 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, la micro-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.

5.1 Rhéologie

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

Par exemple, on appelle solide élastique un matériau pour lequel la déformation ϵ est proportionnelle à la contrainte σ . On appelle module d'Young ce coefficient de proportionnalité quand on applique un étirement uniaxial (voir figure 5.1) :

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

Deux modules sont nécessaires pour caractériser les propriétés élastiques d'un matériau, le module d'Young E et le coefficient de Poisson ν , ou le module de compression K et le module de cisaillement G . Les cellules sont des milieux incompressibles, elles se déforment en gardant leur volume constant. En d'autres termes K est très grand devant G . La relation entre G et E s'écrit alors $E = 3G$.

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

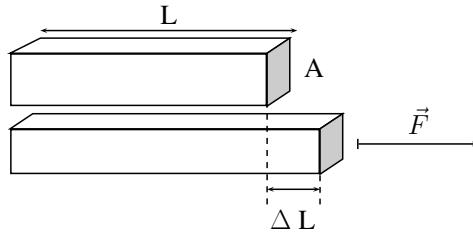


FIGURE 5.1 – Solide élastique de section A soumis à une contrainte $\sigma = \frac{F}{A}$ et déformé de $\epsilon = \frac{\Delta L}{L}$.

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 sous l'effet d'une contrainte constante. Lorsque la contrainte est levée, la déformation s'arrête, mais le liquide ne reprend pas la forme qu'il avait 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 limites. Une barre d'acier est élastique dans une gamme de contraintes et de déformations, au-delà elle est plastique : elle se déforme de manière irréversible en réponse à la contrainte. 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 cisaillé, 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 viscoélastiques, ce qui signifie qu'une partie de l'énergie transmise par la contrainte 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 :

$$J(t) = \frac{1}{E} + \frac{t}{\eta} = \frac{1}{E} \left(1 + \frac{t}{\tau} \right) \quad \tau = \frac{\eta}{E}$$

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 :

$$J(t) = \frac{1}{E} e^{-\frac{t}{\tau}} \quad \tau = \frac{\eta}{E}$$

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 $G'' = \omega\eta$.

Pour un modèle de Kelvin-Voigt :

$$G = E + i\omega\eta$$

et pour un fluide de Maxwell :

$$\frac{1}{G} = \frac{1}{E} + \frac{1}{i\eta\omega}$$

5.2 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

CHAPITRE 5. RHÉOLOGIE CELLULAIRE

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 -actinin, la scruine ou la filamine, des moteurs moléculaires comme les myosines ou Arp2/3 pour créer des réseaux branchés.

Les gels d'actine ont des modules d'Young allant typiquement de 1 à plusieurs centaines de Pascal pour 2mg/ml d'actine purifiée, les valeurs dépendant beaucoup de la qualité de purification des protéines et du degré de polymérisation des filaments (JANMEY et al., 1994). Par exemple, l'ajout de gelsoline pour dépolymériser les filaments fait chuter les valeurs à moins 1Pa.

Les gels d'actine purifiée concentrée 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, PASTORE, MACKINTOSH, LUBENSKY et JANMEY, 2005). Plus la contrainte est grande, plus les possibilités se réduisent, et plus le gel se rigidifie. D'autre part, les filaments sont semi-flexibles et ont donc une élasticité de courbure, qui a déjà été définie au chapitre 2, qui est une deuxième source de non linéarité.

Au-delà d'une certaine déformation, par exemple 20% pour des gels d'actine 2mg/ml soumis à un cisaillement, les gels d'actine cèdent, et leur module élastique diminue brutalement de manière irréversible (JANMEY et al., 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 scruine, rend le gel quasi-maintenant 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 -actinin 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 (GARDEL et al., 2006).

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 et al., 2009). La consommation d'ATP par les myosines place également le gel hors de l'équilibre thermodynamique. Avec des concentrations d'ATP qui permettent

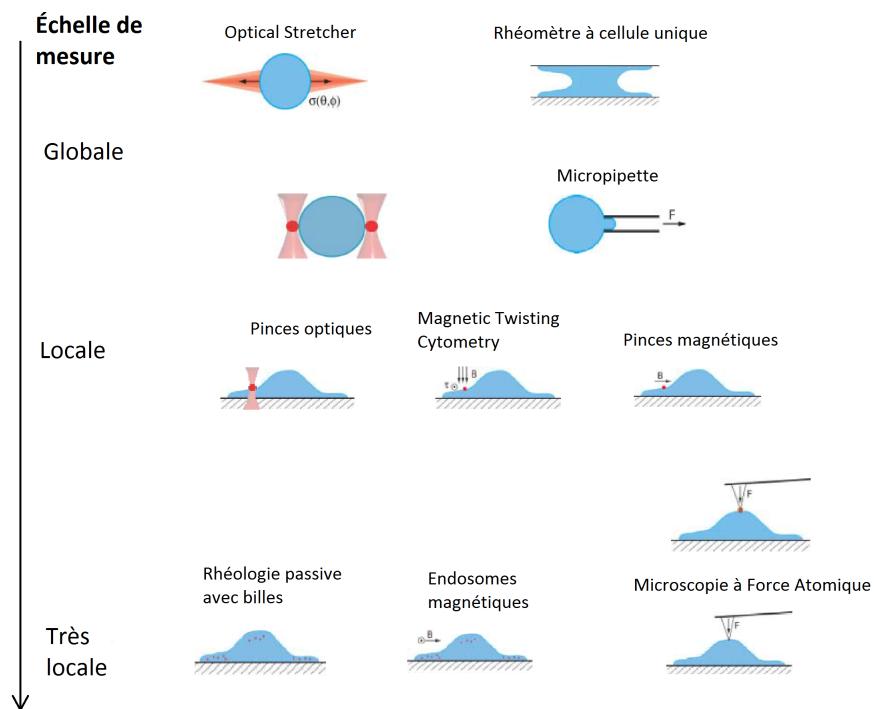


FIGURE 5.2 – Principales techniques de rhéologie, classées en fonction de l'échelle de taille à laquelle elles sondent les cellules. Adapté de HUBER et al., 2013.

aux myosines de faire coulisser les filaments les uns par rapport aux autres, le théorème fluctuation-dissipation n'est alors plus valable (MIZUNO, TARDIN, SCHMIDT & MACKINTOSH, 2007), alors qu'il l'est sans ajout de myosines, ou lorsque la fréquence de stimulation est supérieure à 10 Hz.

5.3 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 mécanique 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 extra-cellulaire ou 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 à l'aide de force, d'autres à l'aide de couples, et d'autres encore imposent des déformations. Ces différences peuvent parfois rendre difficiles les comparaisons 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.

5.3.1 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 d'adhésion entre lesquelles est placée une cellule. Une des lamelles est infiniment rigide par rapport à la cellule, l'autre est souple et va être défléchie. La déflexion de la lamelle souple est mesurée, soit directement sur l'image de microscopie, soit indépendamment, et permet de connaître ou de fixer la force appliquée aux cellules.

Le dispositif est décrit en détail par DESPRAT, RICHERT, SIMEON et ASNACIOS, 2005 et BUFI, DURAND-SMET et ASNACIOS, 2015.

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.

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 (GUCK et al., 2001). 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 (revue par HOCHMUTH, 2000). 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 mécaniques. 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.

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 mécano-transduction activées au niveau des adhésions vont également être stimulées. La stimulation est 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'incubation, 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 (de 3 à 4,5 μm), recouvertes de protéines d'adhésion, pour appliquer un couple sur les cellules (N. WANG, BUTLER & INGBER, 1993).

Les billes, préalablement magnétisées dans le plan du substrat, 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 contraintes appliquées vont du Pascal à la centaine de Pascal.

L'avantage et l'inconvénient de cette méthode sont qu'elle permet d'observer une grande population de cellules en même temps. Le champ résultant correspond à 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.

Une variante de cette technique consiste à observer le mouvement des billes avec un microscope pour en déduire la déformation de la cellule (FABRY et al., 2001a). 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.

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 et à un gradient de champ magnétiques créés 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 (fibronectine ou fragment de fibronectine, cadhérines, ...), elles vont donc sonder le cytosquelette par leur intermédiaire.

Les pinces magnétiques peuvent appliquer des forces de l'ordre de quelques dizaines de pN à la dizaine de nN selon le type de billes, la distance entre les billes et l'électro-aimant et l'intensité du courant qui le traverse. 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.

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.

Pinces optiques Les pinces optiques utilisent des billes de silice ou de latex de quelques micromètres de diamètre qui sont piégées dans le faisceau d'un laser infra-rouge focalisé par un objectif de grande ouverture numérique (NEUMAN & BLOCK, 2004). 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, grâce à une calibration préalable. Il est également possible, lorsqu'on dédouble le piège, de déformer une cellule en suspension sur laquelle sont fixées deux billes diamétralement opposées (HÉNON, LENORMAND, RICHERT et GALLET, 1999). Les pinces optiques peuvent appliquer des forces de la fraction de pN 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 latérale 1000 fois meilleure que celle de la microscopie optique, avec une résolution verticale atteignant celle d'un atome. Elle repose sur une fine pointe fixée à 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 défexion du levier, et donc la force d'interaction de la pointe avec la surface avec une très grande précision.

Mais le levier peut également être utilisé pour appliquer des forces. La raideur du levier est calibrée, ce qui permet à partir de sa défexion de mesurer une force. La pointe d'un microscope à force atomique est en général extrêmement fine, pour permettre une résolution nanométrique. 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.

Selon la taille de la pointe, l'AFM va pouvoir sonder la cellule à des échelles locales, voire 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 enfoncee, les éléments du cytosquelette sondés seront également différents : en indentant d'une fraction de μm , on sonde essentiellement le cortex, en indentant plus profondément, on sonde le cytoplasme (KASAS et al., 2005). La pointe peut être utilisée pour observer la fonction de fluage ou peut être mise en oscillations pour observer le régime fréquentiel.

Une description complète peut être trouvée dans GAUTIER et al., 2015.

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 vésicule 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 (ROBERT, AUBERTIN, BACRI & WILHELM, 2012). Soumises à un champ magnétique, les nanoparticules magnétiques s'alignent pour former des aiguilles, qui peuvent être mises en oscillation 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.

5.3.2 Les techniques de rhéologie passive

Les techniques de rhéologie passive 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 des endosomes magnétiques.

Toute une gamme de techniques de rhéologie passive repose sur l'observation du mouvement spontané de particules à l'intérieur ou à la surface des cellules. Ces particules peuvent avoir des tailles de l'ordre de la centaine de 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 à sa surface.

Si les billes sont soumises au mouvement brownien dans un milieu visco-élastique à l'équilibre thermique, on peut à l'aide du théorème fluctuation-dissipation calculer $G(\omega)$. Cependant, dans les cellules, 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 (MIZUNO et al., 2007). Certaines expériences sont d'ailleurs faites sur des cellules où l'ATP a été bloquée chimiquement, ce qui permet d'être certain d'éviter l'interférence des moteurs moléculaires.

En comparant les résultats de mesures effectuées en rhéologies 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.

5.4 Propriétés rhéologiques de cellules

5.4.1 Description

Les données récoltées par toutes les méthodes décrites dans la section précédente dessinent une image de la rhéologie cellulaire qui converge sur certains points, et qui diverge sur d'autres.

Les valeurs du module visco-élastique peuvent énormément varier d'une technique à l'autre, pour un même type cellulaire dans des conditions semblables, allant de quelques dizaines de Pa à quelques kPa. Un premier effet vient du fait que des techniques sondant la cellule à des échelles et des localisations différentes, ne mesurent pas exactement les paramètres du même objet. Un autre effet important vient du fait que pour remonter à ces valeurs, un modèle mécanique est nécessaire. Selon les hypothèses qu'il contient sur le système (sur l'adhésion, sur l'homogénéité du milieu cellulaire ...) les valeurs obtenues pourront être très différentes. Par exemple, si le modèle suppose une adhésion parfaite sur toute la surface d'une bille, alors que l'adhésion se fait par un nombre de points limité, la rigidité sera sous-estimée.

Cependant la plupart de ces données convergent à propos de la dépendance en fréquence de $G(\omega)$, qui est en loi de puissance de 10^{-2} à 10^3 rad/s. La grande amplitude de fréquences sur laquelle ce comportement est retrouvé est d'ailleurs un élément essentiel pour distinguer la loi de puissance de l'exponentielle, ou d'une combinaison d'exponentielles. Plus particulièrement, G' et G'' varient *ensemble* avec le même exposant β sur plusieurs décades de fréquence de stimulation mécanique :

$$G(\omega) = G_0 \omega^\beta e^{i\beta \frac{\pi}{2}} \quad (5.1)$$

$$G'(\omega) = G'_0 \cos\left(\frac{\pi\beta}{2}\right) \quad (5.2)$$

$$G''(\omega) = G''_0 \sin\left(\frac{\pi\beta}{2}\right) \quad (5.3)$$

(5.4)

Ce qui signifie que le rapport entre G' et G'' est indépendant de la fréquence :

$$\frac{G''}{G'} = \tan\left(\beta \frac{\pi}{2}\right)$$

Cela montre que le stockage et la dissipation ont la même origine sur toute cette gamme de temps caractéristiques, l'hypothèse d'une élasticité déterminée par le cytosquelette et d'une viscosité déterminée par le cytoplasme n'est pas compatible avec ce genre de propriétés. Cette expression de G en loi de puissance est équivalente à une fonction de fluage en loi de puissance avec le même exposant :

$$J(t) = J_0 t^\beta$$

L'exposant de cette loi de puissance est compris entre 0, qui correspondrait à un comportement parfaitement élastique, et 1, qui correspondrait à un comporte-

ment visqueux. Il quantifie l'importance relative des deux comportements dans la visco-élasticité.

Plus précisément, HOFFMAN et CROCKER, 2009 proposent une somme de deux lois de puissance, en ajoutant un deuxième terme pour expliquer le comportement aux fréquences élevées (supérieures à la dizaine de Hz) :

$$G'(\omega) = A \cos\left(\frac{\pi\beta}{2}\right) \omega^\beta + B \cos\left(\frac{3\pi}{8}\right) \omega^{3/4}$$

L'exposant β est la dépendance en fréquence principale aux faibles fréquences, tandis qu'aux hautes fréquences le terme en $\omega^{3/4}$ domine.

L'auteur va même plus loin en divisant les données obtenues par différentes techniques en deux groupes, l'un pour lequel β est autour de 0.15, regroupant les techniques qui sondent la cellule en surface et donc voient principalement l'influence du cortex très élastique, l'autre pour lequel β de l'ordre de 0.25, mesurent la visco-élasticité du volume interne de la cellule.

Il est à noter que le terme aux hautes fréquences en puissance 3/4 se retrouve également pour les réseaux d'actine *in vitro*, tout en ne correspondant pas à une échelle de temps de stimulation réellement pertinente d'un point de vue biologique (la milliseconde).

5.4.2 Modèles

Un certain nombre de modèles ont été élaborés pour expliquer les propriétés de la rhéologie cellulaire, pour la plupart inspirés de la matière molle.

Le modèle Sol-Gel considère le milieu intra-cellulaire et son cytosquelette comme à la transition entre un réseau de filaments semi-flexibles peu connectés (et donc principalement visqueux) et un réseau très connecté principalement élastique. Dans ce modèle, ce sont les propriétés du gel qui sont importantes, d'où l'importance de l'étude des gels d'actine *in vitro*. Les gels d'actine purifiée, avec ou sans réticulants permanents, ont un comportement élastique indépendant de la fréquence aux basses fréquences qui ne correspond pas à ce qui est observé à l'échelle de la cellule. En revanche, aux hautes fréquences, une loi de puissance en $\omega^{3/4}$ est retrouvée dans les deux cas, probablement car les échelles de temps sont trop faibles pour que des phénomènes biologiques aient lieu. Les gels avec des réticulants comme la filamine ou l' α -actinine montrent un comportement en loi de puissance, mais les exposants sont bien plus faibles que ceux observés pour les cellules (β inférieurs à 0.15), montrant qu'il manque une partie des sources de dissipation (GARDEL et al., 2006). Cependant, ces protéines ne peuvent expliquer à elles seules le comportement des cellules, car en leur absence, les cellules ont un comportement quasiment inchangé. Par exemple, la filamine dans les gels d'actine purifiée est suffisante pour observer une rhéologie en loi de puissance et une rigidification sous contrainte (GARDEL et al., 2006), mais elle n'est pas nécessaire dans les cellules pour que ce comportement se manifeste (COUGHLIN et al., 2006).

Si l'étude des gels reconstitués *in vitro* à partir de protéines purifiées permet d'étudier l'importance des différents ingrédients dans le comportement rhéologique,

giques, ils sont loin de reconstituer la grande diversité de protéines impliquées dans la cellule, ce qui explique qu'ils sont encore loin d'avoir les mêmes propriétés que les cellules complètes. Des gels d'actine et filamine sous tension ont récemment montré deux des propriétés les plus marquantes des cellules, la rhéologie en loi de puissance et la rigidification sous contrainte GARDEL et al., 2006, donnant naissance à un modèle basé sur des réticulants qui peuvent se déplier sous contrainte pour révéler des sites de liaison cachés. Comme déjà évoqué dans le chapitre sur l'actine, de plus en plus de protéines liées au cytosquelette montrent ainsi des capacités mécano-sensitives. Quelques simulations ont montré une rhéologie en loi de puissance prometteuse (HOFFMAN, MASSIERA et CROCKER, 2007).

Le modèle de Soft Glassy Rheology (SOLLICH, 1998) considère la cellule d'un point de vue énergétique. La cellule est alors constituée d'un grand nombre de petits éléments densément compactés, qui peuvent se déplacer les uns par rapport aux autres au prix d'une énergie beaucoup plus grande que les fluctuations thermiques. Les réarrangements se font donc sous l'action d'une énergie extérieure, en l'occurrence pour la cellule la consommation d'ATP par les moteurs moléculaires. Ce système implique l'existence d'un grand nombre de temps de relaxation qui engendre une rhéologie en loi de puissance. Le rôle de la source d'énergie extérieure dans les réarrangements implique que les moteurs moléculaires sont essentiels pour ce comportement. Une plus grande activité des moteurs qui fournit plus d'énergie au système pour ses réarrangements devrait donc augmenter la fluidité du milieu. Cependant, l'effet du blocage des moteurs moléculaires sur les propriétés des cellules est encore controversé. Sur les myoblastes, l'effet attendu a été observé (BALLAND, RICHERT & GALLETT, 2005), mais sur des cellules primaires de muscles lisses des voies respiratoires (HASM), c'est l'effet contraire (FABRY et al., 2001b). Certaines expériences n'ont remarqué aucune différence significative en bloquant l'ATP (HOFFMAN, MASSIERA, VAN CITTERS & CROCKER, 2006)). Ce modèle ne parle cependant que du cytosquelette d'acto-myosine, sans prendre en compte l'action des autres réticulants, de manière complémentaire avec le modèle précédent.

Une approche intermédiaire, développée par l'équipe physique du vivant du laboratoire Matière et Systèmes Complexes (BALLAND et al., 2006), consiste à considérer le cytosquelette comme une organisation auto-similaire, allant de l'échelle des filaments isolés d'actine aux faisceaux d'actine et aux fibres de stress. Deux hypothèses sont faites : une distribution fractale des tailles caractéristiques ℓ_i et une dépendance des temps caractéristiques de relaxation mécanique en loi de puissance de la taille : $\tau_i \propto \ell_i^\alpha$. Plus généralement, il a été montré qu'une distribution dense de temps de relaxation sur plusieurs décades est une condition suffisante pour obtenir une rhéologie en loi de puissance du temps.

Les différences de comportement entre les cellules sont alors vues comme des distributions aléatoires parmi tous les temps de relaxation disponibles. Ce modèle prédit une répartition normale des exposants dans la population cellulaire et une répartition log-normale des J_0 , ainsi qu'une relation linéaire entre $\ln(G_0)$ et l'exposant α . Nous verrons au chapitre 7 que ces propriétés sont bien vérifiées

pour les mesures réalisées dans le cadre de cette thèse.

Si le modèle de rhéologie en loi de puissance semble bien conservé entre les techniques de rhéologie et les types cellulaires, il est principalement descriptif, mais ne donne que très peu d'informations sur ce qui se passe effectivement à l'intérieur du cytosquelette.

Pour des stimulations rapides et des échelles de temps inférieures au dixième de seconde, un autre modèle, de poro-élasticité, a été proposé (MOEENDARBARY et al., 2013). Il s'agit de considérer qu'à cette échelle, le facteur majeur de dissipation est le passage de l'eau entre les mailles du réseau d'actine, de manière analogue à de l'eau qui sortirait d'une éponge que l'on presse. Un des avantages de ce modèle sur le modèle de la loi de puissance est qu'il part de mécanismes précis de dissipation pour calculer ses prédictions.

5.5 Autres mesures physiques sur les objets biologiques et mécanotransduction

5.5.1 Mesurer les forces générées par les cellules

Les cellules ne sont pas seulement un matériau aux propriétés rhéologiques étonnantes, elles sont avant tout un système vivant, capable d'apporter une réponse biologique à une sollicitation mécanique, et d'exercer leurs propres forces et déformations pour se mouvoir, changer de forme, se diviser ... Il est alors intéressant de mesurer ces forces et déformations, par exemple observer comment une cellule tire et pousse sur son substrat pour se déplacer, comment elle équilibre les forces pendant sa division pour aligner puis séparer les chromosomes, ou comment des mutations dans certaines protéines peuvent compromettre la capacité de cellules musculaires à se contracter.

Traction Force Microscopy

L'idée de cette technique est d'ensemencer les cellules sur un substrat déformable, en général un gel de polyacrylamide. Des billes fluorescentes d'un diamètre de l'ordre de la centaine de nanomètres à l'intérieur du gel servent de traceurs. Lorsque la cellule exerce des forces sur le substrat, le gel est déformé et les billes sont déplacées. Les cellules sont alors décollées, ce qui permet au gel de reprendre sa forme au repos et donc d'avoir la position initiale des billes. La connaissance des propriétés mécaniques du gel permettent de remonter du champ de déformation dans le gel sous et autour de la cellule au champ de contraintes exercées par la cellule, par exemple pour observer les mécanismes qu'elle utilise pour se mouvoir (DELANOË-AYARI, RIEU & SANO, 2010).

Cette technique peut s'utiliser à l'échelle d'une cellule unique lorsque les cellules sont suffisamment éloignées les unes des autres pour que les champs de déformation qu'elles causent ne se superposent pas. Elle peut également être utilisée à l'échelle d'un tissu lorsqu'on ne cherche pas à démêler la contribution individuelle de chaque cellule mais seulement celle du tissu tout entier.

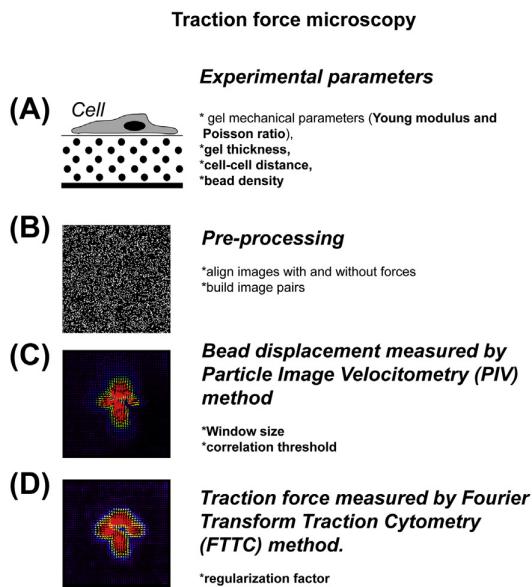


FIGURE 5.3 – Étapes du protocole de Traction Force Microscopy, d'après MARTIEL et al., 2015.

MARTIEL et al., 2015 proposent une description complète de cette technique.

Substrats texturés

On peut remonter plus facilement aux forces générées par la cellule en les ensemençant sur un champ de piliers en PDMS de $2 \mu\text{m}$ de diamètre et d'une dizaine de μm de haut. En effet, la raideur des piliers peut être calibrée à l'avance, et retrouver la force exercée sur le pilier à partir de sa déflexion est un problème plus simple à résoudre que celui du champ de déformation de la TFM (du ROURE et al., 2005).

Cette technique peut être combinée à d'autres : le champ de micro-piliers en PDMS peut ensuite être étiré pour observer comment la génération de forces est modifiée par la déformation extérieure, les micro-piliers peuvent être recouverts de motifs de protéines d'adhésion de formes et de tailles contrôlées, ou des particules magnétiques peuvent être incorporées à l'intérieur des piliers pour contrôler leur déflexion avec un champ magnétique (GUPTA et al., 2015).

Contrôle de la forme

Le forme des cellules peut être hautement variable d'un type cellulaire à l'autres, mais également à l'intérieur d'un même type cellulaire. Ainsi, dans une population de C2C12, certaines cellules ont une forme allongée, d'autres plutôt triangulaire, certaines sont rondes, et leur taille peut également varier

d'un facteur 10. Au contraire, lorsque les mêmes cellules sont différencierées en myotybes, elles ont toutes une forme très allongée.

Ces différences de taille et de formes sont autant de paramètres géométriques hors de contrôle de celui qui veut mesurer les paramètres physiques des cellules et en déduire des principes généraux.

C'est pour réduire cette variabilité qu'ont été développées les techniques de micro-patrons adhésifs. Le principe est de créer sur le substrat des zones recouvertes de protéines adhésives de forme et de taille contrôlées (THERY et PIEL, 2009). Une cellule ne pourra adhérer que sur ces zones, le reste de la surface étant rendue non-adhésive.

Cette technique a été utilisée dans différents contextes pour étudier la manière dont MRTF-A régule la transition EMT. Dans le premier cas, les cellules ont été ensemencées individuellement sur des disques d'aires différentes (CONNELLY et al., 2010). Sur les disques de taille trop faible pour que la cellule puisse s'étaler, MRTF-A était accumulée dans le noyau, contribuant au changement de type cellulaire. Dans le second cas, les cellules étaient ensemencées sur des motifs carrés d'une centaine de microns de côté (GOMEZ et al., 2010). Les cellules sur les bords subissaient alors plus de contraintes et de tension que les cellules du centre du motif, et MRTF-A était nucléaire dans les cellules des bords du carré, et cytoplasmique dans les cellules à l'intérieur.

Dans les deux cas, la forme et l'aire proposées à la cellule déterminent suffisamment l'état du cytosquelette pour induire la translocation de MRTF-A.

Méthodes également utilisées en rhéologie active

Une partie des méthodes de rhéologie active peuvent également être utilisées pour mesurer des forces dans des montages un peu différents de celui utilisé pour la rhéologie.

C'est le cas par exemple pour les expériences sur les forces d'adhésions entre deux cellules, qui peuvent être faites avec deux micropipettes (une cellule attachée à chacune) (BIRO & MAÎTRE, 2015), ou avec une cellule attachée à la lamelle souple d'un AFM pour sonder une autre cellule sur le substrat.

Même s'il est présenté dans les techniques de rhéologie active, le rhéomètre à cellule unique peut également être utilisé pour mesurer les forces générées par une cellule. 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 défexion de la lamelle souple, ce qui permet de mesurer la force totale que la cellule peut développer (MITROSSILIS et al., 2009).

5.5.2 Appliquer des forces pour observer la réponse biologique

La mécanotransduction s'intéresse particulièrement à la réponse biologique des cellules soumises à des contraintes mécaniques. Il est alors important de

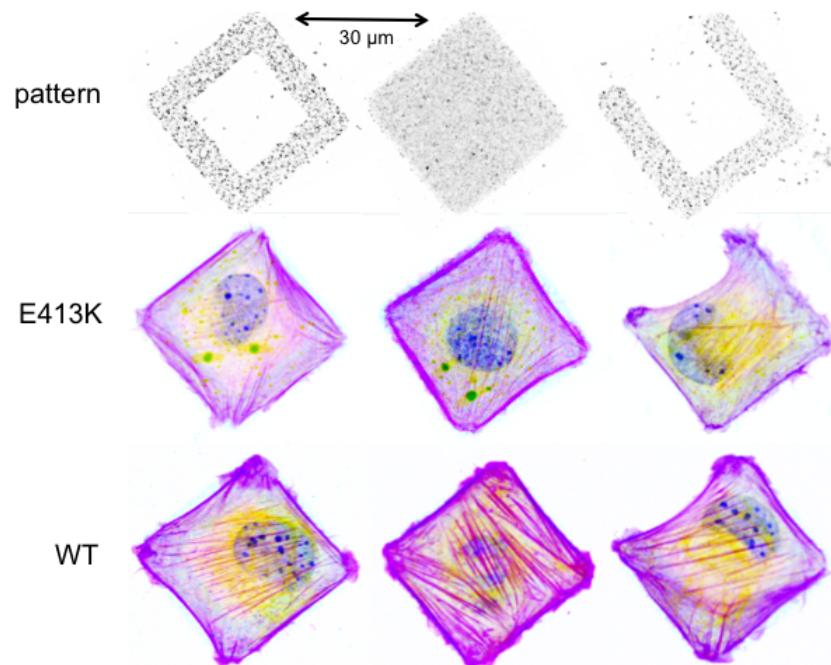


FIGURE 5.4 – Images de C2C12 sauvages et possédant une version mutante de la desmine (E413K) sur des micro-patrons adhésifs. Les filaments d’actine sont marqués à la phalloïdine Alexa 647 (en magenta), les filaments de desmine-GFP sont en jaune, les noyaux sont marqués au DAPI (en bleu) et le motif en fibronectine Cy3.5 (en cyan), d’après la thèse d’Élisabeth Charrier. Micropatrons réalisés par Martial Balland (LIPhy Grenoble), cellules, marquages et images réalisées par Elisabeth Charrier (MSC et Biologie Fonctionnelle et Adaptative, Université Paris Diderot)

pouvoir leur appliquer de manière contrôlée des contraintes pour observer les changements biologiques que cela provoque.

Une grande partie des techniques de rhéologie active présentées précédemment peuvent être utilisées pour appliquer des forces contrôlées aux cellules, car la majorité d'entre elles est compatible avec des observations sur leur état biologique.

Par exemple, ZHAO et al., 2007 ont utilisé des billes magnétiques pour appliquer une contrainte verticale constante à des fibroblastes cardiaques de rat. Ils ont observé une activation de la voie RhoA/ROCK en réponse à la force, qui aboutit à la désactivation de la cofilin. Cela stabilise alors les filaments d'actine, MRTF-A est alors accumulée dans le noyau et le promoteur de l' α -actine du muscle lisse est activé.

Les cellules peuvent également être cultivées sur des substrats déformables, la plupart du temps des gels de polyacrylamide ou de PDMS, recouverts de protéines d'adhésion, qui seront soumis à des déformations constantes ou cycliques. Des étirements cycliques ont ainsi été appliqués par KUWAHARA et al., 2010 sur des myocytes cardiaques de rat et induisent une accumulation nucléaire de MRTF-A. Un dispositif permettant ce type de stimulation constante est décrit dans le chapitre de cette thèse concernant les méthodes expérimentales.

Le développement de la microfluidique ouvre un nouveau champ de recherches en mécanique cellulaire, en permettant d'appliquer non pas des forces ou des couples mais directement des contraintes, tout en contrôlant de manière fine et rapide l'exposition aux facteurs biochimiques. Par exemple, l'observation de cellules en train de passer à travers de pores de quelques micromètres de diamètre apporte de nouvelles informations sur la manière dont les cellules se déplacent *in vivo* dans une matrice extra-cellulaire en 3D (AUBRY, THIAM, PIEL & ALLENA, 2015).

Une grande partie des observations de migration et de motilité cellulaires sont faites, pour des raisons pratiques évidentes, sur des substrats plats et bien plus rigides que les tissus biologiques. Au fur et à mesure qu'apparaît l'importance de l'environnement mécanique pour les cellules, il devient de plus en plus essentiel de développer des environnements de culture plus proches de la physiologie. Les méthodes de culture et de visualisation de cellule en 3D dans des matrices de bio-polymères de rigidité contrôlée sont en plein essor, malgré les obstacles techniques (FISCHER, MYERS, GARDEL & WATERMAN, 2012).

Objectifs

Lors de l'introduction, une brève description des objectifs de ce travail avait été donnée. Après ces 5 chapitres introductifs qui décrivent le système que nous nous sommes proposées d'étudier, je vais pouvoir revenir avec bien plus de précision sur ces objectifs.

Le système MRTF/SRF a principalement été étudié lors de son activation par des stimulations biochimiques, comme le sérum ou TGF- β , mais on sait que les signaux mécaniques peuvent également l'activer. En effet, la localisation de MRTF dans la cellule est régulée par l'actine, un des constituants principaux du cytosquelette. Tout signal qui vient perturber l'équilibre entre les filaments et les monomères d'actine a donc le potentiel d'influer sur la localisation de MRTF dans la cellule et donc sur l'activation de SRF. Deux voies principales et complémentaires ont été identifiées : la voie RhoA augmente la polymérisation de l'actine en favorisant l'elongation des filaments et en défavorisant leur destruction, ce qui encourage l'import de MRTF vers le noyau, tandis que la voie MICAL expulse l'actine hors du noyau, ce qui bloque la sortie du noyau. Ces deux voies concourent à une MRTF-A localisée dans le noyau, où elle peut activer la transcription par SRF.

L'objectif principal de cette thèse est alors d'étudier plus en détail l'activation mécanique de MRTF/SRF par l'intermédiaire de l'actine. Comment l'actine se réorganise-t-elle suite à une stimulation mécanique, et comment cela influe-t-il sur la localisation de MRTF-A dans la cellule ? La réorganisation du cytosquelette d'actine en réponse à une stimulation mécanique est-elle suffisante pour accumuler MRTF-A dans le noyau ? Comment le système répond-il à des contraintes mécaniques d'intensité différentes, à une échelle locale ou globale ? Quelles sont les échelles de temps mises en jeu ? Quelles voies sont activées ? Les propriétés mécaniques des cellules changent-elles ?

Pour répondre à ces questions, il faut coupler les techniques de physique et de biologie : construire des dispositifs permettant d'exercer des contraintes contrôlées à l'échelle de la cellule et en même temps de visualiser en microscopie de fluorescence les protéines en jeu, actine et MRTF-A. Pour cela j'ai conçu des pinces magnétiques, qui permettent d'exercer des forces locales et contrôlées au niveau d'une cellule unique, et un étireur de cellules qui permet d'appliquer une déformation statique au substrat sur lesquelles sont les cellules. Les deux techniques permettent l'observation en direct en microscopie de fluorescence de la localisation des protéines. MRTF-A et l'actine ont été visualisées en immuno-

fluorescence, ou à l'aide de versions fluorescentes transfectées dans les cellules (MRTF-A GFP et actine mCherry). L'observation de l'actine s'est révélée être un paramètre critique et un grand nombre de marqueurs des filaments d'actine ont été testés. Tout ces techniques sont présentées dans le chapitre suivant, décrivant les méthodes expérimentales, tandis que les résultats sont présentées dans les deux derniers chapitres.

Chapitre 6

Méthodes et dispositifs expérimentaux





FIGURE 6.1 – C2C12 en culture sur du verre, avec des billes de 4,5 µm de diamètre, observées au microscope avec un objectif à immersion à huile 100X.

6.1 Culture cellulaire

6.1.1 Type cellulaire : les C2C12

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

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

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

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

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

Culture sur PDMS ou sur verre des C2C12

Pour réaliser les différentes expériences de rhéologie cellulaire, les cellules doivent être cultivées sur d'autres substrats que dans les boîtes de culture : 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 passés dans un four à plasma pendant 2 minutes afin de rendre leur surface hydrophile. Cette opération les stérilise également. Les lamelles de verre doivent être stérilisées 30 minutes à l'aide d'un rayonnement UV.

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

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

6.1.2 Les myoblastes primaires

Durant la fin de ma thèse, Tiana Jacquemart, en stage de M1 dans notre équipe, a réalisé des expériences sur des myoblastes primaires de souris. Ces myoblastes avaient été infectés avec un lentivirus par Alessandra Pincini, en post-doc à l'Institut Cochin et dans notre laboratoire, pour leur faire exprimer MRTF-A GFP (voir les précisions dans les sous-sections suivantes).

Les myoblastes primaires sont plus fragiles, et doivent être cultivées dans des conditions différentes des C2C12. Ils sont cultivés dans un milieu de prolifération composé de DMEM F12 sans Glutamax avec HEPES, supplémenté de 16,7% de Serum de Veau Foetal (SVF), 1% d'un mélange d'antibiotiques et d'anti-mycotiques (Anti-Anti (100x), Gibco), 1.6% de Glutamine et 2% d'Ultroser (Pall). Ce milieu est donc beaucoup plus riche en facteurs de croissance que le milieu de culture des C2C12.

Elles sont cultivées dans des boîtes de Petri de diamètre 10 ou 15cm recouvertes de 5 à 10 ml de gélatine 0,02% (préparée avec de l'eau stérile).

Lorsqu'elles sont proches de la confluence, il faut rincer les cellules avec du PBS (Phosphate Buffered Saline) et les laisser incuber 1 minute à 37°C dans un mélange Trypsine/EDTA. Une fois les cellules décollées, elles sont suspendues dans un tube avec 10 ml de milieu de culture sans Ultroser, mélangées puis comptées. La quantité désirée de cellules (en général une centaine de milliers) est alors centrifugée 7 minutes à 1700 tours/minute. Le surnageant est jeté, et le culot suspendu dans le milieu de culture, cisaillé et ensemencé dans une nouvelle boîte de Petri.

Culture sur Flexcell

Les myoblastes primaires adhèrent mal sur les lamelles de PDMS recouvertes de fibronectine que nous utilisons pour les expériences d'étirement pour

les C2C12. Après divers essais, Alessandra Pincini a mis au point un protocole qui consiste à les ensemencer sur des lamelles de Flexcell (Flexcell International Corporation) qui sont vendues déjà recouvertes de collagène I. Après un passage comme décrit dans le paragraphe précédent, on ensemence environ 100 000 cellules sur une lamelle de Flexcell d'environ 30mm de diamètre. Lorsqu'elles sont dans leur milieu de prolifération, les cellules primaires sont très motiles, et donc peu sensibles à l'étirement. C'est pourquoi, pour se rapprocher des conditions des C2C12, pour les expériences d'étirement, leur milieu est remplacé par celui utilisé pour les C2C12 (DMEM sans rouge de phénol à 4,5g/L de L-Glucose supplémenté de 10% de SVF et de 1% d'antibiotiques).

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

Trois techniques ont été utilisées pendant cette thèse pour visualiser nos deux protéines d'intérêt, l'actine et MRFT-A, dans les cellules.

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

La seconde fait appel à des molécules spécifiquement dirigées contre notre protéine d'intérêt et couplées à un fluorophore. C'est le cas par exemple de la phalloïdine, drogue issue de l'Amanite Phalloïde qui a la propriété de se fixer aux filaments d'actine.

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

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

Visualiser le cytosquelette d'actine dans le cadre des expériences sur MRFT-A

L'observation en direct du cytosquelette d'actine est particulièrement intéressant car le système est très dynamique, ce que ne peuvent pas capturer

les expériences sur cellules fixées. Cependant, cela signifie qu'il faut trouver un moyen d'observer l'état du cytosquelette en le perturbant le moins possible.

Durant cette thèse, j'ai testé quatre moyens d'observer l'actine ou les filaments d'actine dans les cellules vivantes. Tous se sont finalement révélés perturber dans une certaine mesure l'état du cytosquelette.

La première méthode pour observer de l'actine dans les cellules vivantes est de leur faire exprimer, en plus de l'actine endogène, une actine fluorescente, en l'occurrence ici une actine dotée d'un fluorophore mCherry. Elle a l'avantage de marquer toute l'actine, et pas seulement les filaments comme les méthodes qui seront présentées après. Mais elle a le désavantage de faire sur-exprimer l'actine à la cellule, de manière variable d'une cellule transfectée à l'autre. Or MRTF-A est une sonde extrêmement sensible de la quantité de G-actine dans la cellule. Sur-exprimer l'actine augmente la quantité totale d'actine G, et a un effet très visible sur MRTF-A, comme il sera présenté au chapitre 8.

Les trois autres méthodes sont des détecteurs qui marquent uniquement les filaments d'actine, avec l'avantage de voir plus nettement la structure du cytosquelette. Il est à noter qu'actuellement il n'existe aucune sonde commercialisée pour observer l'actine monomérique *in vivo*, même si une sonde a été développée récemment à partir des groupes RPEL de MRTF-A (BELIN, CIMINI, BLACKBURN & MULLINS, 2013).

La LifeAct est une petite protéine de seulement 17 acides aminés qui se lie aux filaments d'actine (RIEDL et al., 2008). Adjointe à un fragment de protéine fluorescente, comme la GFP ou mCherry, elle permet d'observer les filaments dans les cellules vivantes. Son ADN doit être transfété dans la cellule pour y être exprimé avant observation. Elle a été présentée comme un moyen d'observer les filaments sans les perturber, et sans affecter leur polymérisation et leur dépolymérisation. Cependant, et comme ce sera présenté au chapitre 8, la LifeAct n'est pas complètement sans influence sur le cytosquelette d'actine. On constate une tendance à stabiliser les filaments d'actine qui est visible par l'observation de MRTF-A.

La F-tractin (JOHNSON & SCHELL, 2009) est un fragment de protéine constitué des 66 premiers acides aminés de l'inositol trisphosphate 3-kinase A, qui se lie aux filaments d'actine. Comme la LifeAct, sa séquence codante doit être exprimée par la cellule avant observation. Comme la pour LifeAct, j'ai également observé une tendance de la F-tractin à stabiliser suffisamment les filaments d'actine pour affecter la localisation de MRTF-A.

Enfin, la SiRactine est une des dernières sondes développées pour marquer les filaments d'actine *in vivo* (LUKINAVICIUS et al., 2014). Il s'agit d'un fluorophore Silicone-Rhodamine conjugué à un fragment de jasplakinolide, drogue connue pour se lier aux filaments d'actine et les stabiliser. Cette construction a pour particularité, par un mécanisme d'activation, d'être 100 fois plus fluorescente lorsqu'elle est liée aux filaments d'actine que dans l'état non-lié, ce qui minimise le bruit de fond et permet d'observer en fluorescence la dynamique de polymérisation / dépolymérisation d'actine. La qualité de la fluorescence devait permettre d'utiliser la SiR-actine dans des quantités suffisamment faibles pour que l'influence stabilisatrice du jasplakinolide sur les filaments d'actine soit

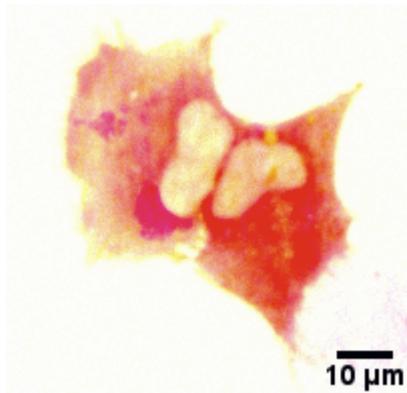


FIGURE 6.2 – C2C12 transfectées avec un plasmide MRTF-A GFP (en rouge) et un plasmide Actine Mcherry (en jaune)

négligeable. Un effet sur les expériences avec MRTF-A est néanmoins visible.

MRTF-A est une sonde extrêmement sensible de l'état du cytosquelette de la cellule, et toutes les méthodes que nous avons utilisées pour visualiser le cytosquelette *in vivo* ont montré des effets sur sa localisation dans une population de cellules.

6.1.4 Transfections

Afin de visualiser les protéines qui nous intéressent, on ajoute aux cellules de l'ADN non chromosomique d'origine bactérienne appelés plasmides qui codent pour une version fluorescente de nos protéines d'intérêt. Ces plasmides sont intégrés aux cellules grâce à des agents 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 variable d'une cellule à l'autre, selon la quantité de plasmide qui a été intégrée par la cellule : certaines cellules n'ont incorporé aucun plasmide et ne sont donc pas fluorescentes, d'autres en ont incorporé une grande quantité et sont très fluorescentes.

La transfection est d'autant plus efficace que les cellules sont proches de la confluence. Cependant, comme 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.

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

Protocole de transfection à la nanofectine

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 µg de nanofectine (PAA Nanofectin Kit)
- 1 µg d'ADN de MRTF-A GFP
- (option 1 : Actine McCherry) 1 µg d'ADN d'Actine McCherry
- (option 1 : Actine McCherry) 1 µg de nanofectine
- (option 2 : LifeAct RFP) 0,75 µg d'ADN de LifeAct RFP
- (option 2 : LifeAct RFP) 0,75 µg de nanofectine
- 2*50 µl de NaCl 150mM
- (option 1 ou 2) 2*50 µl de NaCl 150mM
- 0,9ml de milieu complet (transfection simple uniquement)
- (option 1 ou 2) 0,8 ml de milieu complet

Protocole :

1. Diluer dans un eppendorf 1 µg de MRTF-A GFP dans 50 µl de solution de NaCl 150mM.
2. Diluer de même 1 µg de nanofectine
3. (option 1 ou 2) Répéter ces deux étapes avec l'Actine mCherry ou la LifeAct RFP
4. Transvaser le contenu de l'eppendorf de nanofectine dans l'eppendorf d'ADN (le sens est important)
5. (option 1 ou 2) Répéter l'opération pour les deux autres tubes
6. Laisser incuber 30 minutes à 37 °C
7. Transvaser le ou les mélange(s) nanofectine + ADN dans du milieu complet de façon à obtenir 1 ml de solution
8. Rincer les cellules
9. Ajouter le mélange nanofectine + ADN + milieu complet sur les cellules
10. Laisser incuber à 37 °C pendant au moins 6 heures
11. Enlever le mélange, rincez et remplacez avec du milieu complet

CHAPITRE 6. MÉTHODES ET DISPOSITIFS EXPÉRIMENTAUX

12. Laisser les cellules exprimer le plasmide entre 12 et 24h après rinçage

Protocole de transfection à la lipofectamine

Suite au rachat de notre fournisseur, la nanofectine n'est plus commercialisée. Les expériences suivantes ont donc été réalisées avec de la lipofectamine (Lipofectamine 3000 Transfection Kit, Invitrogen). Deux protocoles sont décrits ici en même temps : MRTF-A GFP avec et sans F-tractine RFP.

Ingédients :

- Des C2C12 ensemencées dans un puits d'une plaque 6 trous
- 6 µl de lipofectamine 3000
- 1 µg d'ADN de MRTF-A GFP
- 2 µl de P3000 Reagent
- (option 1 : F-tractine) 1 µg d'ADN de F-tractine RFP
- (option 1 : F-tractine) 6 µl de lipofectamine 3000
- (option 1 : F-tractine) 2 µl de P3000 Reagent
- 2*125 µl d'OptiMEM (Opti-MEM I Reduced Serum Medium, Gibco)
- 1,75ml de milieu complet (transfection simple uniquement)
- (option 1) 4*125 µl d'OptiMEM
- (option 1) 1,5ml de milieu complet

Protocole :

1. Dans l'eppendorf n° 1, mélanger 6 µl de lipofectamine 3000 et 125 µl d'OptiMEM.
2. (option 1) Répétez cette étape dans l'eppendorf n° 1bis.
3. Dans l'eppendorf n° 2 mélanger 1µg de plasmide MRTF-A GFP, 2 µl de P3000 Reagent et 125 µl d'OptiMEM.
4. (option 1) Dans l'eppendorf n° 2bis mélanger 1µg de plasmide F-tractine, 2 µl de P3000 Reagent et 125 µl d'OptiMEM.
5. Transvaser le contenu de l'eppendorf n° 2 dans l'eppendorf n° 1.
6. (option 1) Transvaser le contenu de l'eppendorf n° bis2 dans l'eppendorf n° 1bis.
7. Laisser incuber 5 minutes à 37°C.
8. (MRTF-A GFP seule) Mélanger à 1.75 ml de DMEM sans rouge de phénol.
9. (option 1) Mélanger les eppendorfs n° 2 et n° 2bis à 1.5 ml de DMEM sans rouge de phénol
10. Rincer les C2C12 et leur ajouter les 2ml de solution.
11. Laisser incuber une nuit à 37 °C.
12. Ne pas rincer avant les expériences.

6.1.5 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.

6.1.6 Marquage SiRactine sur cellules vivantes

La SiRactine est un marqueur des filaments d'actine qui peut être ajouté aux cellules vivantes avant l'observation. Elle a un pic d'absorption à 652 nm et un pic de fluorescence à 674 nm, ce qui la rend compatible avec les plasmides fluorescents dans le vert (comme la GFP) et dans le rouge (comme la mCherry ou la RFP).

La SiRactine pouvant avoir un effet de stabilisation des filaments d'actine, lorsqu'on l'utilise sur des cellules vivantes, il faut trouver la concentration minimale nécessaire à l'observation. Plus la concentration utilisée est faible, plus il faudra la mettre longtemps à l'avance sur les cellules.

La quantité de SiRactine désirée est ajoutée la veille ou 3 heures avant l'observation (selon la concentration) sur les cellules, et ne doit pas être rincée.

Une série de dilutions allant de 50nM à 500nM a été testée préalablement aux expériences, puis trois conditions ont été utilisées : 50 nM incubé toute la nuit, 50nM incubé 3 heures et 2,5nM incubé toute la nuit.

6.1.7 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.

6.1.8 Marquages sur cellules fixées

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

Perméabilisation

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

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

Phalloïdine

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

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

DNaseI

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

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

MRTF-A endogène

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

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

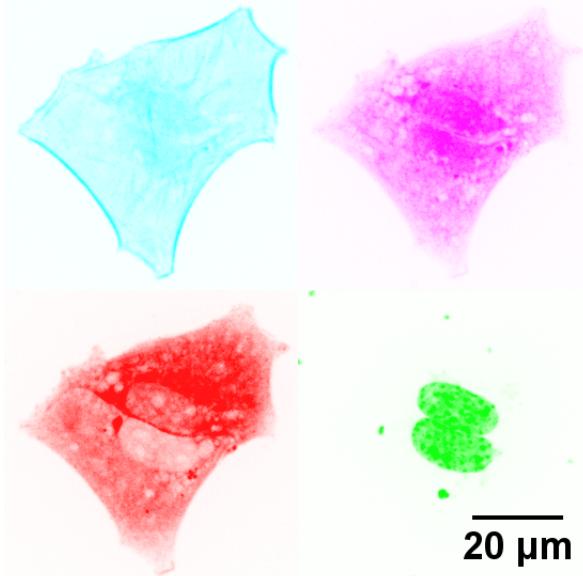


FIGURE 6.3 – C2C12 transfectées MRTF-A GFP (ici en rouge), fixées et marquées phalloïdine Alexa647 (ici en cyan), DNaseI Alexa547 (ici en magenta) et DAPI (ici en vert)

Protocole de marquage quadrichrome

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

Ingrédients pour une lamelle :

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

Protocole pour une lamelle :

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

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

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

6.2 Pinces magnétiques

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

Pour étudier la rhéologie cellulaire, on va alors exercer une force connue sur la bille, et mesurer au microscope son déplacement, et donc la déformation de la cellule. Nous nous sommes placés ici en régime de fluage, plus adapté à la pince magnétique. La bille exerce une contrainte constante sur la cellule σ_0 , qui est reliée à la déformation de la cellule par la relation :

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

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

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

6.2.1 Description

Principe

Lorsqu'on applique un champ magnétique

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

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

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

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

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

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

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

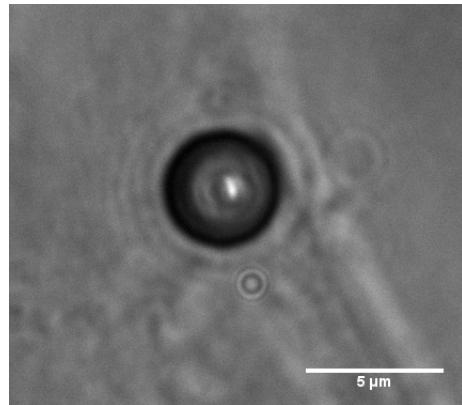


FIGURE 6.4 – Bille Dynabeads M-450 observée en grossissement 150X.

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

Billes superparamagnétiques

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

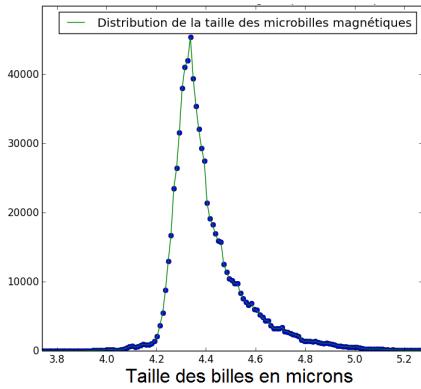


FIGURE 6.5 – Fonction de distribution de taille des billes magnétiques utilisées dans 191 expériences de pinces. Pour chaque expérience, lorsque la bille est suivie par le logiciel d’analyse d’image, son grand axe et son petit axe sont mesurés pour chaque temps. La fonction est asymétrique car lorsque la bille n’est pas tout à fait au point, son diamètre apparaît plus grand.

Électroaimant

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

Le cœur Deux types de cœur ont été testés : un cœur en fer doux (diamètre : 5.30mm, longueur : 52.17mm) et un cœur en mu-métal, un alliage de grande perméabilité magnétique (diamètre : 5,10mm , longueur : 143,64mm).

Une extrémité du barreau est taillée en pointe. La forme de pointe permet d’augmenter le gradient de champ magnétique en resserrant les lignes de champ à cet endroit. Il est très important de conserver sa symétrie cylindrique, et d’avoir le rayon de courbure le plus faible possible au bout de la pointe. Les résultats obtenus sont visibles en figure 6.6. Étant en fer doux, le barreau est très malléable, il faut donc le manipuler avec précautions : le moindre choc aplati la pointe. Le barreau a été usiné au tour à l’atelier de mécanique, puis pour la taille d’entretien de la pointe, on monte le barreau sur une perceuse sur pied, 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, collée sur une pièce métallique inclinée avec un angle de 30 ° .

L’angle optimal pour maximiser le gradient peut être calculé (DURAND, 1953), il vaut environ 55°. Ici, on doit aussi prendre en compte le fait que la pointe doit être approchée de biais au-dessus de la lamelle d’échantillon. Il nous faut donc un angle plus faible que l’angle optimal, trop obtus. On a fixé cet angle à 30 ° , car il est prévu d’approcher la pointe de la lamelle sur laquelle seront les cellules avec un angle de 45 ° , comme représenté sur la figure 6.8 .

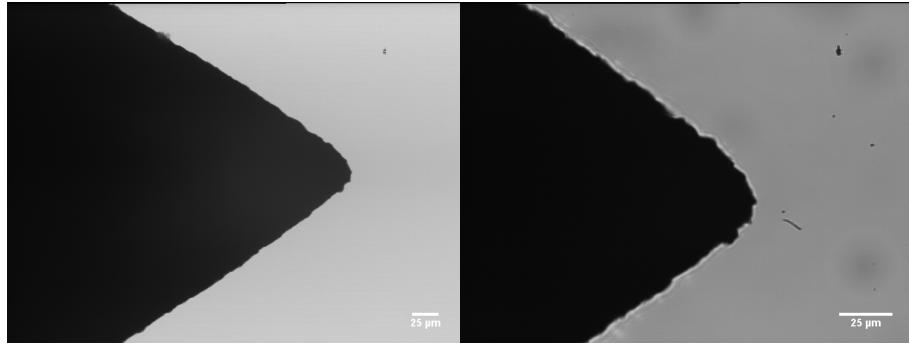


FIGURE 6.6 – À gauche une image de la pointe en fer doux au grossissement X20. À droite, la même pointe au X40. Le rayon de courbure mesuré est de l'ordre de $20\mu\text{m}$.

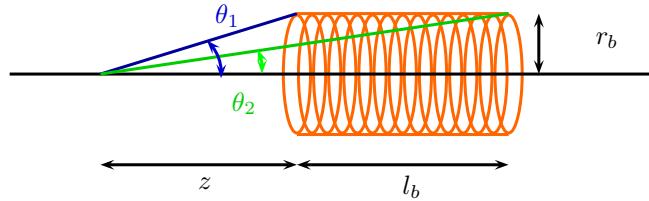


FIGURE 6.7 – Illustration des paramètres nécessaires au calcul du champ \vec{B} .

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 vaut :

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

Sa valeur dépend du nombre n de spires par mètre, de la longueur de la bobine l_b , de son rayon r_b et du courant I qui la traverse. 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 R de la bobine dépend de la section du fil s , de sa longueur totale L et de γ la conductivité du cuivre :

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

Le nombre de spires par mètre est directement reliée à la section du fil :

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

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 n_c , le nombre de spires par mètres est aussi relié à la longueur totale de fil L .

$$R \propto L \approx n_c \frac{\pi r_b l_b}{r_f}$$

où l_b sa longueur, r_f le rayon du fil.

$$n = n_c \frac{1}{2r_f}$$

Pour augmenter n_c en augmentant le moins possible R , il faut alors minimiser le rapport $\frac{\pi r_b l_b}{r_f}$. On a choisi r_f le plus grand disponible, on prend également r_b le diamètre de la bobine le plus petit possible.

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 et de diamètre intérieur égal à celui du cœur. Sa résistance est mesurée à $3,3\Omega$ et son inductance à $1,2\text{mH}$.

L'aluminium est un bon support pour la bobine car il est à la fois léger, car il ne faut pas surcharger le micromanipulateur qui portera l'électro-aimant dans le montage final, et qu'il conduit bien la chaleur dégagée par l'effet Joule pour qu'elle soit évacuée vers le cœur. L'aluminium a pu également être taraudé à une extrémité afin d'y attacher une vis de support en laiton 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 (Measurement Computing 1208 HS4AO), 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.

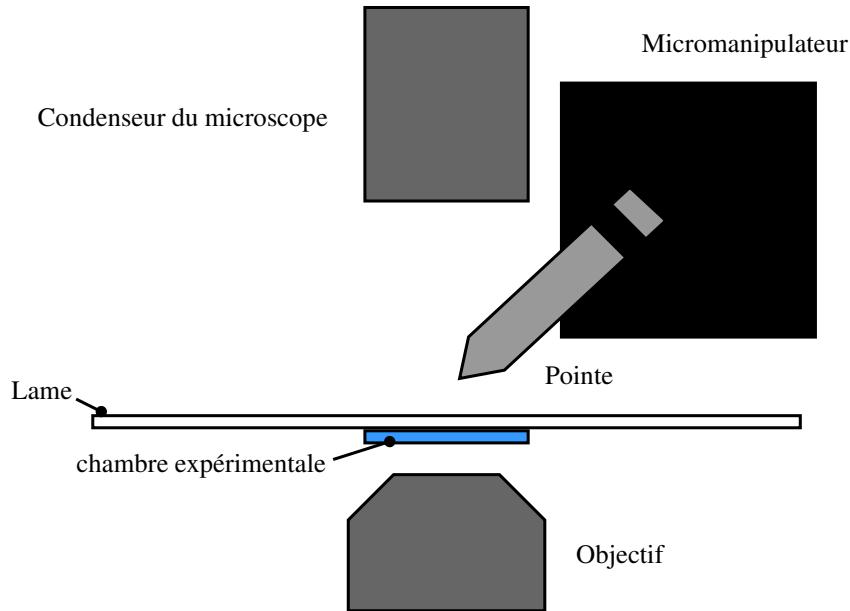


FIGURE 6.8 – Schéma du montage expérimental de la pince magnétique.

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 $0.1\mu\text{m}$), 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 22mm*64mm*0.15mm, on monte un séparateur (GeneFrame Spacer AB-0577, Thermo Scientific) 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 HQ2) 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

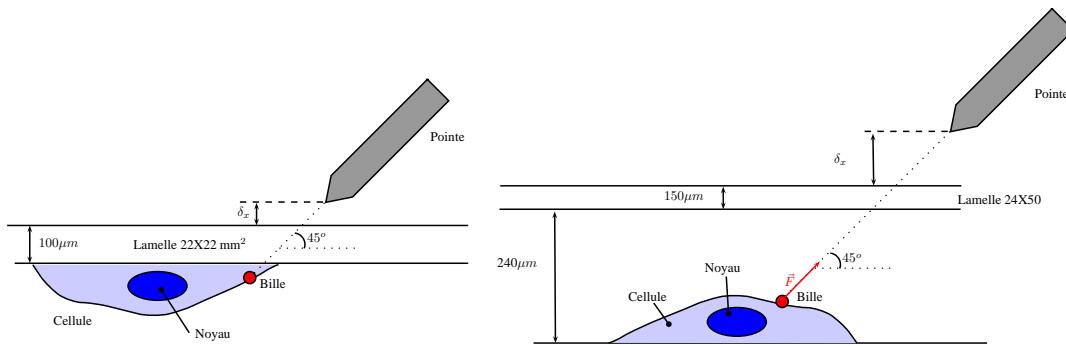


FIGURE 6.9 – Schéma des deux montages possibles de la lamelle par rapport à l'objectif et à la pince magnétique.

sont les cellules peuvent être placées en haut, du côté de la pointe de l'électro-aimant, ou au contraire en bas, proche de l'objectif du microscope.

Dans le premier cas, la distance entre la pointe de l'électro-aimant et la bobine peut être réduite à $280\ \mu\text{m}$, ce qui permet d'exercer de grandes forces, de l'ordre du nanoNewton. Cependant, la distance entre l'objectif et les cellules est alors d'au moins $400\ \mu\text{m}$, et ne permet pas d'utiliser d'un objectif à immersion, nous restreignant à des grossissements inférieurs à $40\times$.

Dans le second cas, on peut au contraire utiliser des objectifs à immersion à huile $100\times$, 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 $160\ \text{pN}$.

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.

6.2.2 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 donnée. 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 $U \ll 167 m.s^{-1}$. On peut donc en conclure que l'inertie est complètement négligeable devant les effets visqueux 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.

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 $240\mu m$ de hauteur formée par un séparateur entre 2 lamelles de microscope, et l'influence de la lamelle supérieure ou de la lamelle inférieure ne peut pas être exclue. On note 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 $\frac{\eta}{T} = 0.0178 Pa.s.^{\circ}C$ autour de $24^{\circ}C$.

Le modèle de Stokes est donc corrigé ainsi :

$$F_{mag} = 3\pi \left(\eta_{24^{\circ}C} - \frac{\eta}{T} \left(\frac{T_{fin} - T_{init}}{2} - 24 \right) \right) * \left(\frac{d_{max} + d_{min}}{2} \right) * \left(1 + \frac{d}{h} \right) * \vec{U} \quad (6.1)$$

Montage et protocole

L'électro-aimant est monté sur le micromanipulateur à l'horizontale. On suspend 1 μl de suspension 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 $240\mu m$ 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, d'un 20X et d'une caméra reliée à un ordinateur. Le protocole d'étalonnage est alors le suivant :

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.

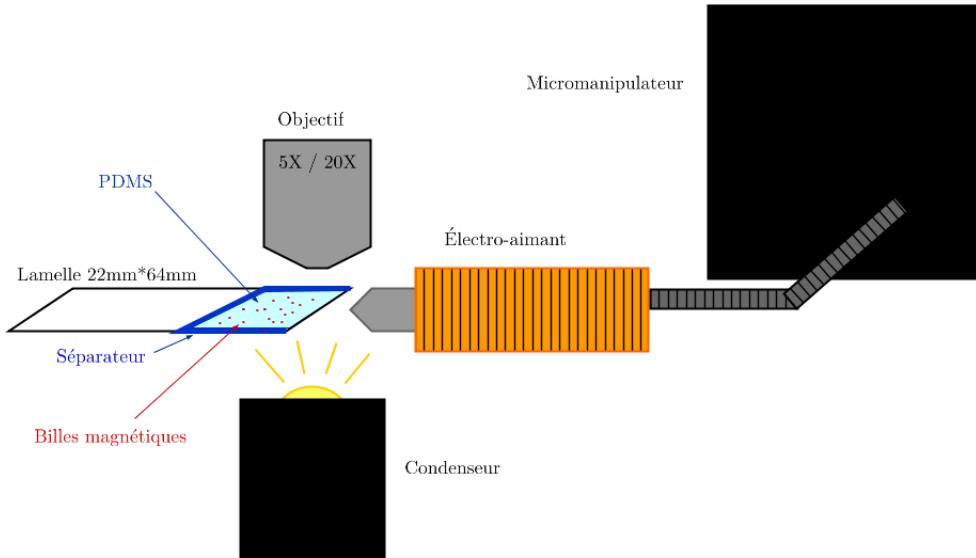


FIGURE 6.10 – Montage expérimental utilisé pour calibrer les pinces magnétiques.

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 cours 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

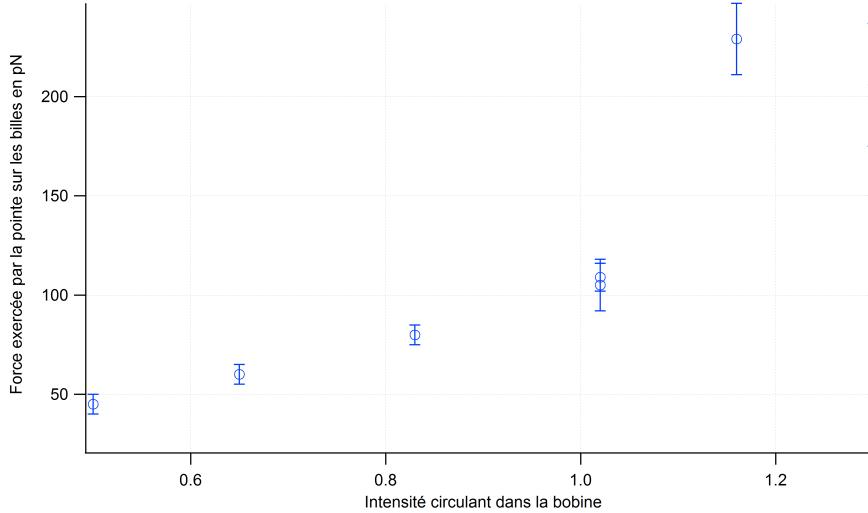


FIGURE 6.11 – Courbe de calibration des forces exercées à $700\mu\text{m}$ de la pointe.

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 différentes 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 $(x_p, y_p)_{20X}$.

Nous nous situons 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 augmente.

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 de la trajectoire sur quarante points (donc 8 secondes), en déduire la vitesse $U(t)$ de la bille.
- À l'aide de la formule de Stokes corrigée 6.1, estimer la force exercée par la pointe sur la bille.

On obtient donc une série de courbes de calibration, 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.

6.2.3 Protocole de mesures mécaniques

Préparation des cellules et des billes

Les cellules sont ensemencées sur une lamelle de verre recouverte de fibronectine comme indiqué en section 6.1.1 24 heures avant le début des expériences.

Ingrédients :

Pour la fabrication de la suspension de billes fonctionnalisées :

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

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

Une heure avant la première expérience :

8. Placer l'eppendorf dans la cuve à ultra-sons pendant 15 à 30 minutes en agitant toutes les 5 minutes pour disperser à nouveau les billes
9. Prélever $50 \mu\text{l}$ de suspension et les suspendre dans $950 \mu\text{l}$ de DMEM 1% BSA.

CHAPITRE 6. MÉTHODES ET DISPOSITIFS EXPÉRIMENTAUX

10. Ajouter $75 \mu\text{l}$ de cette 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 cisailant le moins possible pour enlever les billes qui n'ont pas adhéré aux cellules.
13. Ajouter $15 \mu\text{l}$ d'HEPES pour tamponner le milieu pendant l'expérience.
14. Coller le séparateur sur la lamelle 22mm*64mm*15mm lavée à l'alcool 70%
15. Ajouter $65\mu\text{l}$ de milieu 1,5% d'HEPES
16. Monter la lamelle de C2C12 pour fermer la chambre expérimentale.

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

Déroulement de l'expérience de fluage

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

Protocole :

1. Au 20X, repérer la face supérieure de la lamelle au-dessus de la chambre expérimentale.
2. Grâce au vernier de la tour à objectif, placer le plan focal $100 \mu\text{m}$ au-dessus de la lamelle.
3. Approcher la pointe avec le micromanipulateur afin de la placer dans le plan focal et au centre du champ de la caméra.
4. Décaler horizontalement vers la droite la pointe de $240 \mu\text{m}$ dans la configuration courte distance et de $390 \mu\text{m}$ dans la configuration longue distance. La pointe est alors alignée de sorte que l'axe de la bobine passe par le centre du champ d'observation.
5. Mémoriser cette position et éloigner la pointe.
6. Décaler la lamelle, changer d'objectif pour le 100X en configuration longue distance, pour le 40X sinon.
7. Placer une goutte d'huile sur l'objectif s'il s'agit du 100X et repositionner la lamelle.
8. Chercher une cellule sur laquelle a adhéré une bille unique et placer la bille au centre du champ d'observation.
9. Ramener la pointe à la position mémorisée.
10. Alimenter la pointe avec un signal sinusoïdal de fréquence 0.5Hz afin de chercher la plus petite intensité de courant pour laquelle la bille a un mouvement détectable.

11. Régler le GBF pour fournir la tension continue correspondante en réponse à un déclenchement externe (la carte PCI reliée à l'ordinateur).
12. Ajouter la lentille 1.5X dans l'axe optique.
13. Sélectionner une zone restreinte autour de la bille qui va être acquise par la caméra.
14. Lancer l'exécution du script sous MicroManager.

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

Phase 1 : de t=0 à t=12s

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

Phase 2 : de t=12s à t=125s

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

Phase 3 : de t=125s à t=250s

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

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

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

6.2.4 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.

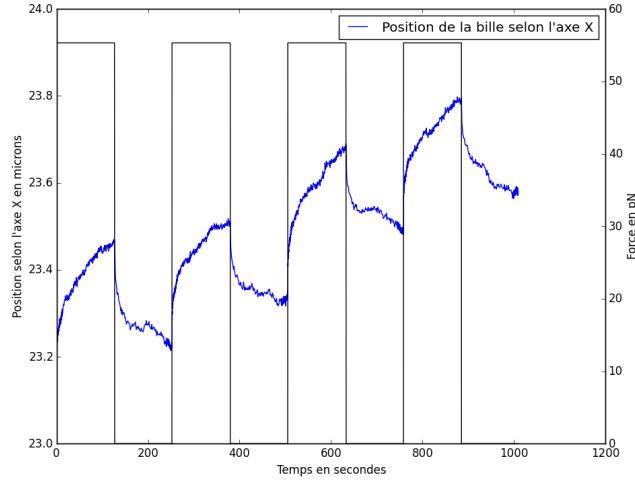


FIGURE 6.12 – Déplacement au cours du temps d'une bille adhérant sur une C2C12 et soumise à 4 créneaux de force de 131pN pendant 125s toutes les 250s.

6.2.5 Fonction de fluage

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

Cependant, pour obtenir des mesures de modules visco-élastiques, il est nécessaire d'utiliser un modèle reliant le mouvement de la bille à la déformation de la cellule, et la force exercée sur la bille à la contrainte subie par la cellule. Plusieurs modèles existent, en particulier un modèle analytique, le modèle développé dans l'équipe par F.Gallet (LAURENT et al., 2002), et un modèle numérique développé dans la thèse d'Alain Kamgoué dans l'équipe de J.Ohayon (KAMGOUÉ, OHAYON & TRACQUI, 2007), mais les deux supposent que la bille est soumise à une force dans le plan d'étalement de la cellule, ce qui n'est pas le cas de notre pince magnétique, qui tire également verticalement.

Le modèle de Gallet suppose que la bille est enfoncee d'un angle 2θ 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 ($h_u \rightarrow \infty$) 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 :

$$J(t) = 2\pi a \frac{2}{3} \left(\frac{1}{\left(\frac{3}{2\sin\theta} + \frac{\cos\theta}{\sin^3\theta} \right)} \right) \frac{\delta R(t)}{F_0} \quad (6.2)$$

où a est le rayon de la bille, θ son demi-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.

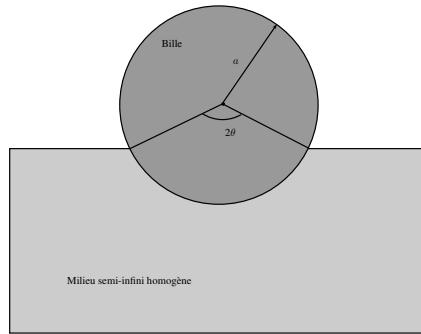


FIGURE 6.13 – Schéma pour le modèle analytique.

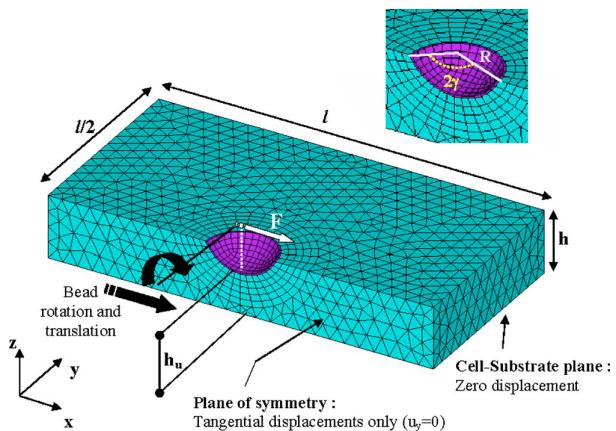


FIGURE 6.14 – Schéma pour le modèle numérique (KAMGOUÉ, OHAYON & TRACQUI, 2007)

Passons en revue les différentes approximations.

L'ancrage de la bille à la cellule est assuré par les liaisons fibronectine-intégrine ponctuellement sur la surface de bille immergée dans la cellule. Il nous est difficile avec les techniques dont nous disposons d'avoir une 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'adhésion 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 comparables ; et souvent, le rayon de la bille est même plus grand que l'épaisseur de la cellule lorsqu'elle est loin du noyau.

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

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

avec h_u la hauteur de la cellule sous la bille, et E le module d'Young de la cellule. Ce qui nous donne, en le mettant sous la même forme que l'équation 6.2 :

$$J = 2\pi a p\left(\theta, \frac{h_u}{2R}\right) \frac{\delta R(t)}{F_0} \quad (6.3)$$

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

Lorsque $h_u \rightarrow \infty$, on retrouve bien $\alpha_{Kamgoue} \rightarrow \alpha_{Gallet}$. Dans des conditions pas trop extrêmes ($\theta < 120^\circ$, $\frac{h_u}{2a} > 0,1$), les deux facteurs restent du même ordre de grandeur.

Les deux supposent une force horizontale, ce qui est faux ici. Ils supposent également, et c'est justifié dans LAURENT et al., 2002, que ce préfacteur est le même pour la composante visqueuse et pour la composante élastique.

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

Les deux modèles font une autre hypothèse, nécessaire pour le calcul, en supposant que le milieu cellulaire est isotrope. Or, 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. Ces observations seront discutées plus en détails dans le chapitre suivant qui présente les résultats.

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

6.3 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.

Les expériences de pinces magnétiques ont l'avantage de nous renseigner quantitativement sur les paramètres rhéologiques de la cellule. Cependant, elles nous obligent à une observation cellule par cellule, ce qui rend la construction d'une étude statistique très longue. Avec l'étireur, on peut observer une trentaine de cellules simultanément pendant deux heures, alors qu'avec les pinces magnétiques on aurait pendant ce temps observé 4 cellules pendant 30 minutes chacune.

6.3.1 Description de l'étireur

Pendant ma thèse j'ai conçu les plans de cet étireur de cellules qui a ensuite été réalisé par l'atelier du laboratoire. Il est composé de trois parties principales : la cuve, le support de lamelle et le plot. Toutes les parties de l'étireur sont en PVC, sauf le plot qui est en plexiglas 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 téflon souple. Cette lamelle de verre est enserrée entre les deux pièces de façon à former une cuve étanche dont le fond transparent permet l'observation.

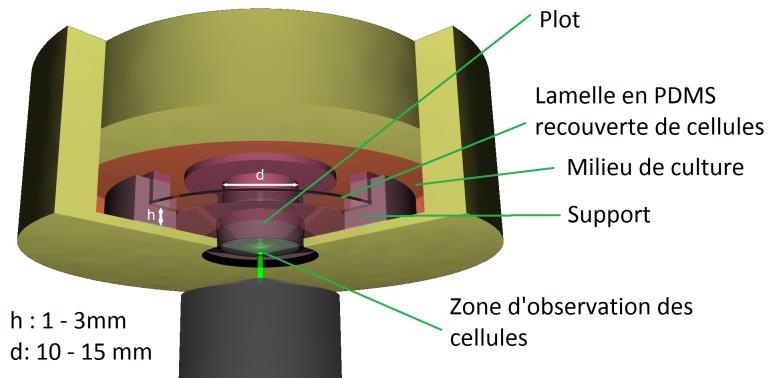


FIGURE 6.15 – Modélisation de l'étireur vu de dessous pendant l'étirement.

La lamelle de PDMS

Les cellules adhèrent à une lamelle de PDMS réticulé élastique recouverte de fibronectine. Cette lamelle est maintenue par le support et déformée par le plot qui la pousse vers le bas. Le PDMS (Sylgard Silicon Elastomer, Dow Corning) 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 90 mm de diamètre et on l'étale par drainage 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 l'élastomère. 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 téflon 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 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. Le pas de vis fin fait descendre de 1mm la membrane à chaque tour. 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 14mm, qui permettent également de régler l'étirement subi par le PDMS.

6.3.2 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 :

$$\alpha = \frac{R_p}{R_l} < 1 \quad \beta = \frac{h}{R_l}$$

$$\frac{\Delta A}{A} = \alpha^2 - 1 + (\alpha + 1)\sqrt{\beta^2 + (1 - \alpha)^2}$$

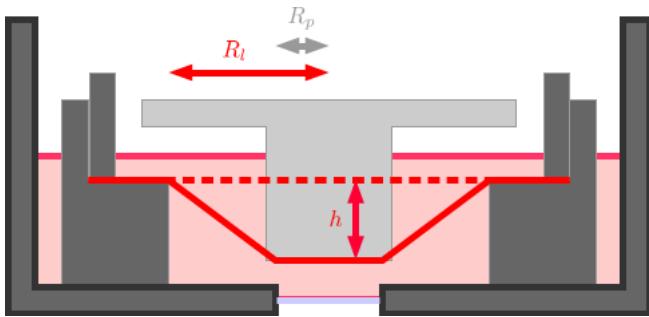


FIGURE 6.16 – Modèle simple de la déformation créée par l'étireur. R_p est le rayon du plot, R_l le rayon de la lamelle qui n'est pas maintenu par le support et h la hauteur d'enfoncement du plot.

Afin de le comparer à l'étirement réel subi par la lamelle de PDMS, des lamelles ont été recouvertes de Pluronic (Pluronic F-127, Sigma Aldrich), un copolymère photosensible, puis exposées à un rayonnement UVC afin d'oxyder le Pluronic à travers un masque de quartz imprimé d'une fine couche de métal formant 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.

Ingrédients :

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

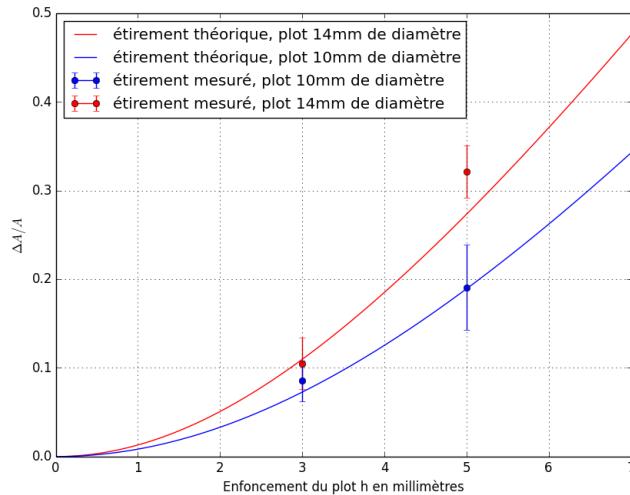


FIGURE 6.17 – Résultats de la calibration de l'étireur pour les différents étirements utilisés comparés au modèle théorique, pour $R_p = 5$ ou 7 mm et $R_l = 12$ mm. Il est à noter que le modèle théorique n'est pas ajusté, il est calculé à partir des paramètres géométriques de l'étireur.

Protocole

1. Préparer une solution de Pluronic 0,2% en masse
2. Laisser incuber 1 ml de la solution de Pluronic pendant une heure à température ambiante
3. Rincer au PBS, puis à l'eau, laisser sécher
4. Exposer la lamelle derrière le masque aux UVC pendant 7 minutes
5. Diluer 4 µg de fibronectine fluorescente dans 1 ml de PBS
6. Laisser la solution de fibronectine incuber 30 minutes à 37 °C sur la lamelle, à l'abri de la lumière
7. Rincer au PBS et stocker 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'étiement 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.

6.3.3 Le microscope confocal

Pour les expériences d'étiement, nous avons utilisé le microscope confocal du laboratoire car il dispose d'une platine motorisée, de 4 lasers et des filtres au-

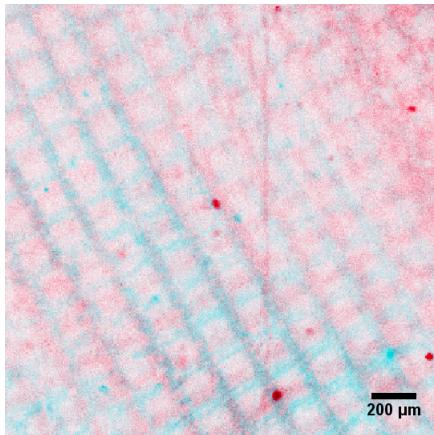


FIGURE 6.18 – Superposition des images prises en microscopie de fluorescence du quadrillage de fibronectine Cy3 imprimé sur une lamelle de PDMS avant (en rouge) et après (en cyan) étirement. Ces images ne représentent qu'une petite partie de la surface étirée totale, car l'image originale du plot tout entier est trop grande pour être présentée ici.

tomatisés. 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.

Description générale Le microscope confocal est un modèle « spinning disk » d'Andor, composé :

- d'un microscope inversé Olympus IX81
- de 4 lasers Andor Laser Combiner 400 series et des AOTF qui permettent de couper une partie de leur puissance.
- 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 platine piézo de réglage pour l'axe Z Andor APZ-100
- d'une caméra EMCCD IXON+ Andor Technologies
- 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 à air Olympus à grande distance de travail (Olympus LUCPL-FN 20X, ouverture numérique 0.45, distance de travail 6.6 - 7.8 mm).

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

6.3.4 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 le milieu pendant la durée de l'expérience. L'étireur complet est alors placé sur la platine du microscope et observé à l'aide d'un objectif 20X (Olympus LUCPLFLN 20X, ouverture numérique 0.45, distance de travail 6.6 - 7.8 mm). 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.

6.3.5 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 sur-expression d'actine lors de la transfection avec une actine mCherry modifie de manière très visible l'équilibre entre MRTF-A

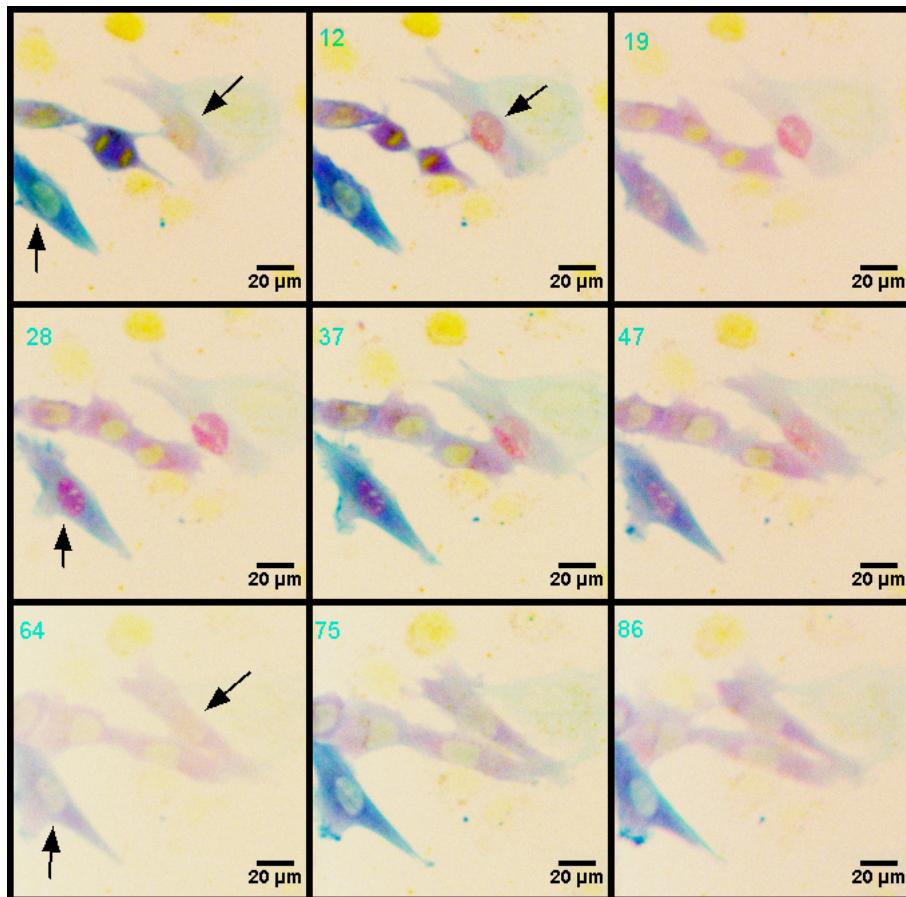


FIGURE 6.19 – C2C12 transfectées MRTF-A GFP (en rouge) et Actine mCherry (en bleu), marquées au DAPI (en jaune), étirées à 30% pendant 120 minutes. Dans les deux cellules marquées d'une flèche, MRTF-A s'accumule dans le noyau, puis retourne dans le cytoplasme.

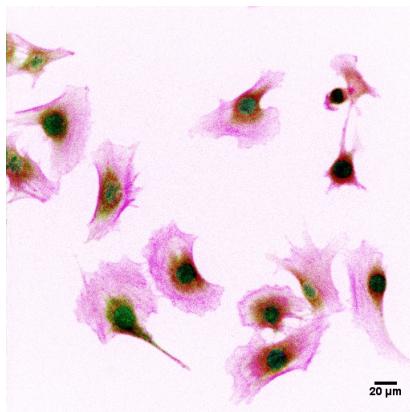


FIGURE 6.20 – C2C12 marquées par la phalloïdine (ici en magenta), par la DNase I (en jaune), un anticorps anti-MRTF-A (en rouge) et le DAPI (en vert).

et l'actine G, ce qui sera présenté au chapitre 8, la LifeAct RFP, qui marque les filaments d'actine, est exprimée tellement intensément que sa fluorescence empiète sur celle de MRTF-A GFP. La différence d'expression des deux plasmides peut être en partie due à la différence de poids moléculaire des deux protéines : MRTF-A est une grosse protéine d'environ 150 kDa, alors que la Life ne fait que 17 acides aminés de long. De plus, il n'existe pour l'instant aucun marqueur commercial permettant de visualiser l'actine G dans les cellules vivantes.

Fixer les cellules nous permet d'avoir un marquage quadrichrome : la F-actine en rouge-profound grâce à la phalloïdine Alexa 647, la G-actine en rouge grâce à la DNaseI Alexa 594, MRTF-A GFP ou anticorps anti-MRTF-A en vert et l'ADN du noyau en bleu grâce au DAPI.

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

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

6.3.6 Dépouillement des images

Étirement observé en direct, traitement qualitatif

On obtient après une observation en direct d'étirement typique une vingtaine de série d'images de cellules observées pendant 120 minutes après étirement, comme la série exposée en figure 6.19 le présente. Les images sont observées grâce à ImageJ, qui nous permet de reconstituer une pile d'images en 4 dimensions (x, y, temps et couleur). On peut alors observer qualitativement à l'œil s'il y a plus de MRTF-A GFP dans le noyau, dans le cytoplasme, ou si la répartition est homogène.

Toutes les données finales sont destinées à être stockées dans une base de données 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 et interroger la base de données, j'ai également créé une interface en Python. Cette interface récupère dans les métadonnées des images prises au microscope les temps auxquels 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 en vert, 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.

6.4 Tests statistiques

De manière générale, les expériences de biophysique réalisées sur des cellules sont plus difficiles à reproduire que des expériences de physique classique. En effet, les cellules au sein d'une population ont une certaine variabilité dans leurs caractéristiques et dans leur comportement : elles ne sont pas de la même taille, ni de la même forme, elles sont à des étapes différentes de leur cycle cellulaire ... Pour avoir une idée du comportement général, il faut refaire les expériences sur une population de cellules, ce qui va permettre de dégager les tendances générales à toute la population. Lorsque deux populations a priori identiques de cellules ont été soumises à des conditions expérimentales, elles peuvent donner des résultats différents. Les tests statistiques servent alors à estimer les chances que ces différences ne soient dues qu'au hasard des fluctuations, et non aux différences de conditions expérimentales. Les données récoltées durant ces expériences sont de deux catégories : certaines sont des nombres (comme l'aire des cellules, les paramètres rhéologiques, les intensités de fluorescence ...), d'autres sont des données qualitatives (comme la localisation majoritairement cytoplasmique, homogène ou nucléaire de MRTF-A). Dans ce second cas, on compte la quantité de cellules dans chaque catégorie, et on cherche à savoir si leur répartition dans deux ou plus conditions expérimentales distinctes est significativement différente. Pour comparer deux distributions de données chiffrées, le test de Student (t-test) est la méthode la plus classique. Elle suppose que les données aient une distribution normale, mais n'est pas extrêmement sensible aux déviations de cette hypothèse, et que les variances sont proches (ce qui peut être faux si les deux échantillons sont de taille trop différentes). Pour comparer des données qualitatives, par exemple la quantité de cellules ayant MRTF-A majoritairement cytoplasmique, homogène ou nucléaire avec ou sans étirement, il faut utiliser des tests spécifiques comme le test de Fischer (lorsqu'il s'agit de petits échantillons) ou le G-test lorsque les échantillons sont suffisamment grands. Ces tests calculent les probabilités que deux répartitions obtenues dans des conditions expérimentales différentes soient issues de la même population. J'ai principalement été guidée dans mes choix de tests statistiques par l'excellent et très pédagogique Biological Handbook of Statistics (<http://www.biostathandbook.com>).

Chapitre 7

Rhéologie locale d'une cellule unique



Les pinces magnétiques ont été construites afin de pouvoir observer l'évolution des caractéristiques mécaniques d'une cellule au cours du temps, lorsque celle-ci est soumise à des forces de manière répétée. L'objectif initial était de poursuivre ainsi une investigation débutée par Delphine Icard avec les pinces optiques. En effet, dans sa thèse, elle avait observé que lorsqu'une force identique est appliquée de manière répétée sur une cellule, elle devient de plus en plus rigide, et que cet effet s'accompagne d'un recrutement d'actine autour du point d'application de la force (ICARD-ARCIZET, CARDOSO, RICHERT & HÉNON, 2008). L'utilisation de pinces magnétiques nous permet de réaliser des expériences sous microscope confocal, ce qui n'était pas possible avec les pinces optiques. Ces expériences couplant mécanique et observations en microscopie de fluorescence seront décrites au chapitre suivant.

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

7.1 Évolution de la rigidité de C2C12 sous l'application d'une force

7.1.1 Protocole expérimental

Séries d'expériences

Trois séries d'expériences ont été réalisées avec les pinces magnétiques. La première série d'expérience a été réalisée sur des C2C12 en testant deux concentrations de fibronectine pour enrober les billes magnétiques : 2 μg ou 4 μg de fibronectine pour 2.10^7 billes dans 500 μL de milieu, ce qui correspond à 1.57 et 3.15 mg de fibronectine disponible par unité de surface des billes. On applique sur ces cellules 4 créneaux de force successifs de 125 secondes chacun suivi de 125 secondes de relaxation.

La seconde série d'expériences a été réalisée sur une autre série de C2C12, issues d'une nouvelle commande à l'ATCC, avec 4 μg de fibronectine pour 2.10^7 billes et 6 paliers de force de 125 secondes et de 125 secondes de relaxation. À la suite des expériences de la série n° 1, il nous est en effet apparu que 4 applications de force ne permettaient pas toujours de caractériser le comportement à long terme de la cellule, et nous avons donc augmenté le nombre d'applications de force.

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

Sélection préliminaire

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

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

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

Sélection a posteriori

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

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

Direction du mouvement des billes

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

La bille est attirée par la pointe de la pince par une force $\vec{F}_{tot} = F_x \vec{u}_x + F_z \vec{u}_z$ dirigée selon l'axe bille-pointe. Comme la pointe fait un angle de 45° avec l'horizontale, on a $F_z \approx F_x = F = F_{tot}/\sqrt{2}$.

Sur la vidéo, on peut observer la position dans le plan XY du centre de la bille, et constater que la bille est bien attirée par la pointe selon X et n'a qu'un mouvement faible selon Y dû aux petits défauts d'alignement de la pointe ou à la forme de la cellule (la bille contourne parfois un obstacle comme le noyau). La plupart des billes ont un déplacement total de l'ordre de 0.1 à $0.5 \mu\text{m}$ lors d'une application de force.

Une fois les positions du centre de la bille extraites de la vidéo par le logiciel d'analyse d'images, on peut en tirer le déplacement de la bille par rapport à

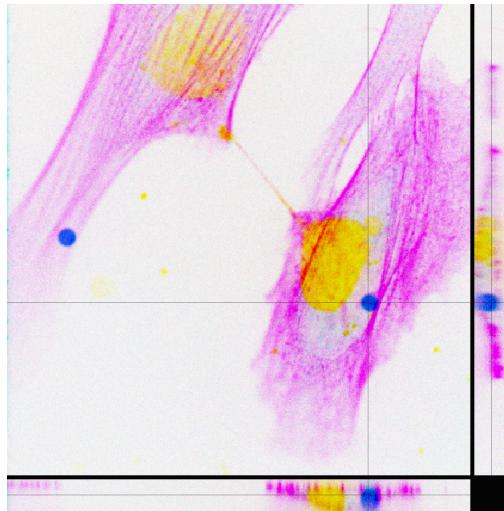


FIGURE 7.1 – Images en 3D d'une bille (en bleu) enfoncée dans une cellule prises au microscope confocal. En magenta, les filaments d'actine marqués à la phalloïdine Alexa 597 et en jaune le noyau marqué au DAPI. La bille fait $4.41 \mu\text{m}$ de diamètre et sert d'échelle.

sa position au temps $t=0$ de l'application de la force, pour chaque créneau $\delta R(t) = \sqrt{\delta x(t)^2 + \delta y(t)^2}$. La plupart du temps, on a $\delta R(t) \approx \delta x(t)$.

Durant les expériences de pinces magnétiques, nous ne pouvons pas mesurer l'angle d'enfoncement θ des billes. Cependant, des cellules fixées ont été observées au microscope confocal, ce qui nous a permis de mesurer l'angle d'enfoncement des billes, et la hauteur h_u sous la bille pour 23 billes. On obtient alors pour $4 \mu\text{g}$ de fibronectine :

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

On voit bien ici que l'hypothèse d'un milieu semi-infini sous la bille n'est pas du tout vérifiée. Au contraire, on a même $\frac{h_u}{2a} < 1$. L'angle moyen d'enfoncement θ est supérieur à 90° , ce qui signifie que la bille est souvent enfoncée plus qu'à moitié dans la cellule, certaines billes étant même complètement à l'intérieur de la cellule. On peut voir une image typique en figure 7.1 : la bille est proche du noyau et enfoncée presque sur toute l'épaisseur de la cellule. De manière générale, la plupart des billes, à l'échelle de temps de quelques heures sont ramenées vers le noyau de la cellule et profondément enfoncées, sans que nous sachions quel mécanisme est à œuvre (est-ce le flux rétrograde d'actine qui entraîne la bille, ou un transport actif lié aux microtubules ?). Elles sont presque toujours attachées solidement au cytosquelette de la cellule, et je n'ai pu observer que quelques fois sur des centaines de billes testées la formation d'un tube de membrane indiquant un défaut d'ancre au cytosquelette.

Ce qui nous donne avec les deux modèles décrits dans le chapitre 6 :

$$p_{Gallet} = \frac{2}{3} \left(\frac{1}{\left(\frac{3}{2 \sin \theta} + \frac{\cos \theta}{\sin^3 \theta} \right)} \right) = 0.50 \quad (7.1)$$

$$p_{Kamgoue} = 0.92 \quad (7.2)$$

$$(7.3)$$

Les deux modèles donnent des valeurs qui diffèrent finalement peu : $p_{Kamgoue}/p_{Gallet} \approx 1.6$.

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

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

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

La faible épaisseur des cellules joue probablement un rôle important dans ces différences de déformations entre l'axe vertical et le plan horizontal : il y a peu de milieu cellulaire à déformer entre la bille et la lamelle de verre. La cellule est ancrée sur cette dernière fortement par la liaison intégrine-fibronectine. L'influence de la rigidité de la lamelle de verre, quasiment infinie par rapport à celle de la cellule, peut alors être sentie lorsque l'on sonde le milieu avec la bille.

Fonction de fluage en loi de puissance

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

$$J(t) = 2\pi a p \xi(t) \quad \xi(t) = \frac{\delta x(t)}{F}$$

La fonction de fluage de la cellule peut être correctement ajustée par une loi de puissance à une échelle de temps comprise entre 0.1 s (résolution de la technique) 15-20 s. Au-delà, les mouvements actifs de la cellule perturbent le mouvement de la bille. L'utilisation d'une loi de puissance nous permet de réaliser tous les ajustements sur 3 décades en temps avec seulement deux paramètres, ce que ne permettraient pas des modèles construits par association de quelques éléments élastiques et visqueux. On peut voir en figure 7.4 qu'un ajustement à l'aide d'une exponentielle n'est pas aussi performant.

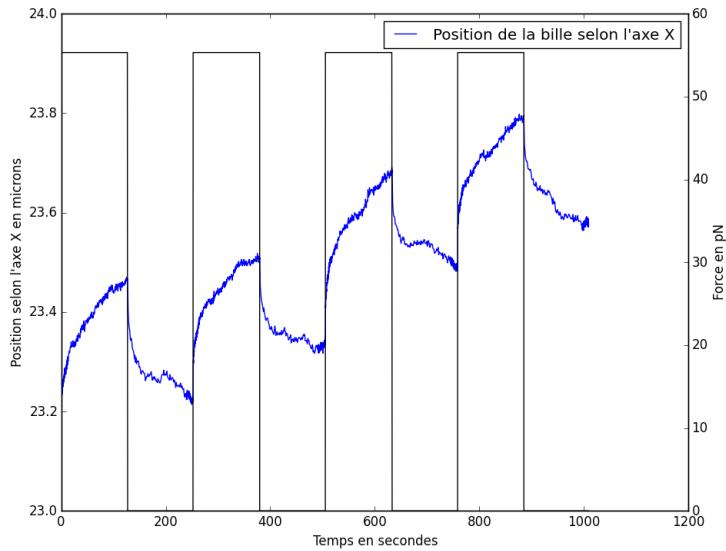


FIGURE 7.2 – Exemple de tracé de la position selon x d'une bille au cours du temps lorsqu'elle est soumise à 4 créneaux de force successifs. $\delta R(t) = \delta x(t)$ lorsque le déplacement ne se fait que selon l'axe X .

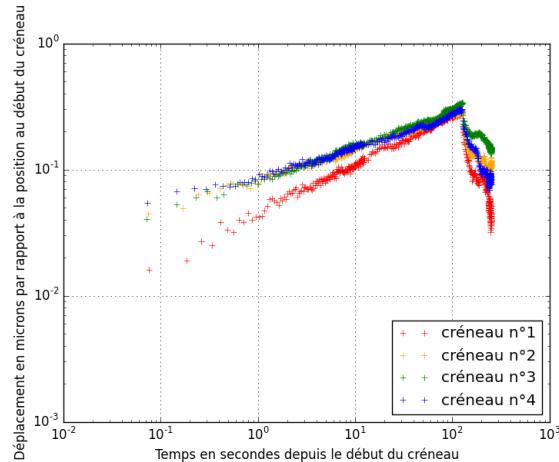


FIGURE 7.3 – Déplacement de la bille en fonction du temps écoulé depuis le début du créneau, pour les 4 créneaux successifs. On peut remarquer l'allure caractéristique en loi de puissance. On peut également voir qu'ici qu'après le premier créneau le déplacement est plus grand en réponse à la même force : la cellule s'est « ramollie ».

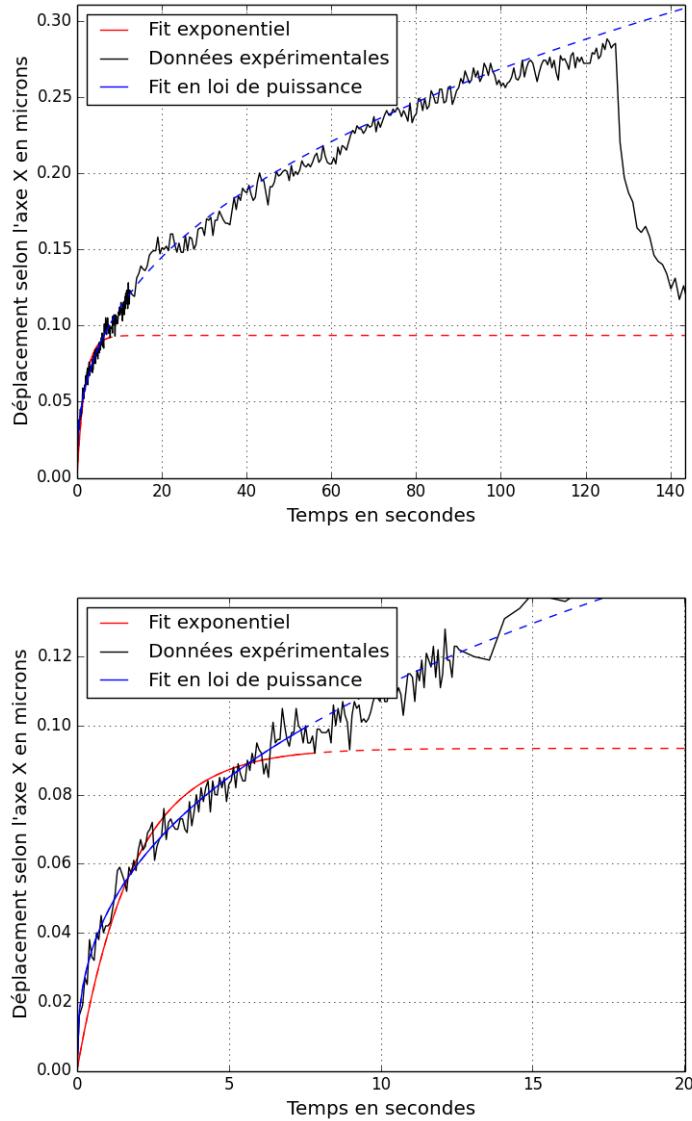


FIGURE 7.4 – Exemple d'ajustement du déplacement d'une bille au cours du temps par une loi de puissance $A * t^\alpha$ et par une exponentielle $A(1 - e^{-t/\tau})$, sur les dix premières secondes d'application de la force (pendant lesquelles le taux d'échantillonnage est le plus élevé). On peut voir que pour cette cellule, le modèle en loi de puissance continue de bien décrire le déplacement longtemps après les dix premières secondes avec seulement deux paramètres, ce qui n'est pas le cas pour le modèle exponentiel.

On peut alors réaliser un ajustement avec la fonction :

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

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

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

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

7.1.2 Résultats

Caractéristiques mécaniques des C2C12

Les C2C12 sont des cellules très diverses dans leur taille et dans leur forme, mais également en ce qui concerne les paramètres mécaniques : A s'étale sur deux décades, de $7 * 10^{-5}$ à $9 * 10^{-3} \mu\text{m/pN}$ avec une médiane à $1.22 * 10^{-3} \mu\text{m/pN}$. Cela correspond à des modules visco-élastiques caractéristiques à 1s :

$$G_0 = \frac{(2\pi)^\alpha}{\Gamma(1+\alpha)} \frac{1}{2\pi a p A}$$

Avec le modèle de Gallet, ces modules vont de 12 Pa à 6 kPa avec une médiane à 87 Pa. Avec le modèle de Kamgoué-Ohayon, on obtient un G_0 allant de 4 à 546 Pa, avec une médiane à 32 Pa. Cette large distribution de valeurs, couvrant plusieurs ordres de grandeur, n'est pas propre aux C2C12, c'est le cas de nombreux autres types cellulaires (BALLAND et al., 2005).

L'exposant médian, $\alpha = 0.18$ nous indique que la réponse mécanique des cellules est principalement élastique.

Il est important de rappeler que la population est tronquée de ses cellules les plus rigides. Les valeurs obtenues peuvent paraître faibles en comparaison de celles obtenues précédemment sur la même lignée par Delphine Icard avec les pinces optiques ICARD-ARCIZET et al., 2008. Cependant les pinces optiques opéraient sur des billes bien moins enfoncées à l'intérieur de la cellule, avec une épaisseur sous la bille plus élevée et avec une fonctionnalisation différente des billes (polypeptide d'une vingtaine d'acides aminés se terminant par le tripeptide RGD). Les éléments du cytosquelette sondés n'étaient peut-être pas les mêmes. La valeur de α était d'ailleurs elle aussi supérieure à celle mesurée ici. De manière générale, on voit que la valeur de G_0 va être très dépendante du modèle utilisé.

Le modèle de visco-élasticité de BALLAND et al., 2006 décrit au chapitre 5 montrait une relation linéaire entre $\ln(G_0)$ et α . Nous avons ici retrouvé la même relation, visible en figure 7.6.

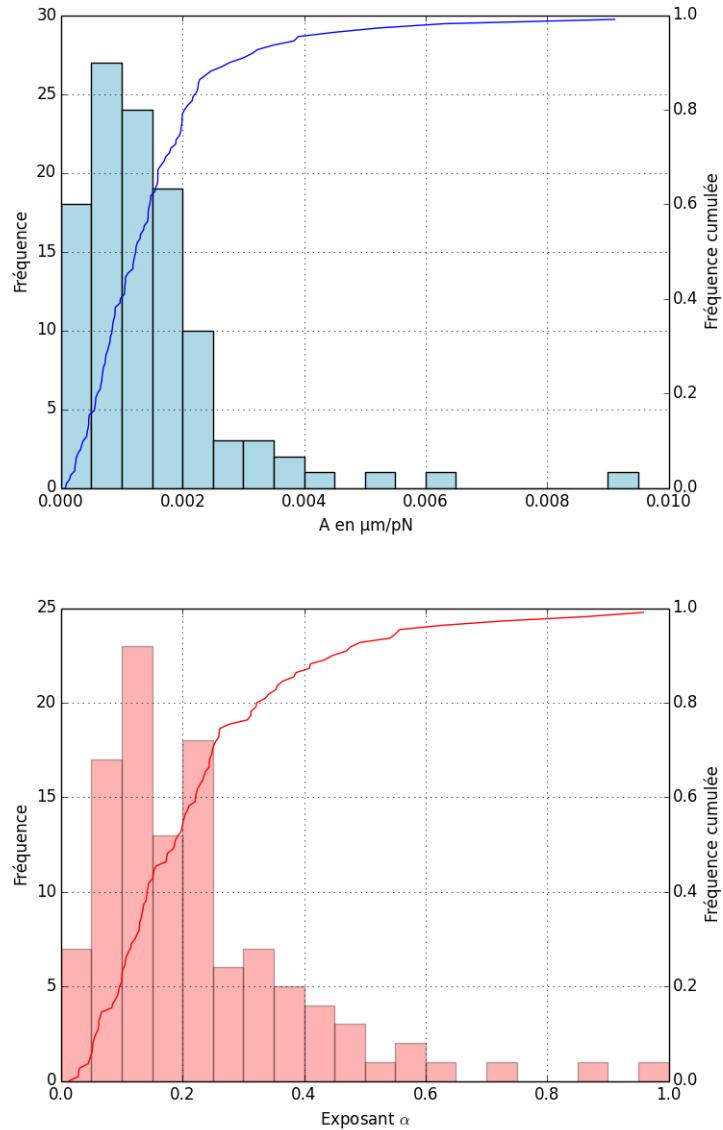
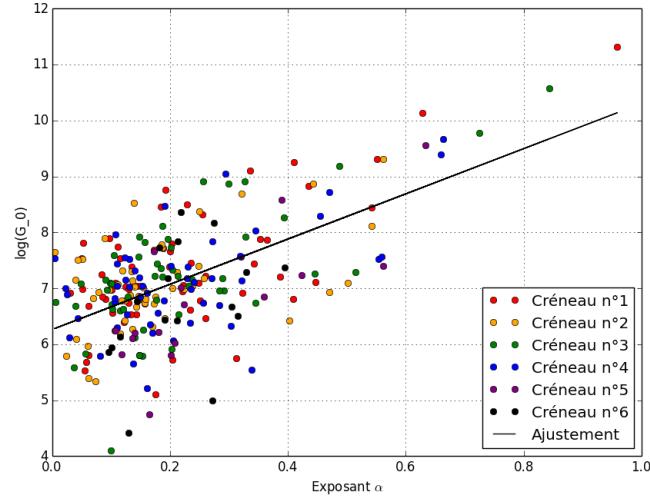


FIGURE 7.5 – Caractéristiques mécaniques des C2C12 sondées par des billes fonctionnalisées avec 4 μg de fibronectine.


 FIGURE 7.6 – Corrélation entre $\ln(G_0)$ et α . ($R^2 = 0.3$)

Influence de l'enrobage des billes en fibronectine

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

On peut voir en observant les deux populations que A est plus élevé lorsque l'enrobage est moins dense, alors que l'exposant ne varie pas, mais cette élévation n'est pas significative avec la quantité de cellules que nous avons observées. Lorsque la quantité de fibronectine sur les billes est plus faible, les cellules apparaissent donc comme plus déformables, moins rigides, ce qui s'explique facilement par un ancrage moindre de la bille au cytosquelette de la cellule. Cependant, il est également possible que les billes recouvertes de moins de fibronectine soient également moins enfoncées dans les cellules, ce qui conduirait à sous-évaluer la rigidité des cellules. Seule l'observation en microscopie confocale de l'angle d'enfoncement des billes avec la quantité de fibronectine la plus faible nous permettra de trancher entre ces deux hypothèses.

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

Évolution des paramètres mécaniques

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

Dans les résultats finaux, ne sont conservées que les cellules pour lesquelles

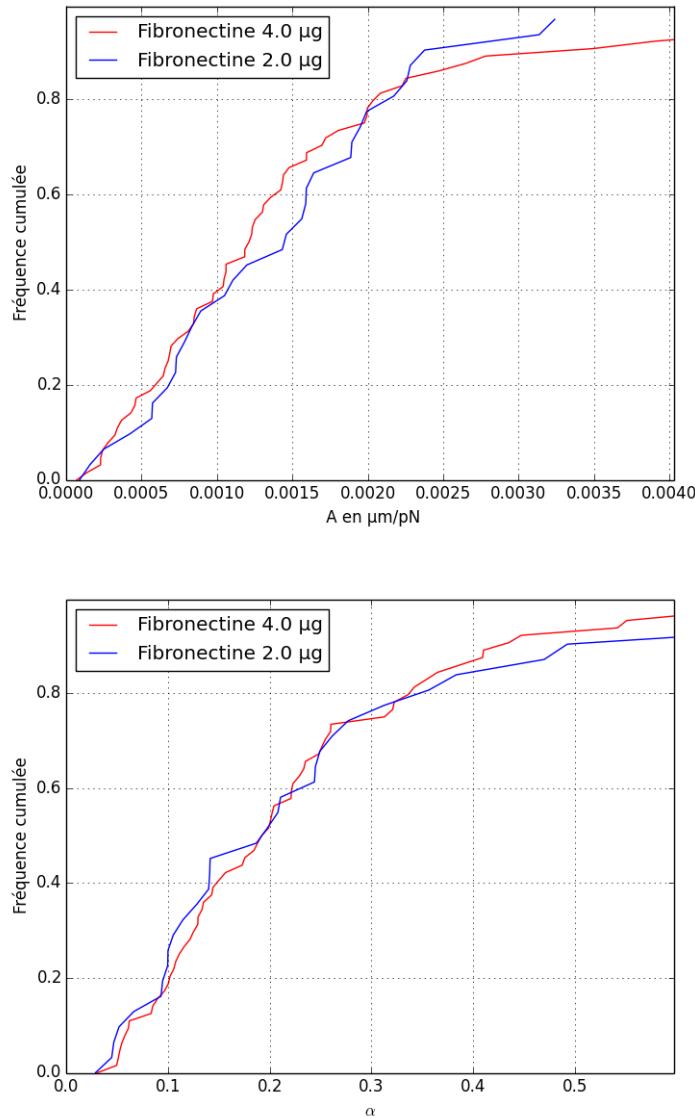


FIGURE 7.7 – Caractéristiques des C2C12 sondées par des billes ayant différentes densités de fibronectine à leur surface. ($p=0.13$ avec un test de Student comparant les deux distributions).

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

On peut voir sur la figure 7.8 qu'il n'y a pas de changements de A communs à toute la population de cellules : ce ne sont pas toutes les cellules qui se rigidifient ou se ramollissent ensemble. En revanche, on peut observer un décalage des exposants vers les valeurs les plus faibles aux 2^e et 3^e créneaux, qui se résorbe ensuite, mais il n'est pas significatif. Le comportement mécanique de ces cellules soumises à une force pendant de longues durées évolue donc d'abord dans le sens d'une « élastification », d'une diminution de la part dissipative de la réponse mécanique.

Pour distinguer dans l'évolution des paramètres mécaniques ce qui est dû à l'application prolongée d'une force de ce qui est dû à la dispersion naturelle des mesures, nous avons comparé les résultats obtenus pour 10 secondes et 125 secondes d'application de force.

Lorsque l'on applique une force pendant 125 secondes, l'amplitude des variations par rapport à la mesure d'origine de A et α se détache du bruit, obtenu pour seulement 10 secondes de force, comme on peut le voir sur l'histogramme 7.9. L'application d'une force pendant une durée plus longue permet donc de modifier significativement les paramètres A et α .

Classification des cellules selon l'évolution de leurs paramètres mécaniques

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

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

La figure 7.12 présente ce classement en trois groupe pour 10s et 125s d'application de force. On peut remarquer que lorsque la force n'est appliquée que durant 10s, les cellules ont majoritairement un comportement incohérent. Cette évolution aléatoire, et de plus de faible amplitude comme on le voit sur la figure 7.9, est très probablement le bruit sur la mesure de A .

Lorsque la force est appliquée pendant 125 secondes, on peut au contraire observer qu'il y a beaucoup plus de cellules qui se ramollissent ou se rigidifient de manière persistante au cours du temps, avec une amplitude de variation plus grande que pour le témoin. On peut également remarquer une dissymétrie de la distribution du côté des $(A_N - A_1) < 0$, c'est-à-dire vers une rigidification.

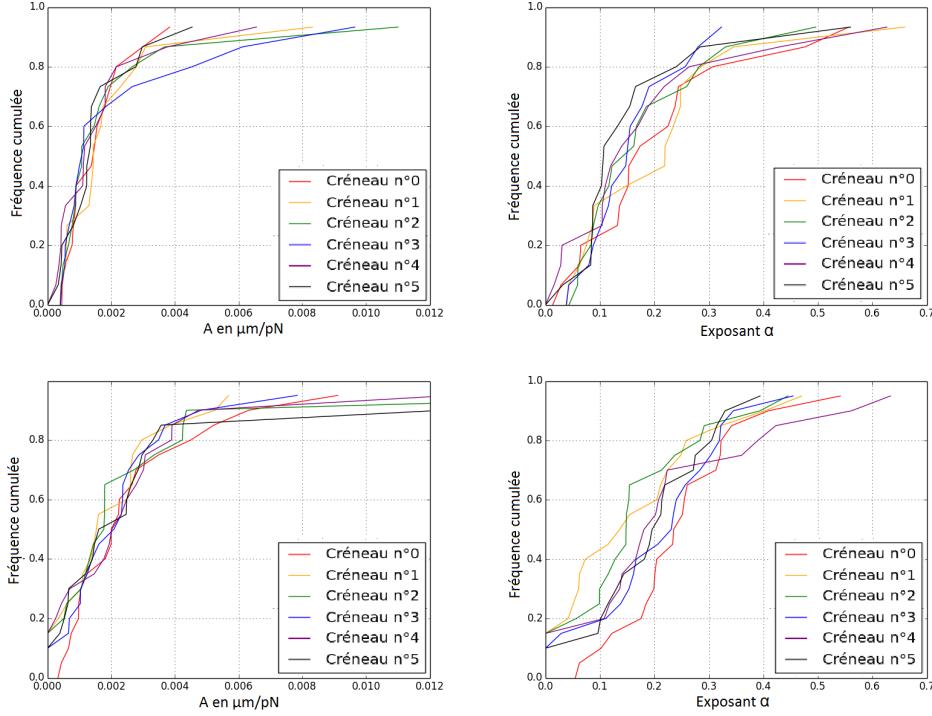


FIGURE 7.8 – Histogramme des paramètres A et α pour six applications de force successives, pour le témoin avec 10s d'application de force, en haut, et pour 125s d'application de force, en bas.

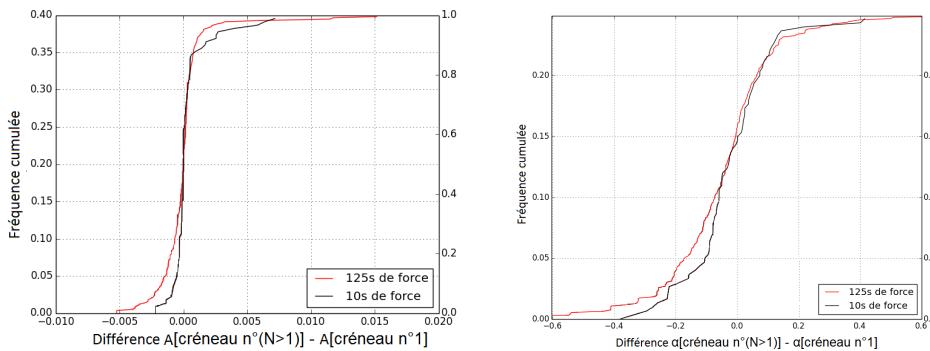


FIGURE 7.9 – Amplitude des évolutions de A entre la première mesure et les 6 suivantes, pour la série témoin (10s de force, en noir) et pour la même concentration de fibronectine et 125s de force (en rouge).

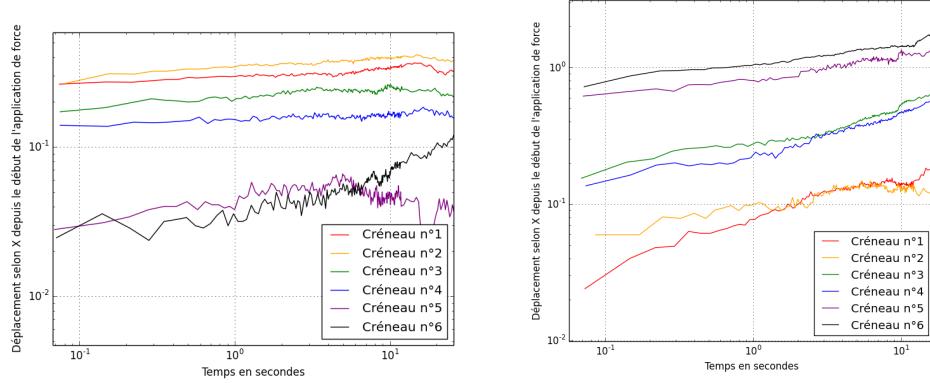


FIGURE 7.10 – Exemples de déplacements au cours du temps et au cours des applications de forces d'une cellule considérée comme en rigidification (à gauche) et d'une cellule en ramollissement (à droite)

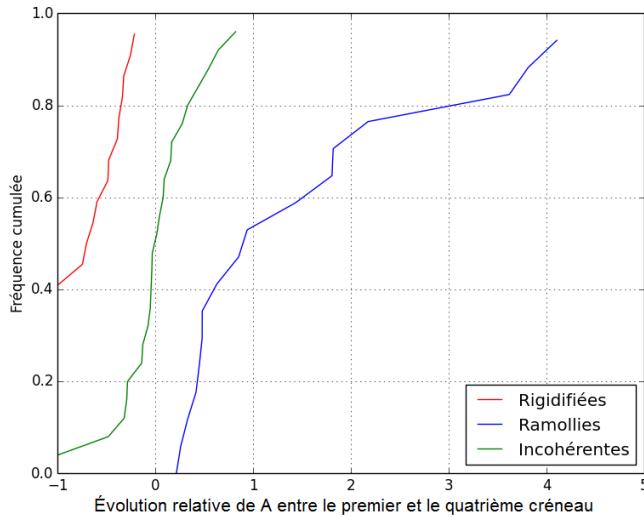


FIGURE 7.11 – Histogrammes cumulés de $\frac{A_4 - A_1}{A_1}$ pour les trois groupes de cellules classées. On voit que près de la moitié des cellules se rigidifiant sont passées sous le seuil de détection de la pince, tandis que les ramollissements sont souvent supérieurs à 100%.

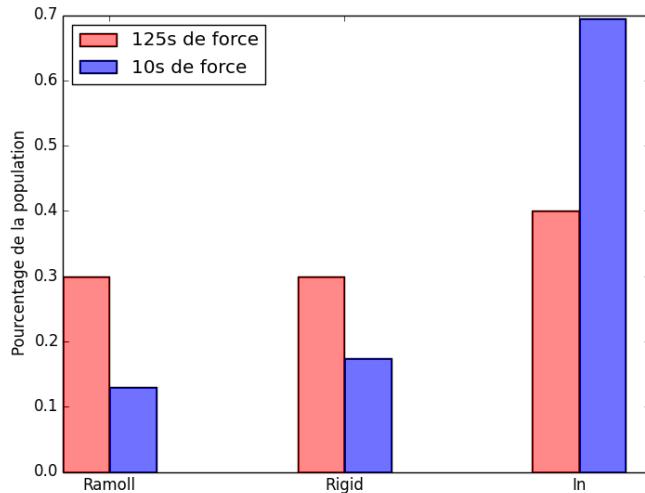


FIGURE 7.12 – Répartition des cellules dans les trois catégories d'évolution de A au cours des applications de force

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

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

Cette évolution dépend de la valeur initiale de A : ce sont les cellules les plus molles initialement qui se rigidifient, et inversement. Mais cette dépendance peut être artificielle : les cellules déjà rigides qui se rigidifient encore n'ont plus de mouvement visible sur lequel faire des mesures, et les cellules molles qui se ramollissent finissent par voir leur bille arrachée, ou sortir du champ d'observation.

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

On peut observer une corrélation entre la position de la bille par rapport au noyau et l'appartenance à l'une des trois populations, comme mis en évidence sur les figures 7.13 et 7.14. Plus précisément, lorsque les billes sont « à l'arrière du noyau » par rapport à la force appliquée, c'est-à-dire lorsqu'on a tendance à pousser la bille vers le noyau, alors la tendance est nettement à la rigidification. Au contraire, lorsque l'axe bille-noyau est perpendiculaire à la direction de la force, il n'y a pas de tendance cohérente.

Au vu de cette information, on pourrait se dire que les cellules rigidifiées, qui

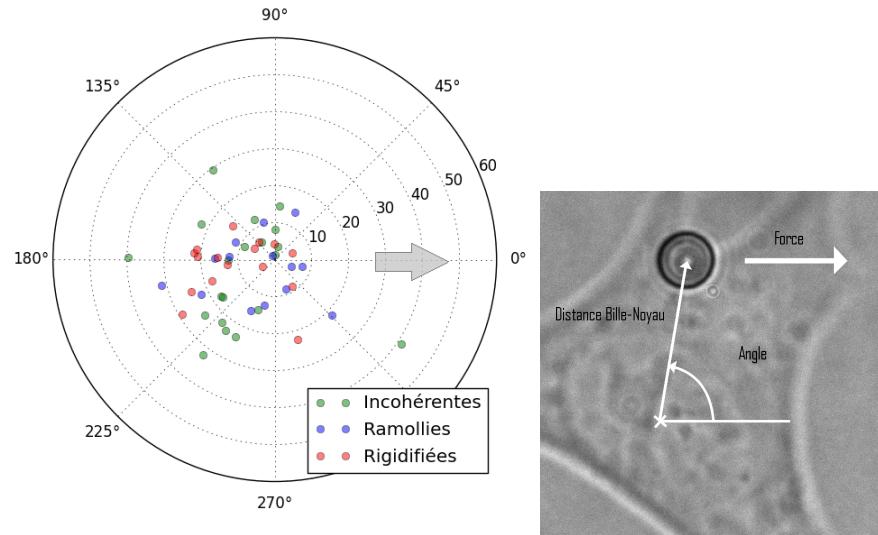


FIGURE 7.13 – Longueur et orientation du vecteur entre le bord du noyau et la bille. La flèche représente la direction de la force exercée sur les billes.

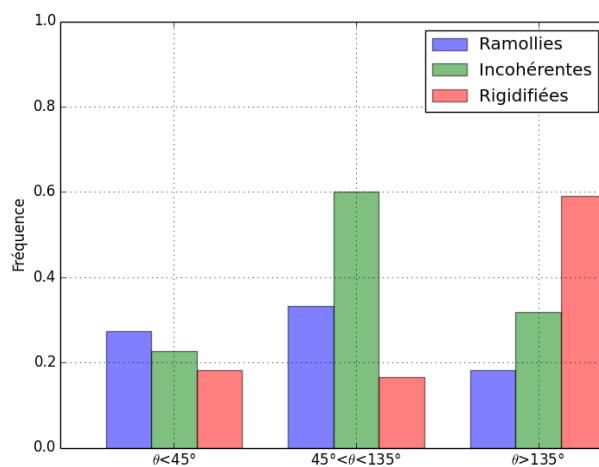


FIGURE 7.14 – Répartition des comportements cellulaires en fonction de l'angle formé entre l'axe bille-noyau et la direction de la force appliquée, pour 125 secondes de force et 4 μg de fibronectine. (Le test de Fisher donne $p=0.044$ pour que cette distribution soit due au hasard.)

sont tirées vers le noyau, expérimentent en fait un gradient de module viscoélastique en se rapprochant du noyau : elles se rapprochent d'une zone péri-nucléaire où le module viscoélastique serait plus élevé.

Cependant, on peut voir sur la figure 7.15 que ce n'est pas le cas, au contraire : la majorité des cellules qui se ramollissent se rapprochent du noyau, alors que les cellules rigidifiées se rapprochent ou s'éloignent dans des proportions égales. La statistique n'est cependant pas assez riche pour que l'on puisse affirmer que cet effet est systématique.

7.2 Rôle des interactions *cis* des cadhérines dans la formation de contacts intercellulaires

Pierre-Olivier Strale, chercheur post-doctorant dans l'équipe de René-Marc Mège, Adhésion Cellulaire et Mécanique de l'Institut Jacques Monod, s'est intéressé à l'oligomérisation des E-cadhérines lors de la formation des jonctions adhérentes. En plus des interactions *trans* qui lient les cadhérines de deux cellules différentes, les cadhérines peuvent également former des interactions *cis* entre protéines appartenant à une même cellule. Elles peuvent ainsi former des agrégats à la surface de la cellule. Pour étudier le rôle de ces agrégats, ils ont conçu une cadhérine mutante, capable de former des interactions *trans* mais pas des interactions *cis*. La cadhérine sauvage et la cadhérine mutante étaient ensuite électroporées dans des cellules épithéliales humaines A431, qui avaient été modifiées pour ne pas exprimer l'E-cadhérine.

Ensemble, nous avons testé mécaniquement à l'aide des pinces magnétiques les propriétés des cadhérines mutantes par rapport aux cadhérines sauvages. Pour cela, on a utilisé des billes similaires à celles utilisées pendant les expériences précédemment décrites (des Dynabeads d'Invitrogen), mais de diamètre $2,8 \mu\text{m}$. Ces billes pouvaient être fonctionnalisées avec une E-cadhérine sauvage.

Nous avons appliqué sur les cellules les mêmes paliers de force périodiques que décrit dans la section précédente, avec 6 paliers par cellule. Comme indiqué dans le chapitre précédent, avant d'appliquer ces paliers de force, nous avons procédé à un test pour choisir le bon niveau de force à appliquer.

Pour ces expériences réalisées avec des billes plus petites et des cellules plus épaisses, par rapport aux expériences sur les C2C12, nous avons pu remarquer un déplacement en Z visible des billes, ce qui est bien cohérent avec le fait que le rapport $h_u/2R$ est ici nettement plus grand.

La première différence entre les cellules exprimant l'E-cadhérine mutante et celles exprimant l'E-cadhérine sauvage apparaît dès cette étape : les premières sont significativement plus faciles à déplacer que les secondes. Nous avons classé les cellules en trois catégories : celles pour lesquelles la bille reste immobile, même en appliquant le plus haut niveau de force possible (qui est d'une vingtaine de pN ici), celles pour laquelle la bille est mise en mouvement, et celles pour lesquelles la bille a été arrachée pendant le test. Les billes sur les cellules exprimant la cadhérine mutante ont été moins souvent immobiles et plus souvent arrachées

CHAPITRE 7. RHÉOLOGIE LOCALE D'UNE CELLULE UNIQUE

que les billes sur les cellules exprimant la cadhérine sauvage. On voit donc dès le départ que l'ancrage de la bille par les cadhérines mutantes est compromis.

Le seconde différence et visible lors de l'observation des déplacements de la bille. Lorsque la bille est ancrée par des cadhérines mutantes, son déplacement sur les 6 créneaux de force est deux fois plus important que lorsqu'elle est ancrée par les cadhérines sauvages. En revanche, dans un cas comme dans l'autre, aucune augmentation ni diminution cohérente n'a été observée. Les cellules exprimant la cadhérine mutante apparaissent donc comme moins rigides lorsqu'elles sont sondées par les jonctions adhérentes.

Enfin, une troisième différence est visible lors de la phase de relaxation : les billes ancrées par des cadhérines mutantes sont beaucoup plus mobiles que les autres. Cela révèle un lien plus faible entre les cadhérines mutantes et le cytosquelette sous-jacent.

Ces résultats ont été intégrés dans une publication à paraître (STRALE et al., 2015, en annexe).

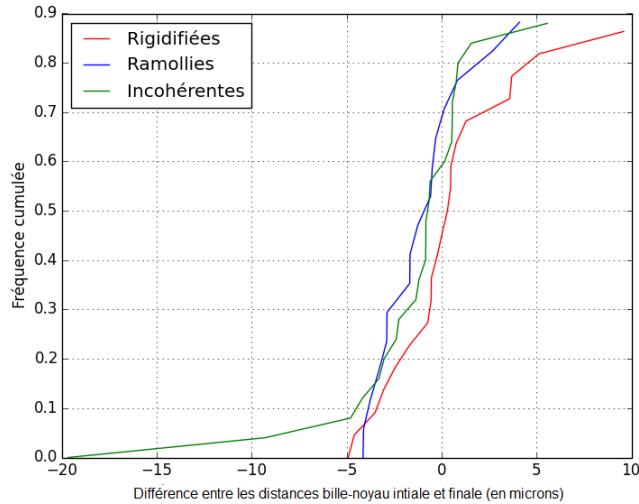
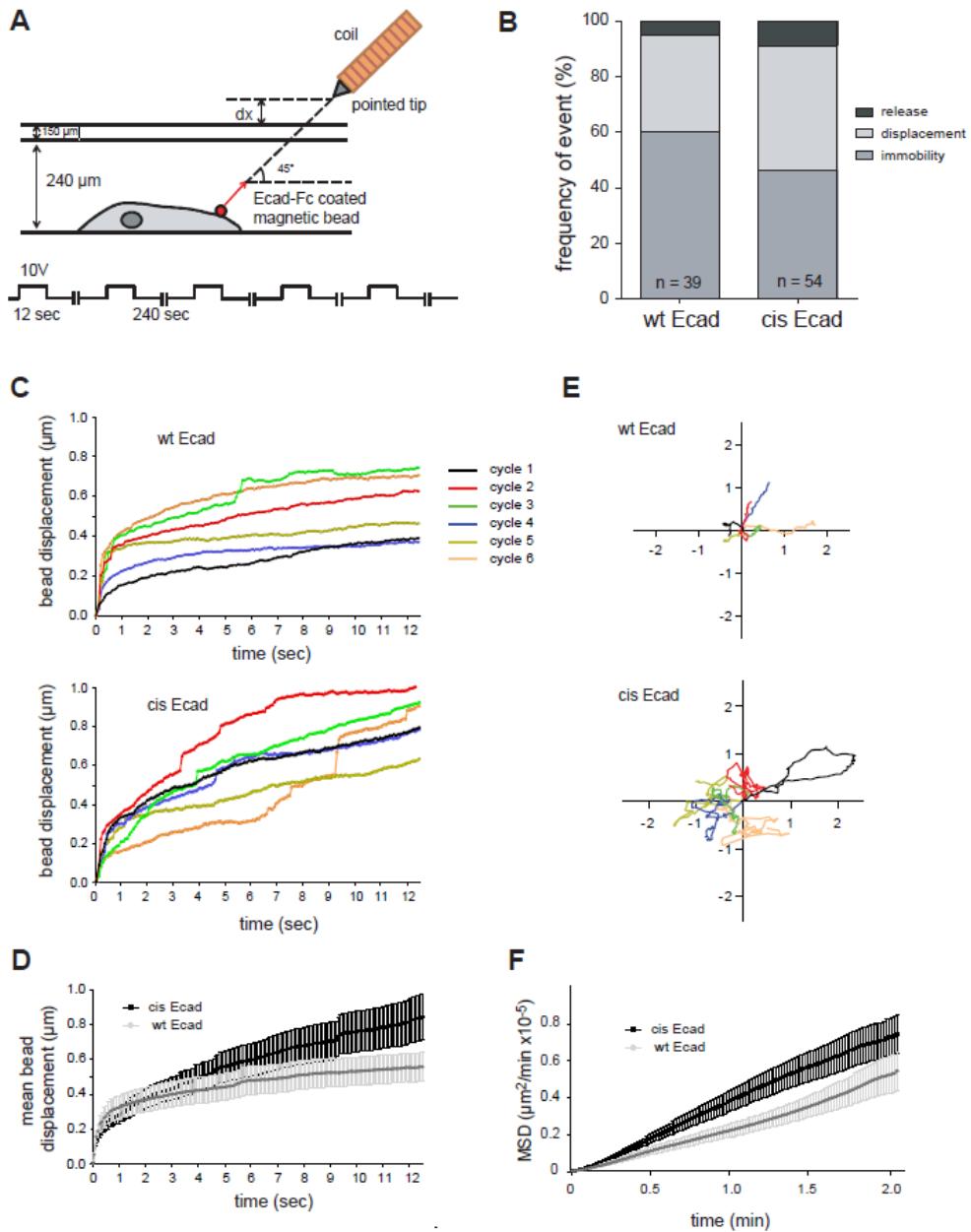


FIGURE 7.15 – Différence entre la distance bille-noyau finale et la distance bille-noyau initiale, pour les cellules classées précédemment.

FIGURE 7.16 – Résultats des expériences sur les E-cadhérines mutantes incapables d’interactions *cis*, d’après **Strale** A : Montage expérimental, B : Proportion des billes immobiles, mobiles ou arrachées sous force pour des cellules exprimant la cadhérine mutante (*cis* Ecad, 54 cellules) ou sauvage (wt Ecad, 39 cellules). C : Déplacements des billes sous force en fonction du temps. D : Moyennes des déplacements pour toutes les applications de force, pour 12 billes dans chaque condition. E : Trajectoires (en μm) d’une bille pendant les six périodes de relaxation dans les deux conditions. F : Déplacement quadratique moyen pendant la relaxation pour 12 billes et 6 créneaux dans chaque condition



Chapitre 8

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



**CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS
LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION
MÉCANIQUE**

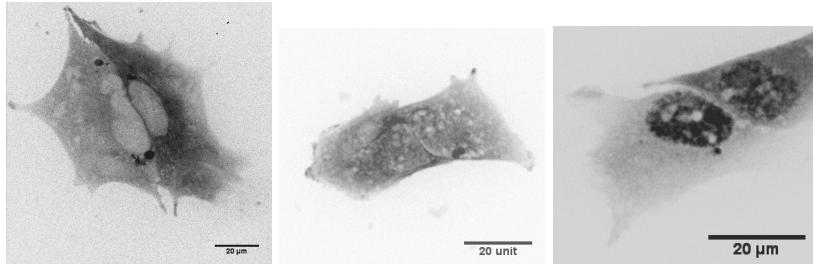


FIGURE 8.1 – Exemples de cellules classées comme MRTF-A Cytoplasmique, Homogène et Nucléaire, de gauche à droite respectivement. En vert, la MRTF-A GFP.

8.1 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 de la protéine 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 8.1.

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

CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION MÉCANIQUE

Quantification Dans un second temps, pour caractériser la répartition de MRTF-A dans la cellule, les intensités de fluorescence dans le cytoplasme, dans le noyau et dans une zone péri-nucléaire ont été mesurées et comparées. Cette méthode est plus précise mais allonge considérablement la durée du 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 péri-nucléaire qui a une épaisseur proche de celle du noyau. On compare alors l'intensité moyenne par pixel de chacune des deux zones. 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.

8.1.1 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 de fluorescence 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 des plasmides codant pour l'actine mCherry, la LifeAct RFP, la F-tractin RFP, des marquages DNaseI et phalloïdine sur cellules fixées, et enfin avec de la SiR-actine, successivement.

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

La LifeAct (RIEDL et al., 2008) 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

CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION MÉCANIQUE

avec la LifeAct. De plus, sa fluorescence était trop intense et interférait de manière importante avec le signal de MRTF-A GFP.

La F-tractine (JOHNSON & SCHELL, 2009) fonctionne de manière similaire, mais pose moins de problème de fluorescence. Elle produit les mêmes effets sur l'équilibre F/G actine.

La DNaseI et la phalloïdine nous permettent d'observer à la fois l'actine G et l'actine F 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 SiR-actine (LUKINAVICIUS et al., 2014) 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.

8.2 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.

Une force constante d'environ 1nN a été appliquée sur les billes pendant 125 secondes, puis pendant les 125 secondes suivantes, la force est relâchée. Cette séquence est répétée 6 fois pendant un total de 1500 secondes (25 minutes).

Nous avons réalisé ces expériences sur trois séries de C2C12 : transfectées avec MRTF-A GFP seule (37 cellules observées), transfectées avec MRTF-A GFP et actine mCherry (16 cellules observées), et transfectées avec MRTF-A GFP et le LifeAct RFP (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 d'actine.

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 8.2 que l'ajout d'actine exogène réduit le nombre de cellules pour lesquelles MRTF-A change de localisation, mais de manière non significative¹, alors que l'ajout de LifeAct 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

1. Il est à noter que vu le petit nombre de cellules observées, ces différences non significatives pourraient le devenir si l'on observait plus de cellules.

CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION MÉCANIQUE

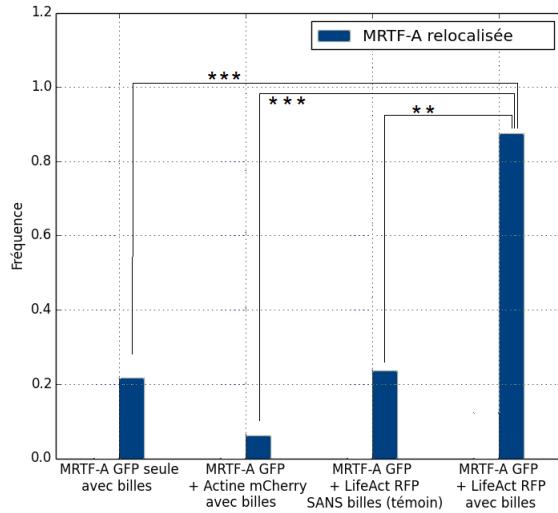


FIGURE 8.2 – Proportion des cellules observées pour lesquelles MRTF-A GFP change de localisation dans la cellule au cours de l’expérience. * : $p < \frac{0.05}{4}$, ** $p < \frac{0.01}{4}$, *** $p < \frac{0.001}{4}$ (réalisés avec un test de Fisher et une correction pour les comparaisons multiples)

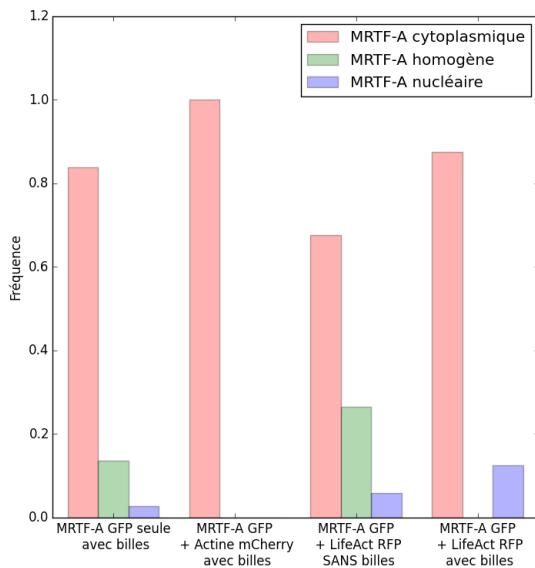


FIGURE 8.3 – Répartition de MRTF-A dans les cellules avant application de la force.

**CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS
LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION
MÉCANIQUE**

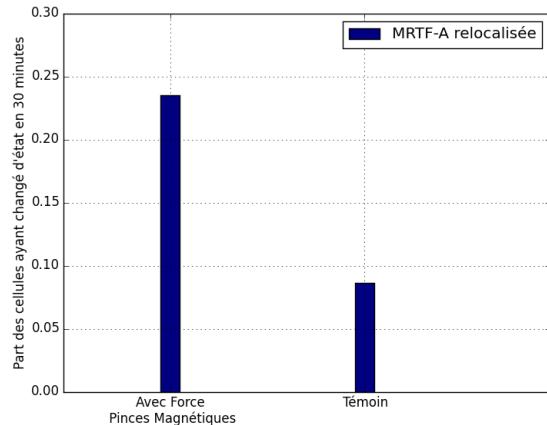


FIGURE 8.4 – Proportion des cellules observées pour lesquelles MRTF-A GFP change de localisation dans la cellule au cours de l’expérience. $p=0.012$ (G-test d’indépendance)

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. On peut remarquer que la répartition initiale de localisation de MRTF-A entre les différentes expériences est relativement semblable, ce qui implique que le changement d’activité observé sur la figure 8.2 n’est pas dû à l’état initial de MRTF-A dans ces cellules. Cependant, on peut noter une augmentation de la quantité de cellules avec MRTF-A cytoplasmique avec l’actine mCherry, ce qui est cohérent avec la surexpression de l’actine. Cette augmentation n’est pas significative, probablement en raison d’un nombre de cellules observées insuffisant. On note à l’inverse 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.

Au contraire, la LifeAct, en se liant aux filaments d’actine, peut les stabiliser 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. On peut également remarquer que les résultats pour MRTF-A GFP seule sont identiques aux résultats avec LifeAct RFP mais sans application de force.

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. La présence de Life-Act RFP stabilisant les filaments,

CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION MÉCANIQUE

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. Il est également possible qu'en présence de LifeAct la polymérisation d'actine sous force appliquée soit plus efficace.

Les expériences de pince magnétiques sont les toutes premières que j'ai réalisées au sujet de MRTF-A. Voyant que les résultats étaient très semblables entre les expériences MRTF-A GFP seule avec billes et les témoins MRTF-A GFP + LifeAct RFP, j'ai alors pensé que l'expérience était un échec, et j'ai orienté mes efforts vers les expériences d'étirement. À la fin de ma thèse, avec du recul et une meilleure compréhension du système actine/MRTF-A, j'ai compris les résultats obtenus sur les pinces magnétiques. Malheureusement, le témoin MRTF-A GFP seule sans billes qui complèterait les résultats ne peut plus être réalisé, car la nanofectine utilisée alors pour les transfections n'est plus commercialisée. Cependant, je peux comparer les expériences MRTF-A GFP avec billes et les expériences témoins non étirées qui sont également transfectées à la nanofectine, et qui seront présentées en détail section 8.3.2. Il y a deux différences entre le vrai témoin et les témoins non-étirées : le substrat est différent (verre contre PDMS) et l'environnement également (cuve de $65\mu\text{l}$ contre 7 ml). Le projet est maintenant de voir si ces deux conditions ont une influence sur la localisation de MRTF-A, pour savoir s'il est pertinent d'utiliser les témoins non-étirées comme référence pour les expériences de pinces magnétiques.

Dans le cas des pinces, on a vu que dans environ 20% des cellules, MRTF-A est relocalisée, en 30 minutes d'observation. Dans le cas du témoin, c'est le cas de 20% des cellules, mais en deux heures d'observation. Si l'on compte quel pourcentage de cellules ont eu une relocalisation de MRTF-A en seulement 30 minutes, on voit qu'il n'est que de 8,6%, ce qui est significativement moins que dans le cas des expériences de pinces magnétiques (voir figure 8.4).

8.3 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 quelques dizaines de minutes, ont l'inconvénient majeur de ne pouvoir opérer que sur une cellule à la fois. Comme les comportements observés sur les cellules sont extrêmement divers, il faut alors beaucoup de temps pour obtenir une population de cellules 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, chacune pendant 30 minutes.

CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION MÉCANIQUE

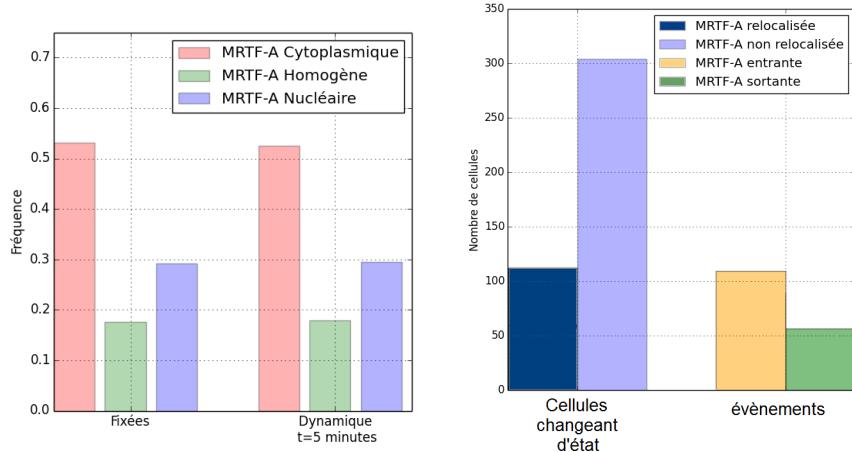


FIGURE 8.5 – Répartition entre les trois états pour des cellules fixées immédiatement après un montage sans rinçage et sans étirement ($n=7$, 963 cellules) et lors de l’observation en direct après 5 minutes d’observation sans étirement ($n=5$, 41 cellules). La différence n’est pas significative ($p=0.995$, G-test).

FIGURE 8.6 – Quantité de cellules changeant au moins une fois d’état pendant 2 heures d’observation et direction de ces changements

8.3.1 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 8.3.2 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 pendant cette durée.

On peut observer la répartition entre les trois états est la même lors des expériences fixées immédiatement après montage et après 5 minutes d’étirement sur la figure 8.5. 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 réaction très rapide qui reviendrait à l’équilibre pendant ce laps de temps, même si ceci semble peu probable.

Le lecteur attentif aura remarqué que cette répartition est différente de celle présentée en figure 8.2. Cela est dû aux différences dans la préparation des cellules dans les deux expériences, car la transfection n’était pas faite dans les

CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION MÉCANIQUE

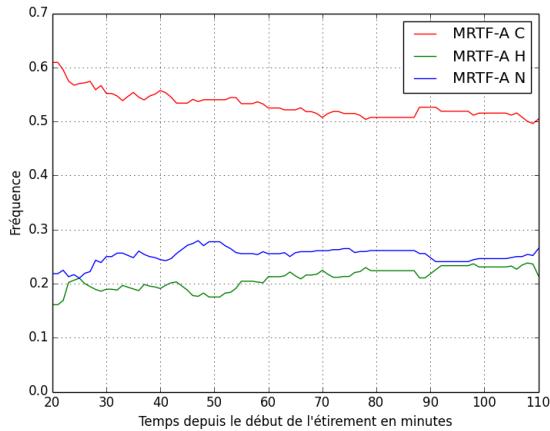


FIGURE 8.7 – Évolution de la proportion de cellules ayant MRTF-A dans chacune des trois localisations au cours du temps lors d'une expérience témoin où l'on a monté à l'avance la lamelle dans l'étireur et où l'on n'applique aucune contrainte.

conditions optimales lors des expériences de pinces magnétiques. La quantité de plasmide ayant pénétré dans les cellules était 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 8.7. On peut observer que la proportion des différents états reste relativement stable, avec une légère diminution de la quantité de MRTF-A Cytoplasmique au cours du temps. Pendant la durée totale de l'expérience, on peut observer sur la figure 8.6 qu'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 (événements « entrants »).

8.3.2 Effet du rinçage et du montage préalables

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

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

***CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS
LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION
MÉCANIQUE***

effectué en même temps que le montage.

On peut voir sur la figure 8.8 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 peut 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 finalement voir que l'étape du montage n'a pas la même influence

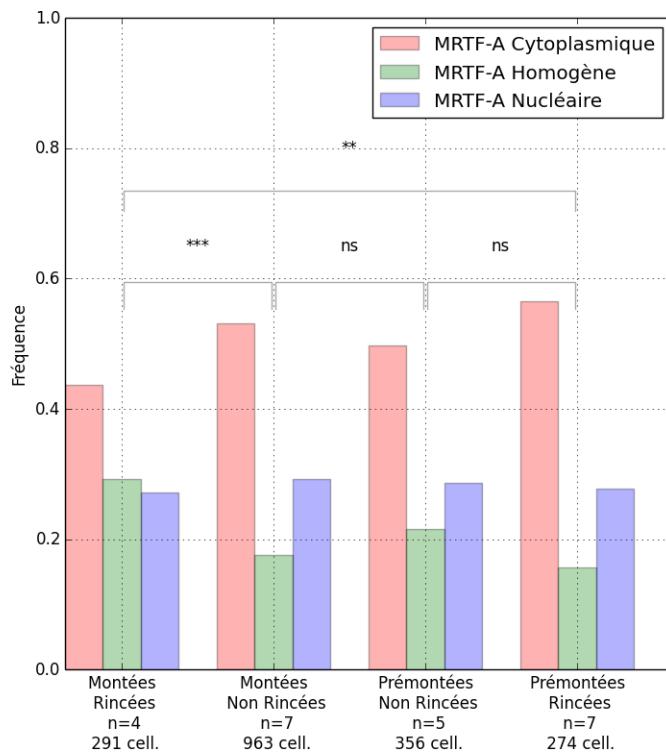


FIGURE 8.8 – Influence sur la localisation de MRTF-A des contraintes mécaniques dues au montage de la lamelle dans l'étireur (Montage) et de la variation de concentration en sérum due au remplacement du milieu de culture par du milieu neuf au moment du montage (Rinçage). Montées : montage à $t = 5$ minutes, Prémontées : montage à $t = 18$ heures, rinçage au même moment. Tous les tests ont été réalisés avec un G-test d'indépendance t et une correction de Bonferroni pour les comparaisons multiples. $^{**} : p < \frac{0.01}{4}$ et $^{***} : p < \frac{0.001}{4}$

CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION MÉCANIQUE

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 aux 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.

8.3.3 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 actine mCherry, nous avons appliqué un étirement de 10% au temps $t=0$, puis observé les cellules toutes les 10 minutes² pendant 120 minutes en maintenant l'étirement.

La figure 8.9 montre la fréquence dans la population de cellules de chacune des trois localisations possibles de MRTF-A GFP en fonction du temps écoulé depuis le début de l'étirement.

Dès le début de l'observation³, la proportion de cellules ayant MRTF-A dans le cytoplasme est inférieure à celle du témoin : 60 % de cellules avec MRTF-A cytoplasmique pour le témoin contre moins de 50% pour les cellules étirées. Cet écart se creuse avec le temps, jusqu'à la fin de la période d'observation, deux heures après le début de l'étirement, où il reste encore 50 % de cellules avec MRTF-A cytoplasmique dans le cas témoin, mais environ 35 % lorsque les cellules ont été étirées.

Au contraire les cellules ayant MRTF-A répartie de manière homogène sont plus nombreuses : plus de 25 % de cellules avec MRTF-A répartie de manière homogène après 20 minutes d'étirement contre moins de 20 % pour le témoin. Si initialement la quantité de cellules ayant MRTF-A clairement accumulée dans le noyau est identique dans les deux expériences, à partir d'une heure d'étirement, on observe une croissance de cette population chez les cellules étirées par rapport aux témoins. Au bout de 100 minutes d'étirement, les cellules ayant MRTF-A dans le noyau représentent 35%, contre un peu plus de 20% dans la population témoin.

La figure 8.10 présente de manière plus détaillée tous les évènements de changement de localisation de MRTF-A GFP observés pendant l'expérience. Comme chaque cellule n'est observée qu'une fois toutes les dix minutes, il existe une incertitude temporelle sur le moment auquel a eu lieu la transition entre un état

2. Les cellules sont en fait observées de la première à la dernière, en recommençant de manière cyclique avec un cycle prenant de 5 à 10 minutes selon les expériences, le but étant d'observer chaque cellule le plus fréquemment possible. À l'intérieur d'un cycle, toutes les cellules ne sont pas observées au même moment, leur instant d'observation est réparti sur toute la durée du cycle.

3. Les vingt premières minutes après l'étirement sont consacrées à la recherche de cellules exprimant la MRTF-A GFP. C'est pourquoi le début de l'observation est placé au moment où la population de cellules repérées a atteint un nombre suffisant, typiquement une trentaine de cellules.

*CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS
LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION
MÉCANIQUE*

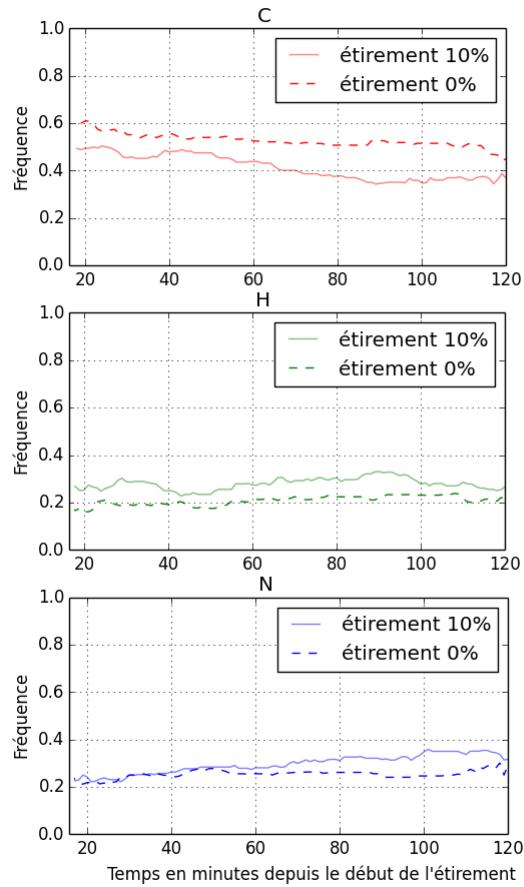


FIGURE 8.9 – Comparaison de l'évolution de la fréquence de chaque localisation de MRTF-A au cours du temps après 10% d'étirement et dans les expériences témoin ($n=5$ et 141 cellules dans les deux cas)

CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION MÉCANIQUE

et un autre. C'est pourquoi, pour représenter les événements au cours du temps, le nombre d'événements a été compté pendant un intervalle [$t-5$ minutes ; $t+5$ minutes], puis il a été normalisé en le divisant par le nombre de cellules qui sont observées durant cet intervalle. Chacun des six graphes représente l'occurrence d'un événement différent au cours du temps, pour l'expérience d'étirement et son témoin.

On voit sur la figure 8.10 une vague importante d'événements $C \rightarrow H$ et $H \rightarrow N$ (donc entrants) se produire lors de l'étirement 10%. Les événements sortants restent quant à eux au même niveau pendant l'expérience d'étirement et pendant le témoin.

Sur la figure 8.9, on avait pu remarquer que la population de cellules avec MRTF-A nucléaire ne croissait par rapport à l'expérience témoin qu'à partir de 60 minutes après étirement. On peut voir le même effet sur le graphe 8.10, où l'augmentation visible des transitions $H \rightarrow N$ ne commence qu'à partir de 60 minutes après étirement. En effet, la première vague d'événements $H \rightarrow N$ est issue de cellules où MRTF-A était homogène depuis le début de l'expérience. La seconde vague, visible entre 60 et 80 minutes, est composée pour moitié de cellules qui avaient MRTF-A dans le cytoplasme au début de l'expérience, puis qui sont passées de l'état C à H pendant la première heure après étirement, et continuent à accumuler MRTF-A dans le noyau pendant l'heure suivante.

Les événements rapides, $C \rightarrow N$ et $N \rightarrow C$ sont très rares : trois événements entrants sont observés au total, un lors de l'expérience témoin et deux lors de l'étirement, alors qu'aucun événement sortant n'a été observé.

La figure 8.11 représente le nombre d'événements entrants et sortants par cellule pour l'expérience d'étirement et son témoin. On peut observer que le nombre d'événements sortants ne varie pas avec l'étirement alors que le nombre d'événements entrants est multiplié par trois. Cela reflète bien ce qui était déjà visible sur la figure 8.10.

On peut donc en conclure que l'étirement est corrélé à une relocalisation de MRTF-A du cytoplasme vers le noyau, de manière à peu près continue pendant les deux heures d'étirement et d'observation.

De manière générale, les résultats sont conformes à ce qui était attendu : l'application d'une contrainte mécanique sur les cellules entraîne l'accumulation lente et progressive de MRTF-A dans le noyau. Le suivi dynamique nous montre qu'il y a peu de changements qui se produisent pendant les vingt premières minutes d'étirement. Par la suite, l'augmentation de la quantité d'événements entrants est maintenue pendant les deux heures que dure l'observation. La première hypothèse pour expliquer cette accumulation nucléaire de MRTF-A est que la contrainte oblige les cellules à renforcer leur cytosquelette d'actine, et donc crée un manque de monomères d'actine. Cette hypothèse est bien étayée par les résultats obtenus en sur-exprimant l'actine, ce qui empêche d'atteindre l'état où les monomères manquent, ou au contraire en stabilisant les filaments, ce qui rend cet état de pénurie de monomères plus rapide à atteindre.

**CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS
LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION
MÉCANIQUE**

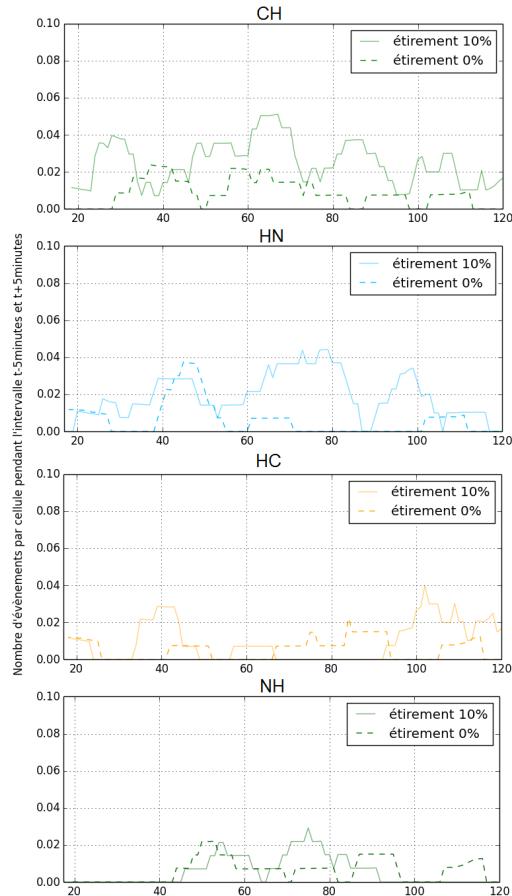


FIGURE 8.10 – Nombre d'événements ayant eu lieu pendant la fenêtre $[t-5\text{min}, t+5\text{min}]$ pour chaque type de transition possible divisé par le nombre de cellules observées. La première lettre du titre de chaque graphe représente l'état initial de la localisation de MRTF-A dans la cellule, la seconde lettre l'état final. Par exemple le premier graphe "CH" représente le nombre de cellules dans lesquelles MRTF-A est passée d'une localisation cytoplasmique à homogène dans l'intervalle $[t-5\text{min}; t+5\text{min}]$ divisé par le nombre total de cellules.

CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION MÉCANIQUE

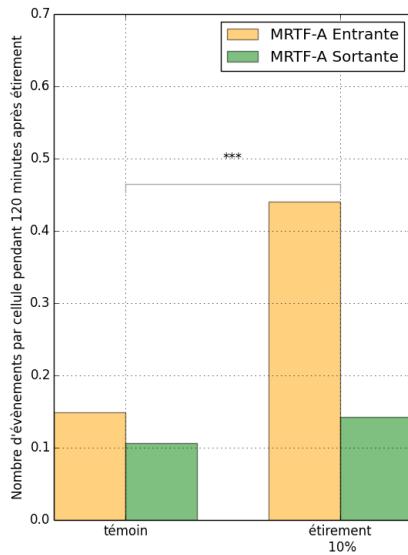


FIGURE 8.11 – Nombre d'évènements entrants ou sortants par cellule observée pendant 120 minutes, pour l'étirement 10% et pour le témoin. p=0.0003

8.3.4 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.

En effet, si l'on observe l'évolution des trois populations différentes par rapport au témoin, on peut voir sur la figure 8.12 que la quantité de cellules avec MRTF-A majoritairement cytoplasmique augmente, passant d'environ 50 % à $t=20$ minutes à plus de 60% au bout de 80 minutes d'étirement, lorsqu'elle atteint son maximum. Au contraire, on peut voir à $t=80$ minutes que les cellules pour lesquelles MRTF-A GFP est homogène, qui comptaient pour un quart de la population initialement, ne représentent plus que 15 % du total. Les cellules ayant MRTF-A majoritairement nucléaire sont elles en proportion inférieure à 20 % pendant toute la durée de l'expérience.

On constate donc que l'évolution de la population est à l'inverse de celle observée pour un étirement plus faible : de plus en plus de MRTF-A est confinée dans le cytoplasme.

De plus, sur la figure 8.13, on peut constater qu'il y a dès le début de l'expérience un pic net dans le nombre d'évènements sortants H → C entre 20 et 40 minutes, pendant lequel les évènements sont 6 fois plus nombreux que pour le témoin. Un pic synchronisé est visible dans les transitions sortantes N → H.

**CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS
LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION
MÉCANIQUE**

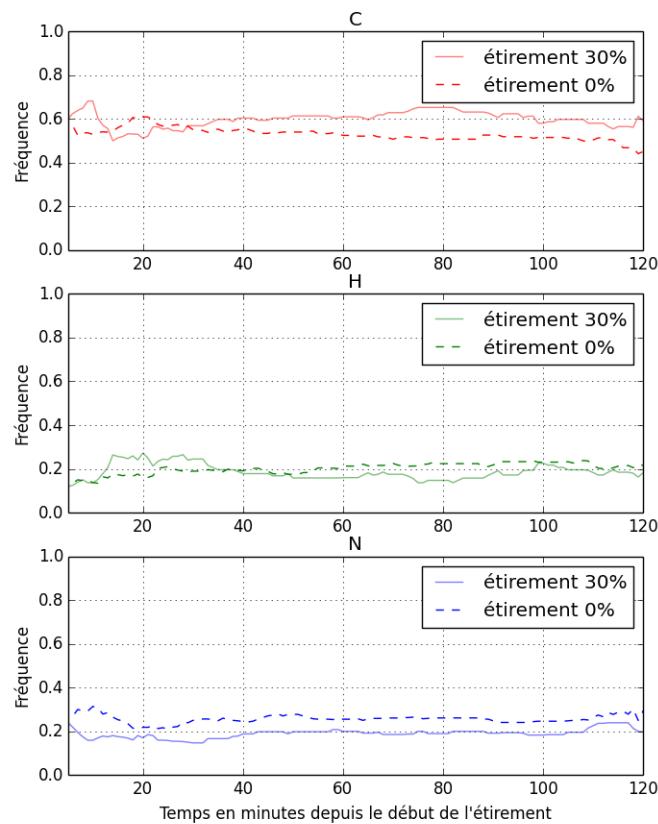


FIGURE 8.12 – Comparaison de l'évolution de la fréquence de chaque localisation de MRTF-A au cours du temps après 30% d'étirement ou dans les expériences témoins ($n=5$ et 141 cellules pour le témoins, $n=3$ et 102 cellules pour l'étirement 30%)

CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION MÉCANIQUE

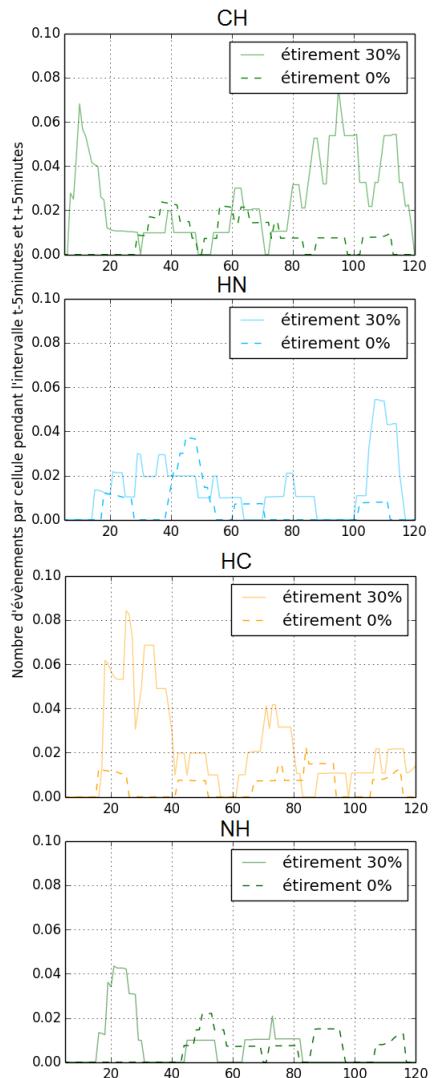


FIGURE 8.13 – Nombre d'événements ayant eu lieu pendant la fenêtre $[t-5\text{min}, t+5\text{min}]$ pour chaque type de transition possible divisé par le nombre de cellules observées. La première lettre du titre de chaque graphe représente l'état initial de la localisation de MRTF-A dans la cellule, la seconde lettre l'état final. Par exemple le premier graphe "CH" représente le nombre de cellules dans lesquelles MRTF-A est passée d'une localisation cytoplasmique à homogène dans l'intervalle $[t-5\text{min}; t+5\text{min}]$ divisé par le nombre total de cellules.

**CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS
LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION
MÉCANIQUE**

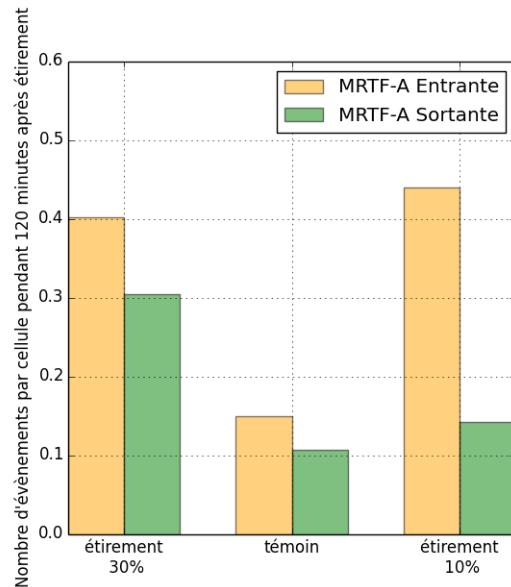


FIGURE 8.14 – Quantité de changements d'état par cellule pour les trois conditions différentes ($p=10^{-4}$, G-test d'indépendance).

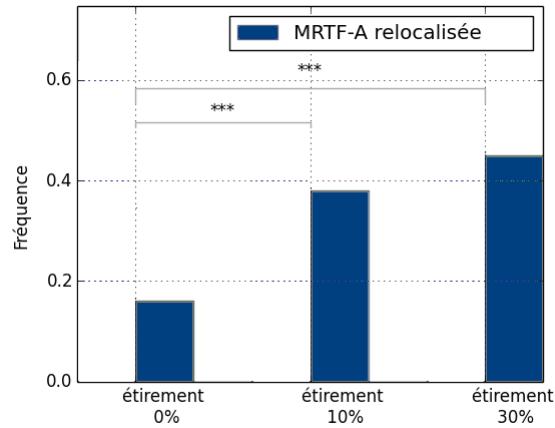


FIGURE 8.15 – Comparaison pour les deux étirements et le témoin de la proportion de cellules qui changent d'état au moins une fois pendant deux heures d'observation. *** : $p < \frac{0.001}{2}$, G-test d'indépendance.

CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION MÉCANIQUE

Au contraire, les événements entrants sont au même niveau que pendant l'expérience témoin pendant les 80 premières minutes de l'étirement 30%. À partir de $t=80$ minutes, on observe que le comportement s'inverse : il y a un grand nombre d'événements entrants et les événements sortants redescendent au niveau du témoin.

Un pic d'événements sortants devrait être lié à une grande quantité de G-actine libérée 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. Cette défaillance du cytosquelette d'actine à 30 % de déformation est de façon surprenante cohérente avec les mesures faites sur de l'actine *in vitro* JANMEY et al., 1994. À partir de $t=80$ minutes, lorsque les événements entrants commencent à augmenter, on verrait alors les conséquences d'une reconstruction progressive du cytosquelette.

On peut finalement remarquer que comme lors de l'autre expérience d'étirement, une grande partie des cellules change au moins une fois d'état pendant les deux heures d'observation, comme on peut le voir sur la figure 8.14, mais il y a nettement moins de déséquilibre entre les événements entrants et sortants ($p=0.014$, figure 8.15).

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, l'expression d'actine mCherry et de LifeAct RFP perturbe de manière trop importante le cytosquelette d'actine pour être utilisée 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, deux approches ont été essayées. La première est d'utiliser la SiRactine, un nouveau marqueur fluorescent pour les filaments d'actine, qui s'utilise directement sur les cellules sans rinçage. La seconde est de passer aux expériences fixées, qui ont l'avantage de pouvoir être marquées à la fois pour l'actine F et pour l'actine G. Pour cette dernière, il n'existe actuellement aucune sonde commerciale fonctionnant sur des cellules vivantes.

8.3.5 Visualisation de l'actine

Effet de la sur-expression d'actine mCherry

Lors de la double transfection MRTF-A GFP et actine mCherry, nous avons accès à deux populations de cellules simultanément. En effet, certaines cellules expriment les deux plasmides, tandis que d'autres n'expriment que MRTF-A GFP, et peuvent donc servir de témoin de l'effet de l'Actine mCherry. Ces expériences ont été étirées à 10 ou 30%, les résultats présentés ici sont les populations après 20 minutes d'étirement. Pendant les deux heures d'observation, la répartition des cellules est restée stable, et la fréquence des changements d'état est égale à celle observée pour les cellules témoins.

De manière similaire à ce qui était observé figure 8.2 pour les expériences

**CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS
LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION
MÉCANIQUE**

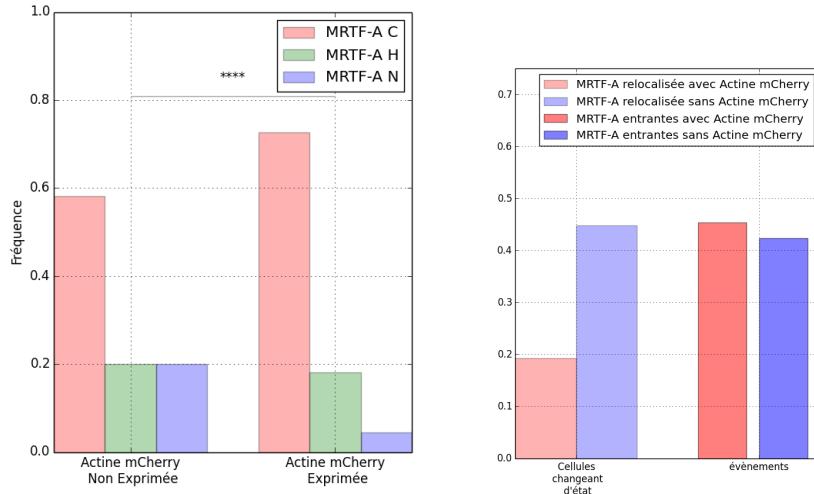


FIGURE 8.16 – Répartition initiale pour des cellules issues des mêmes expériences exprimant ou non le plasmide Actine mCherry (683 cellules témoin et 538 cellules expriment l’Actine mCherry). **** : $p < 10^{-4}$

FIGURE 8.17 – Proportion de cellules changeant au moins une fois d’état et proportion d’entrantes et de sortantes, pour les mêmes expériences, selon que l’Actine mCherry est exprimée ou non.

de pinces magnétiques, la sur-expression d’actine causée par l’introduction d’un plasmide d’actine mCherry cause des changements importants et significatifs à la localisation de MRTF-A dans la cellule.

Parmi les cellules qui expriment l’actine mCherry, la proportion de celles 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 importée dans le noyau (figure 8.16).

Lorsque l’on compare le nombre de cellules ayant changé d’état au moins une fois pendant les deux heures d’observation, on voit qu’il est divisé par deux lorsque l’actine mCherry est exprimée par les cellules (figure 8.17, 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 dans le noyau.

Finalement, la sur-expression d’actine mCherry bloque le changement de localisation de MRTF-A par rapport à des cellules dans les mêmes conditions n’exprimant pas l’actine mCherry, ce qui est facilement expliqué par le fait qu’une plus grande réserve d’actine monomérique va séquestrer MRTF-A dans le cytoplasme de manière plus efficace.

CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION MÉCANIQUE

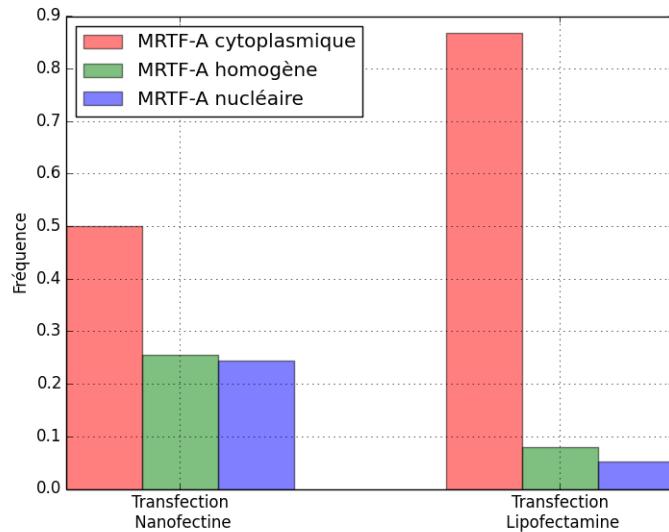


FIGURE 8.18 – Comparaison de l'état après 20 minutes d'étirement (dont nous avons vu précédemment qu'il est proche de l'état initial) pour des C2C12 étirées à 10% transfectées à la nanofectine (90 cellules en 5 expériences) ou à la lipofectamine (70 cellules en 4 expériences).

Utilisation de F-tractine RFP pendant l'étirement 10%

La LifeAct a montré ses effets pendant les expériences sur les pinces magnétiques, elle n'a donc pas été réutilisée pour les expériences d'étirement.

La F-tractine est un marqueur des filaments qui fonctionne de manière similaire, mais est réputé perturber moins le cytosquelette d'actine. Elle est constituée des 66 premiers acides aminés d'une protéine qui se lie aux filaments d'actine. Comme la LifeAct, son gène doit être transfecté préalablement dans la cellule.

Malheureusement, les expériences qui suivent n'ont pas pu être réalisées exactement dans les mêmes conditions que les expériences précédemment décrites. En effet, suite au rachat de notre fournisseur, la nanofectine n'est plus commercialisée. Les transfections MRTF-A GFP des expériences avec la F-tractine et avec la SiRactine ont donc dû être réalisées avec de la lipofectamine.

La figure 8.18 montre la différence entre les répartitions initiales pour les cellules transfectées à la nanofectine et celles transfectées à la lipofectamine. On voit que MRTF-A est beaucoup plus souvent localisée dans le cytoplasme avec la lipofectamine. Cela correspond bien à ce qui est visible pendant les expériences : avec la lipofectamine, on trouve plus de cellules exprimant le plasmide, mais le niveau de fluorescence est moins fort pour chacune. Les cellules pour lesquelles la transfection a réussi sur-expriment donc moins MRTF-A GFP que lors d'une

CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION MÉCANIQUE

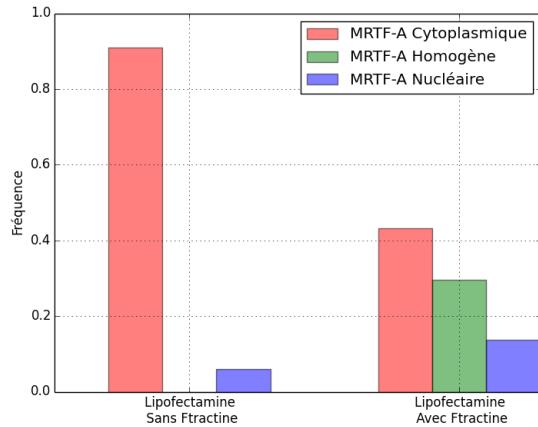


FIGURE 8.19 – Population initiale de cellules ayant MRTF-A cytoplasmique, homogène ou nucléaire, pour des C2C12 d'une même expérience, transfectées MRTF-A GFP et exprimant ou non la F-tractin RFP. Les cellules détachées pendant l'expérience ne sont pas représentées, mais comptent dans le total de 100%.

transfection à la nanofectine.

On peut voir sur la figure 8.19 que la F-tractin perturbe de manière importante la répartition de MRTF-A dans les cellules, et ce dès le début de l'observation. La quantité de cellules ayant MRTF-A cytoplasmique est divisée par deux dès le début de l'expérience.

Utilisation de SiRactine pendant l'étirement 10%

La SiRactine est un dérivé d'une drogue connue pour stabiliser les filaments d'actine, le jasplakinolide, couplé à un fluorophore dont la fluorescence sera 100 fois plus élevée lorsqu'elle est liée aux filaments d'actine. Elle a l'avantage de s'utiliser en très petites quantités, et directement sur les cellules à observer sans transfection et sans rinçage, ce qui fait que contrairement à l'actine mCherry ou à la LifeAct, toutes les cellules seront marquées à des niveaux semblables, et qu'elle est toujours disponible dans le milieu, ce qui permet de suivre la quantité de F-actine.

Durant ces expériences, nous avons réalisé des mesures quantitatives d'intensité de fluorescence en MRTF-A GFP et en SiRactine. Pour chaque cellule, on calcule le ratio entre les intensités médianes de fluorescence dans la zone péri-nucléaire et dans le noyau. Un ratio au-dessus de 1 correspond à une cellule qui était labellisée cytoplasmique, tandis qu'un ratio inférieur à 1 correspond à une localisation majoritairement nucléaire.

La figure 8.20 montre l'évolution de ces trois populations au cours du temps lors d'une expérience d'étirement 10% avant laquelle les cellules avaient été

CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION MÉCANIQUE

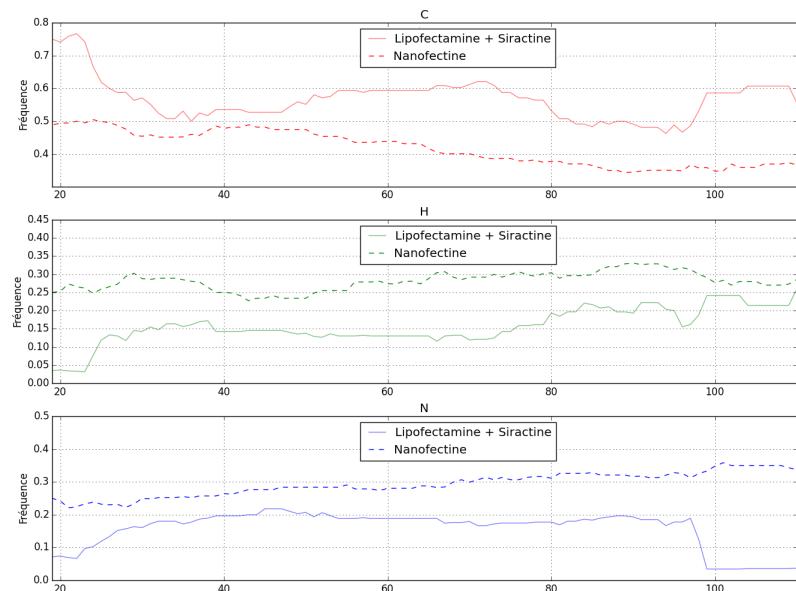


FIGURE 8.20 – Évolution de la population de cellules ayant MRTF-A cytoplasmique, homogène ou nucléaire en fonction du temps écoulé depuis le début de l'étirement à 10%, pour des C2C12 transfectées MRTF-A GFP avec de la nanofectine, et pour des C2C12 transfectées MRTF-A GFP avec de la lipofectamine et avec ajout de SiRactine pour visualiser les filaments d'actine.

**CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS
LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION
MÉCANIQUE**

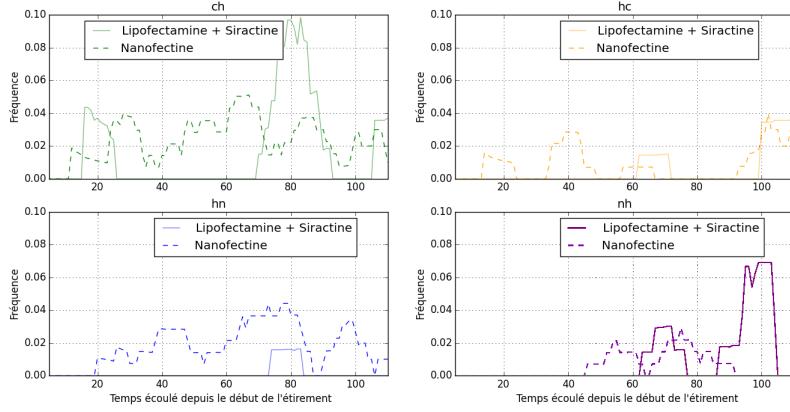


FIGURE 8.21 – Nombre d'évènements ayant eu lieu pendant la fenêtre $[t-5\text{min}, t+5\text{min}]$ pour chaque type de transition possible divisé par le nombre de cellules observées, pour des C2C12 transfectées MRTF-A GFP à la nanofectine et pour des C2C12 transfectées MRTF-A GFP à la lipofectamine et avec ajout de SiRactine, toutes étirées à 10%.

marquées à la SiRactine. On peut y voir à partir de 20 minutes après étirement une diminution du nombre de cellules ayant MRTF-A dans le cytoplasme et une augmentation des localisations homogène et nucléaire simultanées, pendant environ 20 minutes. Cette diminution correspond à un pic des événements $C \rightarrow H$ visible sur la figure 8.21. Sur la figure 8.22, on peut constater que l'intensité de fluorescence en SiRactine croît pendant cette période de temps, indiquant une polymérisation de l'actine.

Cette accumulation est suivie d'un plateau entre 40 et 60 minutes après l'étirement : la polymérisation de l'actine semble s'arrêter, tandis qu'en même temps le ratio moyen du signal MRTF-A GFP péri-nucléaire/nucléaire stagne et il y a un arrêt total des événements de changement de localisation.

À 60 minutes, la polymérisation d'actine reprend, et on peut voir qu'elle est suivie d'un pic de relocalisations de MRTF-A du cytoplasme vers le noyau (évenements $C \rightarrow H$) en retard d'environ 20 minutes par rapport à la reprise de la polymérisation.

Non seulement ces expériences confirment que la relocalisation de MRTF-A vers le noyau en réponse à l'étirement est précédée de polymérisation d'actine, mais elles nous donnent également un temps de réponse, estimé à 20 minutes, entre le début de la polymérisation et l'effet visible sur MRTF-A GFP. Cela explique pourquoi pendant les expériences précédentes, presque aucune différence n'était observée entre l'état initial et l'état à 20 minutes d'étirement.

La chute brutale observée après 90 minutes d'étirement est un artefact expérimental : une des deux expériences présentées ici n'a pas pu être poursuivie

CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION MÉCANIQUE

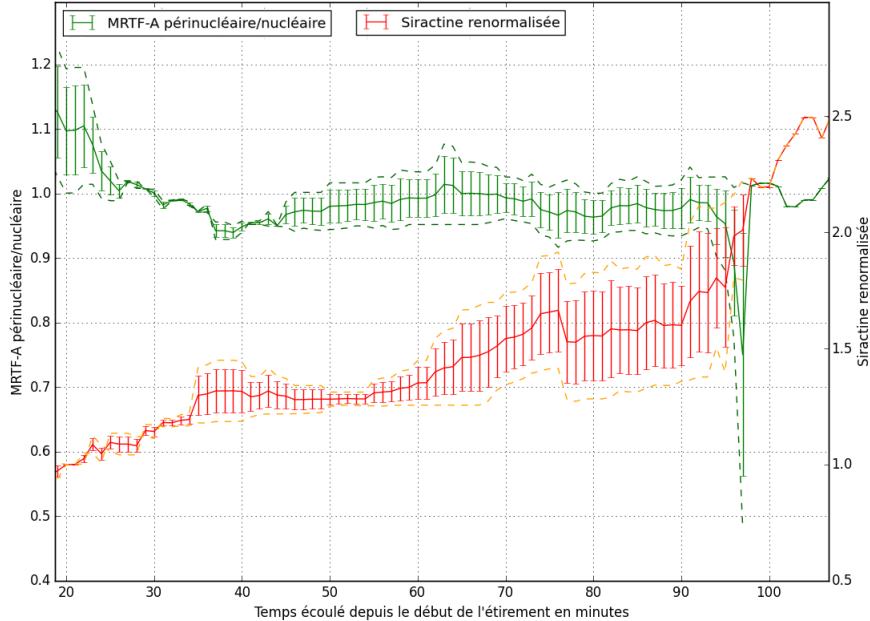


FIGURE 8.22 – Ratio des intensités médianes de MRTF-A GFP péri-nucléaire/nucléaire (en vert) et Intensité médiane de SiRactine renormalisée par l'intensité médiane à 20 minutes (en rouge) en fonction du temps écouté depuis le début de l'étiènement 10 % (2 expériences, 68 cellules, les tracés en pointillés représentent chacune des deux expériences).

plus longtemps, et à partir de $t=90$ minutes, la population de cellules observées chute brutalement, donnant un poids démesuré aux quelques cellules observées restantes. On peut d'ailleurs voir que la courbe de l'autre expérience (courbe verte en pointillés du haut) est stable.

Des expériences sont en cours pour réaliser des témoins transfectés à la lipofectamine, étirés mais sans marquage SiRactine, et des témoins transfectés à la lipofectamine, non étirés avec marquage SiRactine, afin de contrôler l'effet qu'a l'ajout de SiRactine sur la polymérisation et sur la localisation de MRTF-A. En comparant avec les expériences précédentes transfectées à la nanofectine, on peut constater que le pic d'entrées C \rightarrow H visible à 20 minutes est présent dans les deux conditions, mais qu'il est plus précoce pendant l'expérience avec SiRactine. Les deux expériences témoins devraient nous permettre de savoir si l'effet est dû au changement de méthode de transfection (qui change la quantité de MRTF-A GFP sur-exprimée) ou à l'ajout de SiRactine (qui pourrait stabiliser les filaments, par effet du jasplakinolide).

***CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS
LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION
MÉCANIQUE***

8.3.6 Synthèse des résultats de l'étirement des C2C12 observé en direct

Pendant ces expériences, nous avons étudié les effets de trois paramètres : du montage expérimental lui-même (état de référence et influence du montage et du rinçage), des techniques d'observation de l'actine (actine mCherry, LifeAct, F-tractin et SiRactine) et d'une stimulation mécanique (force exercée par les pinces magnétiques ou déformation du substrat).

Le système actine/MRTF-A apparaît extrêmement sensible, tant aux perturbations dues au montage expérimental qu'aux techniques d'observation de l'actine. Ainsi, changer la concentration en sérum par un rinçage avant l'expérience suffit à perturber le système et à faire entrer MRTF-A dans le noyau d'une partie de la population cellulaire.

De même, nous avons constaté que les trois produits utilisés pour marquer les filaments d'actine (LifeAct, F-tractin et SiRactine) contribuent à stabiliser les filaments suffisamment pour causer une accumulation nucléaire de MRTF-A, quand bien même leurs fabricants annonçaient un effet négligeable. Au contraire, l'ajout d'actine en excès par la transfection d'actine mCherry bloque MRTF-A dans le cytoplasme, de manière concordante avec les résultats de la littérature sur les actines non polymérisables.

Finalement, nous avons pu constater qu'une stimulation mécanique par l'intermédiaire des intégrines, tant au niveau local avec les pinces magnétiques, qu'au niveau global avec l'étireur, suffit à déclencher une accumulation nucléaire de MRTF-A, validant ainsi nos hypothèses de travail. Cependant, lorsque la contrainte devient trop importante (30% de déformation du substrat), le cytosquelette d'actine cède et l'excès de monomères d'actine issus de sa désintégration confine MRTF-A dans le cytoplasme.

8.3.7 Comparaison avec des expériences sur des myoblastes primaires

Le travail que j'ai présenté dans ce chapitre fait partie d'un projet plus important sur le rôle de MRTF-A dans la mécanotransduction des cellules musculaires. Alessandra Pincini, post-doc à l'Institut Cochin et au laboratoire Matière et Systèmes Complexes, a pour projet de mener des expériences similaires à celles que j'ai présentées sur les C2C12, mais avec des lignées de myoblastes primaires et des myotubes différenciés à partir de ces lignées. Pour cela, elle a conçu des lentivirus avec lesquels elle a infecté ces myoblastes primaires avec la MRTF-A GFP. Elle a créé ainsi plusieurs lignées de myoblastes qui expriment de manière stable MRTF-A GFP, et qu'elle peut différencier pour créer des myotubes fluorescents.

Durant la fin de ma thèse, afin de créer un tout cohérent avec les deux projets, Tiana Jacquemart, stagiaire de M1 au laboratoire MSC, a réalisé, avec l'aide d'Alessandra et la mienne, des expériences similaires à celles présentées à la section précédente, mais avec les myoblastes infectés créés par Alessandra Pincini.

CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION MÉCANIQUE

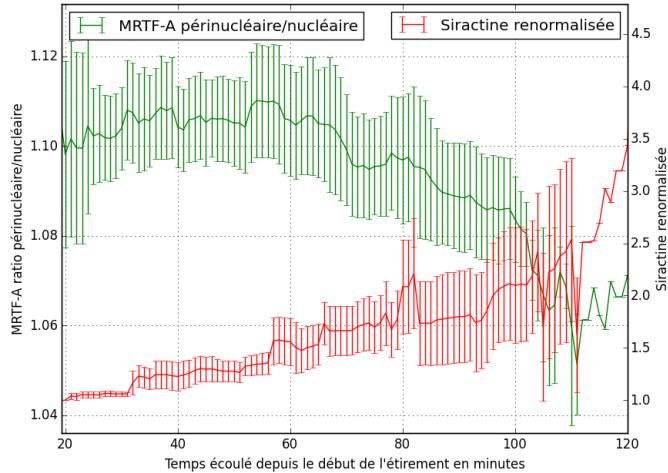


FIGURE 8.23 – Rapport des intensités médianes en MRTF-A GFP péri-nucléaire/nucléaire et Intensité en SiRactine normalisée en fonction du temps écoulé depuis le début de l'étirement pour des myoblastes primaires soumis à 10% d'étirement (5 expériences, 159 cellules).

Les myoblastes primaires adhèrent mal au PDMS recouvert de fibronectine qui était utilisé pour les C2C12. Pour les expériences d'étirement, ils sont enseencés sur des lamelles de Flexcell (Flexcell International Corporation) recouverts de collagène I. Ils sont ordinairement cultivés dans un milieu beaucoup plus riche en facteurs de croissance que les C2C12 (voir les détails au chapitre 6). Dans ces conditions, ils sont très motiles, et complètement insensibles à l'étirement du substrat. Afin de les amener dans des conditions plus proches des C2C12, leur milieu de culture habituel a été remplacé la veille des expériences par le milieu de culture utilisé pour les C2C12.

La figure 8.23 montre les évolutions temporelles du ratio MRTF-A péri-nucléaire/nucléaire et de l'intensité médiane en SiRactine pour ces myoblastes étirés à 10%. La SiRactine a une évolution proche de celle observée précédemment pour les C2C12 primaires, mais avec une croissance plus régulière au cours du temps. On peut en revanche constater que la dynamique de MRTF-A est différente : il faut attendre beaucoup plus longtemps après le début de la polymérisation pour avoir un effet sur la localisation de MRTF-A.

Après une heure d'étirement et de polarisation, le MRTF-A ratio diminue, ce qui signifie que la part de MRTF-A qui se trouve dans le noyau augmente. On a donc bien à nouveau une accumulation nucléaire de MRTF-A en réponse à un signal mécanique qui active la polymérisation d'actine.

Cependant, un contrôle réalisé avec des myoblastes primaires non marqués avec la SiRactine nous montre une absence d'accumulation nucléaire de MRTF-

**CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS
LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION
MÉCANIQUE**

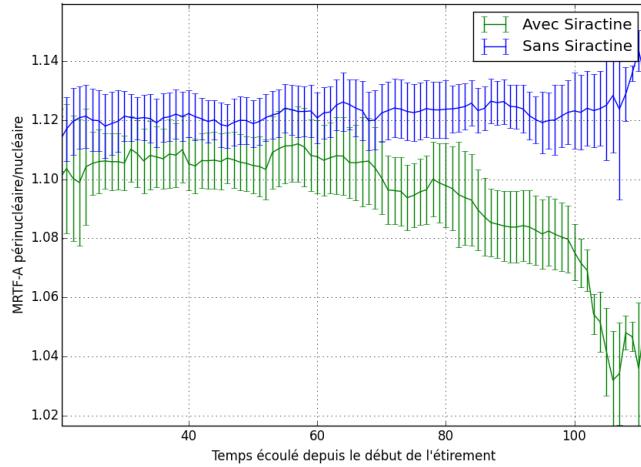


FIGURE 8.24 – Rapport des intensités médianes en MRTF-A GFP péri-nucléaire/nucléaire en fonction du temps écoulé depuis le début de l'étirement pour des myoblastes primaires soumis à 10% d'étirement avec et sans ajout de SiRactine (Avec SiRactine : 5 expériences, 159 cellules, Sans SiRactine : 5 expériences, 239 cellules)

A en réponse à l'étirement. Dès le début de l'expérience, on peut voir que le MRTF-A ratio moyen est plus élevé sans SiRactine qu'avec. La SiRactine est un dérivé d'une drogue connue pour stabiliser les filaments d'actine, il est donc raisonnable de supposer que l'ajout, même d'une quantité aussi faible (2,5nM), de Siractine, puisse augmenter la quantité de filaments d'actine dans la cellule au détriment des monomères, et contribuer à augmenter la quantité de MRTF-A dans le noyau. La différence entre les deux expériences pourrait alors s'expliquer ainsi : la SiRactine augmente la quantité de filaments par rapport aux monomères ; lorsque l'étirement est imposé, il y a polymérisation de l'actine dans les deux cas, mais c'est seulement dans le cas où le ratio F-actine/G-actine est déjà élevé que l'augmentation suffit à faire basculer l'équilibre en faveur d'une MRTF-A libre de rentrer dans le noyau.

Des expériences témoins sans étirement, avec ou sans SiRactine sont également en cours pour essayer de déterminer ce qui relève de l'effet de l'étirement et ce qui relève de l'ajout de SiRactine, en particulier pour vérifier que l'augmentation d'intensité de la SiRactine est bien liée à l'application de l'étirement.

La SiRactine s'est révélée un outil très efficace d'observation en direct de l'actine. Cependant, l'équilibre de MRTF-A GFP est suffisamment sensible pour détecter son influence même à de très faibles concentrations. Les marquages sur cellules fixées ont cet avantage de ne pas perturber les cellules, puisque les marqueurs sont ajoutés après la fin de la vie de la cellule. Ils nous permettent

CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION MÉCANIQUE

également de marquer la G-actine en plus de la F-actine, ce qui ne nous est actuellement pas possible sur des cellules vivantes.

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

Lors des expériences décrites ici, des cellules transfectées MRTF-A GFP étaient ensemencées sur 6 lamelles de PDMS. Puis chacune d'elle était successivement montée dans l'étireur, étirée à 10 ou 30 %, puis laissée en étirement à l'incubateur pendant un temps donné. Une fois le temps écoulé, la lamelle était démontée et fixée. Après fixation, l'actine F, l'actine G et le noyau étaient marqués, et les lamelles étaient observées en microscopie de fluorescence. Le protocole de l'étirement et du marquage sont décrits en détail dans le chapitre dédié aux méthodes expérimentales. Trois expériences indépendantes sur des cellules MRTF-A GFP ont été réalisées pour chacun des deux étirements possibles. Une expérience sur des cellules non transfectées, mais marquées avec un anti-corps contre MRTF-A, a été réalisée pour chaque étirement.

Initialement, l'un des objectifs était de pouvoir quantifier l'évolution de la quantité de F-actine par rapport à celle de G-actine. Cependant, il est apparu à la fin de la série d'expériences que l'intensité de fluorescence de la phalloïdine Alexa 647 était de moins en moins fiable avec le temps. Les expériences réalisées immédiatement après l'ouverture du flacon de phalloïdine Alexa 647, qui comprennent les trois expériences d'étirement 30 % et une seule expérience à 10%, sont exploitables. Dans les expériences réalisées plus tard, la phalloïdine devient beaucoup plus sensible au photo-blanchiment, et l'ordre dans lequel les lamelles sont observées est le déterminant majeur de l'intensité de fluorescence observée, ce qui fausse complètement les observations. Pour pallier à cet effet, pour les expériences suivantes qui concernent les cellules non transfectées, toutes les lamelles ont été observées le même jour et pendant des durées bien inférieures, afin de réduire l'influence du phénomène.

8.4.1 Résultats pour l'étirement 10% : expulsion de la G-actine hors du noyau

Pendant les expériences étirées à 10% en direct, on avait pu observer une tendance nette à l'accumulation de MRTF-A GFP dans le noyau des cellules.

L'observation la plus frappante des expériences d'étirement 10% sur cellules fixées concerne la localisation de l'actine monomérique dans la cellule. En effet, on peut constater sur la figure 8.25 pour quatre expériences indépendantes que la quantité d'actine monomérique dans le noyau semble décroître brutalement par rapport à l'actine monomérique dans le cytoplasme, entre 10 et 20 minutes après le début de l'étirement, avant de retrouver sa localisation initiale. Cela ressemble à une expulsion massive des monomères d'actine hors du noyau.

Ce résultat peut paraître contre-intuitif : comment cette expulsion d'actine hors du noyau, qui diminue notablement le ratio F/G peut-il permettre l'ac-

*CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS
LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION
MÉCANIQUE*

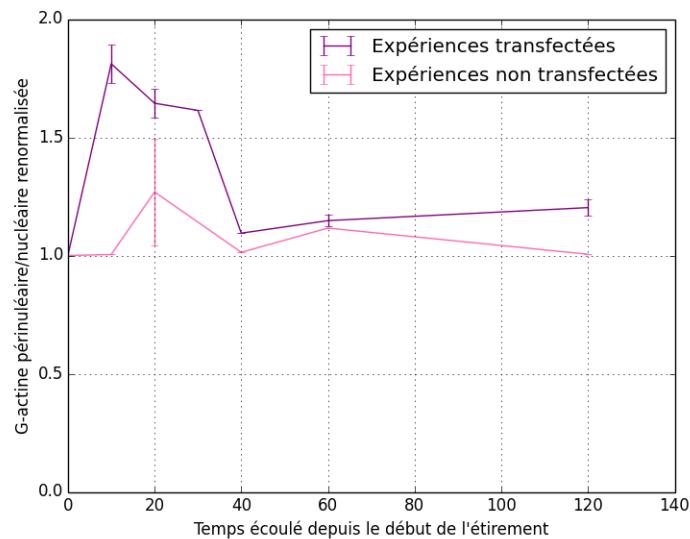


FIGURE 8.25 – Intensité médiane du signal en DNase I (G-actine) dans la zone périnucléaire par rapport à la zone nucléaire, pour deux expériences sur des cellules MRTF-A GFP et deux expériences sur des cellules MRTF-A endogène, étirées à 10%. Les données sont normalisées par la valeur au temps $t=0$, pour enlever les variations dues à la qualité du marquage d'une expérience à l'autre.

CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION MÉCANIQUE

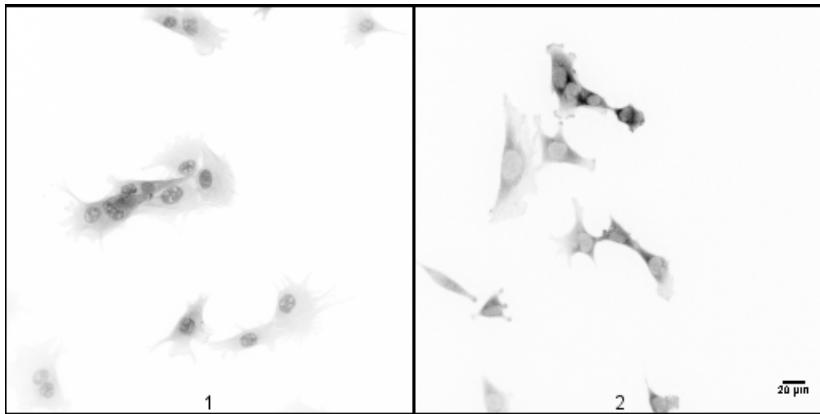


FIGURE 8.26 – Marquage de l’actine monomérique avec de la DNase I dans des C2C12 soumises à 10% d’étirement. L’image numéro 1 est un témoin ($t=0$), l’image numéro 2 a été fixée après 10 minutes d’étirement. On peut voir l’actine monomérique, initialement majoritairement nucléaire être expulsée vers le cytoplasme à 10 minutes.

cumulation nucléaire de MRTF-A ? En réalité, il existe deux manières pour la cellule de confiner MRTF-A dans le noyau. La première est liée au manque de G-actine dans le cytoplasme, qui va conduire à l’import rapide de MRTF-A. La seconde est liée au manque de G-actine dans le noyau, qui va empêcher MRTF-A de sortir du noyau, car cette dernière a besoin de se lier à la G-actine pour être exportée. Ici c’est donc le manque de G-actine dans le noyau qui conduit à l’accumulation de MRTF-A GFP.

Or récemment, il a été montré que la protéine MICAL-2, présente majoritairement dans le noyau, est capable, en réponse au sérum, de dépolymériser les filaments d’actine en oxydant les monomères qui les composent (LUNDQUIST et al., 2014). De plus, ces monomères d’actine oxydée sont expulsés du noyau. Il a également été montré que MICAL-2 joue un rôle dans l’accumulation d’actine dans le noyau et l’exclusion de MRTF-A dans le cytoplasme des cellules musculaires lors de l’atrophie provoquée par une dénervation chez la souris (COLLARD et al., 2014). MICAL-2 apparaît donc comme une piste sérieuse pour expliquer l’expulsion massive d’actine monomérique hors du noyau suite à l’application de l’étirement.

De manière encore inexpliquée pour l’instant, une des expériences avec des cellules non transfectées ne montre pas cet effet sur l’actine monomérique autour de 10 à 20 minutes d’étirement. Tout au plus peut-on observer une augmentation du ratio de G-actine péri-nucléaire par rapport à nucléaire au bout de 40 minutes. Une des pistes pour expliquer cette différence avec les autres expériences pourrait être la quantité de DMEM plus importante mise dans chaque puits, à concentration égale, pour les besoins de cette expérience, qui mènerait à une plus grande concentration en sérum le lendemain de l’expérience. La concentra-

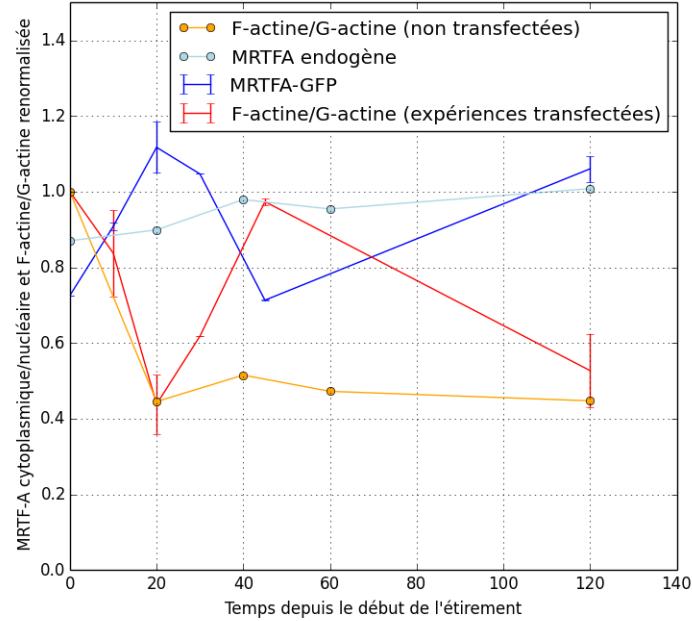


FIGURE 8.27 – Intensité médiane de MRTFA-GFP ou de MRTFA-A endogène dans la zone péri-nucléaire par rapport à la zone nucléaire (en bleu) et intensité médiane de la phalloïdine (F-actine) par rapport à la DNaseI (G-actine) (en rouge et orange) au cours du temps, pour trois expériences transfectées et une non transfectée, étirées à 30%.

tion en sérum et la quantité d'actine monomérique ont en effet déjà été liées dans d'autres expériences Stephane MOUILLERON et al., 2008, VARTAINEN et al., 2007, LUNDQUIST et al., 2014.

8.4.2 Résultats pour l'étirement 30% : une dépolymérisation des filaments d'actine dans le cytoplasme

Les résultats des expériences à 30% d'étirement pointaient vers une dépolymérisation brutale du cytosquelette d'actine en réponse à l'étirement.

Ces résultats sont confirmés par les expériences, tant en MRTF-A GFP qu'en MRTF-A endogène. On peut constater sur la figure 8.27 que 20 minutes après le début de l'étirement la proportion d'actine F par rapport à l'actine G est diminuée de moitié. Cette diminution est accompagnée d'une diminution de l'aire des cellules visible sur la figure 8.28. Cela confirme que les cellules ne peuvent pas supporter des déformations aussi importantes, en conséquence de quoi elles se décollent partiellement et leur réseau d'actine est dépolymé-

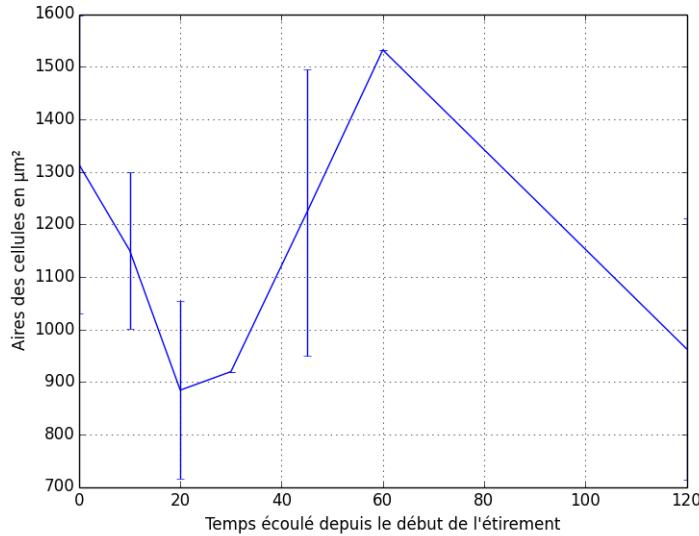


FIGURE 8.28 – Aire moyenne de cellules transfectées MRTF-A GFP au cours du temps pendant l’étirement 30%, correspondant aux courbes bleue (MRTF-A GFP) et rouge (ratio actine F/G) de la figure 8.27

risé. De plus, MRTF-A est relocalisée vers le cytoplasme de manière quasiment simultanée.

On voit que la destruction du cytosquelette se fait progressivement : elle a déjà débuté après 10 minutes d’étirement, mais atteint son maximum 20 minutes après l’étirement. En revanche, il n’y a pas de décalage temporel entre la dépolymérisation du réseau d’actine et la relocalisation de MRTF-A. L’étape cinétiquement déterminante ici est liée à la réorganisation du cytosquelette.

La dépolymérisation est suivie d’une récupération qui se fait à un rythme variable d’une expérience à l’autre, sans que l’on ait pour l’instant réussi à distinguer l’origine de cette variabilité.

On constate également que l’expulsion de l’actine monomérique du noyau est présente mais de manière beaucoup moins marquée que lors de l’étirement à 10 %. Cela pourrait signifier que la même voie que pour l’étirement à 10 % est activée, mais que son action est diminuée et masquée par les dommages causés au cytosquelette, jusqu’au moment où la récupération a eu lieu.

8.5 Synthèse des résultats expérimentaux

Durant cette thèse, nous avons observé l’effet de deux types de contraintes mécaniques, locales avec les pinces magnétiques et globales avec l’étirement du substrat, sur la localisation de la protéine MRTF-A et sur l’état du cytosque-

**CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS
LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION
MÉCANIQUE**

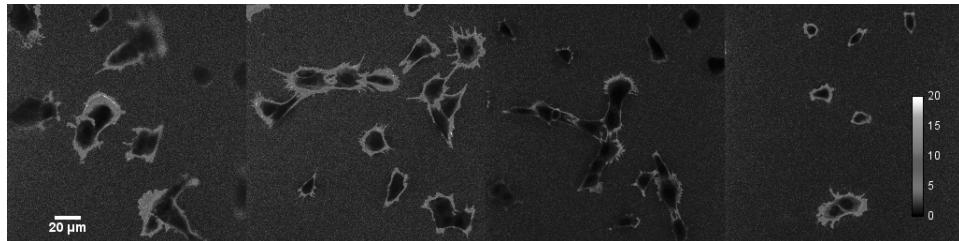


FIGURE 8.29 – Images du ratio d'actine F/G pixel par pixel de C2C12 transfectées MRTF-A GFP, étirées à 30%, fixées à différents temps et marquées de manière identique avec de la phalloïdine (actine F) et de la DNase I (actine G). De gauche à droite : témoin $t=0$, 10, 20 et 45 minutes après étirement.

lette d'actine dans des myoblastes. Il en ressort clairement que l'application d'une contrainte modérée induit une polymérisation de l'actine, qui précède une relocalisation progressive de MRTF-A du cytoplasme vers le noyau des cellules. Lorsque la contrainte est plus élevée, le cytosquelette d'actine peut être abîmé, et subir une dépolymérisation partielle qui s'accompagne d'une relocalisation très rapide de MRTF-A vers le cytoplasme.

Ces deux résultats sont tout à fait cohérents avec les résultats déjà publiés à propos des mécanismes de régulation de la localisation de MRTF-A par l'actine présentés dans le chapitre 3 : lorsque l'actine polymérise, il n'y a plus assez de monomères d'actine pour se lier à MRTF-A, et celle-ci est libre d'être transportée vers le noyau. Tant qu'il y a peu de monomères d'actine dans le noyau, elle y est séquestrée. Au contraire, lorsque beaucoup de monomères d'actine sont disponibles pour se lier à MRTF-A (comme dans le cas de la dépolymérisation à grand étirement), celle-ci est éjectée du noyau et séquestrée dans le cytoplasme.

On a également pu voir que toute perturbation de l'équilibre entre les filaments et les monomères d'actine a une influence visible sur la localisation de MRTF-A. Lorsque l'actine est sur-exprimée, l'abondance de monomères disponibles maintient MRTF-A dans le cytoplasme et bloque tout effet de l'étirement. Au contraire, lorsque la LifeAct, la F-tractine ou la SiRactine favorisent la stabilité des filaments, MRTF-A s'accumule plus souvent dans le noyau, et l'effet des stimulations mécaniques est augmenté. Enfin, nous avons pu voir que même un changement minime de concentration de sérum comme le rinçage peut suffire à perturber la localisation de MRTF-A. Bien que l'effet du sérum ait été abondamment décrit dans la littérature, il s'agissait de changements importants de concentration. Nous avons montré ici qu'il faut être attentif à la moindre perturbation de l'équilibre entre filaments et monomères d'actine, que ce soit par les marqueurs du cytosquelette ou par le sérum, lorsque l'on souhaite étudier MRTF-A.

Les résultats obtenus avec les pinces magnétiques sont considérablement enrichis par les expériences menées sur les substrats étirables. En effet, on a pu voir dans l'exploration des expériences témoins sans étirement que même lors-

CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION MÉCANIQUE

qu'il y a eu rinçage avec le sérum, significativement moins de cellules voient une relocalisation de MRTF-A en 30 minutes lorsqu'il n'y a aucune stimulation mécanique par rapport à des cellules stimulées par les pinces magnétiques⁴. On peut également observer les effets similaires sur la cinétique de la LifeAct exprimée dans les expériences de pinces et de la SiRactine pendant les expériences d'étirement. Dans les deux cas, la stabilisation des filaments que ces marqueurs induisent accélère la vitesse des relocalisations de MRTF-A en réponse à la force. Dans le cas des pinces magnétiques, le changement est particulièrement visible car des relocalisations qui n'étaient peut-être pas dans notre fenêtre temporelle d'observation lors des expériences de pinces le sont devenues lorsque la cinétique a été accélérée.

Rétrospectivement, notre choix d'échelle de temps d'observation avec les pinces magnétiques (30 minutes) était trop court lorsqu'on le compare aux échelles de temps auxquelles on peut voir des changements pendant l'étirement. Cependant, il est très long de construire une statistique de population lorsqu'on observe chaque cellule individuellement pendant deux heures.

Le début des expériences sur les myoblastes primaires fait le pont entre ce qui a été montré sur les C2C12 et les expériences que mène Alessandra Pincini sur les myotubes, qui sont des cellules beaucoup plus proches de l'organisation des cellules musculaires matures. Nous avons constaté sur les myoblastes primaires le même effet perturbateur de la SiRactine, mais leur comportement en réponse à l'étirement n'est pas tout à fait le même que celui des C2C12. À terme, des expériences allant des myoblastes aux myotubes viendront compléter l'espace entre les expériences *in vitro* sur les C2C12 et les expériences *in vivo* sur les souris de GUERCI et al., 2012 et COLLARD et al., 2014, pour former une image complète du rôle de MRTF-A dans les cellules musculaires.

Enfin, les changements de localisation de l'actine monomérique, qui est exclue du noyau lors de l'étirement sur les cellules fixées, est un nouvel élément intrigant de la régulation de MRTF-A. Les récentes mises en évidence de MICAL-2 (LUNDQUIST et al., 2014, COLLARD et al., 2014) et de la polymérisation de l'actine nucléaire (BAARLINK et al., 2013) comme les acteurs de la régulation de MRTF-A donnent des pistes pour expliquer ces observations. Une régulation de MRTF-A à deux éléments commence à se dessiner avec ces dernières expériences : un premier mécanisme organise la polymérisation des filaments et donc l'appauvrissement en G-actine dans le cytoplasme qui sont nécessaires pour faire entrer MRTF-A dans le noyau, tandis qu'un second mécanisme dépendant de MICAL-2 organise l'expulsion de l'actine du noyau pour empêcher MRTF-A de sortir du noyau. Les deux mécanismes se complètent alors pour s'assurer que MRTF-A entre dans le noyau et ne puisse pas en ressortir, conduisant à une accumulation de longue durée de MRTF-A dans le noyau.

De nouvelles expériences, en particulier avec les SiRNA anti-MICAL-2 qui

4. Une différence subsiste entre le témoin et les expériences de pinces : les cellules témoins sont ensemencées sur du PDMS, alors que les cellules des expériences de pinces sont sur du verre. Il faudrait faire un témoin sur le verre pour déterminer si c'est la rigidité du substrat ou la force exercée par les pinces qui change le comportement, mais dans les deux cas la source est mécanique.

*CHAPITRE 8. CHANGEMENT DE LOCALISATION DE MRTF-A DANS
LES CELLULES MUSCULAIRES EN RÉPONSE À UNE STIMULATION
MÉCANIQUE*

viennent d'être développés par Alessandra Pincini, permettront d'explorer ces nouvelles pistes.

Conclusions et perspectives

Les premiers, et les plus tangibles résultats de cette thèse sont les deux dispositifs expérimentaux que j'ai construits : les pinces magnétiques et l'étireur. Les pinces magnétiques permettent de faire de la rhéologie, ou d'exercer des forces pour observer leur réponse biologique avec la microscopie de fluorescence, et même de faire ces deux choses en même temps. Elles ont été conçues pour être transportables d'un microscope à l'autre et adaptées à des expériences différentes.

Pendant ma thèse, j'ai mesuré avec ces pinces magnétiques les propriétés rhéologiques de myoblastes murins C2C12, et j'ai pu m'apercevoir que leur comportement en réponse à l'application d'une force dépend principalement de l'endroit et de la direction dans laquelle s'appliquent ces forces. Pour poursuivre les investigations, il s'agirait probablement maintenant de combiner la technique des pinces à celle des micro-patrons adhésifs, que David Pereira, en thèse avec Sylvie Hénon dans notre équipe, explore déjà dans le cadre d'un autre projet. On pourrait alors contrôler la géométrie de la cellule et observer de manière beaucoup plus systématique la réponse mécanique lors d'une stimulation à des endroits différents de la cellule.

Les pinces magnétiques m'ont également servi à tester la réponse du facteur de transcription MRTF-A à des forces extérieures. On a constaté un effet particulièrement marqué de la contrainte mécanique sur la relocalisation de MRTF-A lorsque la LifeAct stabilise les filaments d'actine, même s'il semble y avoir un effet, plus faible ou plus lent, dans les expériences avec MRTF-A GFP seulement.

Elles ont aussi servi dans plusieurs collaborations à l'intérieur et à l'extérieur du laboratoire. Au sein de MSC, Elisabeth Charrier a, pendant sa thèse, utilisé les pinces magnétiques pour caractériser la rhéologie de cellules possédant une version mutante du gène de la desmine, le filament intermédiaire des cellules musculaires. Pierre-Olivier Strale est également venu utiliser avec moi les pinces magnétiques pour observer les propriétés mécaniques de cadhérines mutantes (article en annexe).

L'expérience d'étirement a été un prototype, avec lequel j'ai pu réaliser un grand nombre d'expériences dans différentes conditions, avec au total plusieurs milliers de cellules observées. Depuis, un deuxième étireur identique au premier a été fabriqué par l'atelier du laboratoire. Une version pour appliquer l'étirement sur 6 puits en même temps est actuellement développée par Sylvie Hénon, qui permettrait de réaliser des expériences dans un grand nombre de conditions

Conclusions et perspectives

en même temps, en particulier pour l'étude des voies de signalisation avec des siRNA. L'étireur a été utilisé non seulement sur des C2C12 et des myoblastes primaires, comme présenté dans ma thèse, mais il est également utilisé par Alessandra Pincini pour mener des expériences analogues sur les myotubes.

L'objectif principal de cette thèse était de savoir si l'application de contraintes mécaniques sur des myoblastes *in vitro* était suffisant pour relocaliser le facteur de transcription MRTF-A dans le noyau des cellules. L'équilibre entre l'actine en filaments et l'actine monomérique était déjà connu comme le régulateur principal de la localisation de MRTF-A dans la cellule, et donc de son activité. Les rôles du sérum et de la voie RhoA avaient été déjà largement explorés *in vitro*.

Ici, nous avons montré qu'une contrainte mécanique sur des myoblastes est à l'origine d'une réorganisation du cytosquelette d'actine qui entraîne une accumulation de MRTF-A dans le noyau de la cellule, là où elle pourra activer SRF, en accord avec les mécanismes qui avaient déjà lié MRTF-A et l'actine. Nous avons également pu observer que cette polymérisation d'actine précède l'accumulation de MRTF-A d'environ 20 minutes.

Avec l'expression d'actine mCherry, de LifeAct RFP et de F-tractine, et avec l'ajout de SiRactine, nous avons également pu constater que toute perturbation de l'équilibre entre F-actine et G-actine est susceptible de provoquer des changements dans la localisation de MRTF-A au sein d'une population. Cela prouve la très grande sensibilité du système aux changements de l'équilibre de l'actine, capable de détecter des changements dus à des marqueurs qui sont censés perturber aussi peu que possible cet équilibre.

Les changements de localisation de l'actine monomérique que nous avons observés sont la prochaine piste à explorer dans les résultats d'étirement. Ils sont d'autant plus renforcés par la récente mise en évidence du rôle de MICAL-2, qui dépolymérise et expulse l'actine du noyau, dans les protéines qui régulent MRTF-A, en particulier dans le cadre de l'atrophie musculaire. C'est une nouvelle voie de régulation de SRF qui pourrait être complémentaire de la voie de polymérisation de l'actine. La voie RhoA assurerait alors l'entrée de MRTF-A dans le noyau en organisant la pénurie de monomères d'actine dans le cytoplasme, tandis que MICAL-2 assurerait la séquestration de MRTF-A dans le noyau en organisant la pénurie de monomères dans le noyau.

En associant les expériences menées pendant ma thèse sur les C2C12 et sur les myoblastes primaires, et les expériences menées par Alessandra Pincini sur les myoblastes primaires et les myotubes à l'aide de l'étireur, nous obtiendrons un paysage complet de la régulation de la localisation de MRTF-A par les contraintes mécaniques qui complètera les études menées précédemment à l'Institut Cochin sur les souris.

Alessandra Pincini a déjà testé des siRNA de MICAL-2, ce qui va permettre de tester rapidement ces hypothèses. Cela nous permettra de savoir si la relocalisation de l'actine monomérique vers le noyau observée juste après l'étirement 10% dans les expériences fixées est liée à l'activité de MICAL-2, et si son activité est nécessaire pour l'entrée ou pour le maintien de MRTF-A dans le noyau. Il faudra également chercher les voies de signalisation en amont de MICAL-2 dans la cellule musculaire, qui ne sont actuellement pas du tout connues.

Conclusions et perspectives

Il serait également intéressant de varier les types de sollicitations mécaniques. Par exemple, voir si la réponse à des étirements cycliques plutôt que permanents est différente, et en quoi, car physiologiquement les muscles sont soumis aux deux types de stimulus. On peut également soumettre les myotubes, qui ont une grande asymétrie d'organisation, à des étirements selon leur axe le plus long ou le plus court, et observer comment cela affecte leur réponse. Les myotubes sont des cellules plurinucléées, et lorsqu'ils sont étirés, MRTF-A s'accumule dans tous les noyaux en même temps. Il serait également intéressant de voir si lorsqu'ils sont soumis à une contrainte locale, comme peuvent en exercer les pinces, MRTF-A est relocalisée dans tous les noyaux, ou seulement à une échelle locale dans les noyaux proches du lieu de stimulation.

Nous souhaitons également développer un modèle qui puisse expliquer la dynamique de la polymérisation et le changement de localisation de MRTF-A au cours du temps.

Enfin, SRF contrôle un grand nombre de gènes du cytosquelette, en particulier ceux de l'actine. Le système actine/MRTF-A/SRF a donc une boucle de rétro-action, qui permet de produire plus d'actine lorsqu'il n'y a plus de monomères. À terme, il faudra aussi observer ce qui se passe dans la cellule une fois que les gènes cibles de SRF ont été exprimés, pour voir comment cette boucle de rétro-action agit.