HAL
open science

Symétrie brisée et renforcement de contacts cellulaires

Julien Brevier

To cite this version:

Julien Brevier. Symétrie brisée et renforcement de contacts cellulaires. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT : . tel-00093284

HAL Id: tel-00093284

https://theses.hal.science/tel-00093284

Submitted on 13 Sep 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Joseph Fourier
Grenoble I

Discipline **: Physique**

présentée et soutenue publiquement
par :

Julien Brevier

le 11 juillet 2006

Symétrie brisée et renforcement de contacts cellulaires

Composition du jury :

Patricia Bassereau (Rapporteur)
Marie-France Carlier (Rapporteur)
Bertrand Fourcade
Georg Maret
René-Marc Mège
Daniel Riveline (Directeur de thèse)
Marcel Vallade (Directeur de thèse)

Thèse préparée au Laboratoire de Spectrométrie Physique
CNRS - GRENOBLE

Remerciements

Tout d'abord, je remercie les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail :

- Bertrand Fourcade pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury et pour les échanges enrichissants que nous avons pu avoir à Grenoble ;
- Patricia Bassereau pour avoir accepté d'être rapporteur malgré le calendrier très serré que je lui ai imposé ;
- Marie-France Carlier également pour avoir accepté d'être rapporteur mais aussi pour toutes les discussions qui ont permis de faire avancer ce travail ; j'espère que nous nous rencontrerons de nouveau à l'improviste sur les chemins des Alpes ;
- Georg Maret qui a bien voulu faire partie de ce jury malgré l'éloignement physique et thématique ; merci également de m'avoir accueilli au laboratoire de physique de Konstanz, ces quelques mois m'ont permis de prendre un recul bénéfique sur mon sujet de thèse ; merci enfin pour la bourse de thèse qui m'a été accordée dans la cadre du Collège Franco-Allemand ;
- René-Marc Mège pour être venu jusqu'à Grenoble et pour tout ce que j'ai pu apprendre à son contact ;
- Marcel Vallade pour m'avoir accueilli dans l'équipe PHASE2, puis BOM, puis BIOP au labo de Spectro.

Une grande partie de ces remerciements vont à Daniel Riveline qui a eu la lourde tache d'encadrer cette thèse. Merci pour ta disponibilité, ta patience (dont j'ai abusé), pour les nombreuses discussions que nous avons eues (et que nous aurons encore j'espère) et pour m'avoir remis sur la voie à chaque fois que ça n'allait pas (c'est-à-dire souvent). J'ai appris énormément à ton contact.

Merci également à toutes les personnes qui ont contribué à faire avancer cette thèse à tous points de vue (en particulier Jean-François Joanny et Raphaël Voituriez pour la partie théorique, Sacha Bershadsky pour son regard critique, Danielle Gulino et son équipe de l'IBS pour les discussions concernant la VE-cadhérine, Dédé, Jérôme et tous ceux de l'atelier de mécanique).

Merci à tous ceux qui ont été au rendez-vous tous les midis (Pascale, Malika, Benjamin, Cyrille, Christophe, Jan-Paul, Jos, Jacek,...) et pour toutes les discussions qu'on a pu avoir. Merci à Malika d'avoir garder mon bureau, à Hélène d'avoir partagé la salle de manip. Merci à Lionel, Coralie, Bibi, Manu, Paul, Émilie, Miguel, Solenne,... pour les sorties fléchettes, rando, bières ou autres.

Merci enfin à Gaëlle de partager ma vie et de m'avoir soutenu sans faiblir.

Table des Matières

1 Introduction générale **5**
1.1 La cellule et l'adhésion cellulaire . . . 5
1.1.1 Description succincte de la cellule . . . 5
1.1.2 L'adhésion cellulaire . . . 6
1.1.3 La membrane plasmique . . . 8
1.1.4 Le cytosquelette . . . 10
1.1.4.1 Les microtubules . . . 10
1.1.4.2 Les filaments intermédiaires . . . 12
1.1.4.3 Les microfilaments d'actine . . . 13
1.1.5 Les GTPases de la famille Rho . . . 18
1.2 Modèles physiques généraux de l'adhésion cellulaire . . . 18
1.2.1 Adhésion entre deux cellules . . . 19
1.2.1.1 Le modèle de Bell-Dembo-Bongrand . . . 19
1.2.1.2 Améliorations du modèle . . . 20
1.2.1.3 Vérifications expérimentales . . . 22
1.2.2 Point de vue mésoscopique sur les adhésions : le lien entre biologie et physique . . . 24
1.3 Contacts focaux . . . 25
1.3.1 Composition . . . 26
1.3.2 Assemblage, rôle et régulation . . . 28
1.3.3 Mécanosension . . . 29
1.3.4 Modélisation de la croissance des contacts focaux . . . 31
1.4 Jonctions adhérentes . . . 34
1.4.1 Composition . . . 34
1.4.2 Rôle et régulation . . . 35
1.4.3 Implication du cytosquelette d'actine dans la formation des jonctions adhérentes . . . 37
1.5 Conclusion . . . 38

2 Méthodes expérimentales **39**
2.1 Les cellules . . . 39
2.1.1 Types cellulaires . . . 39
2.1.2 Entretien des cellules . . . 40
2.1.3 Congélation et décongélation des cellules . . . 40
2.1.3.1 Congélation . . . 40
2.1.3.2 Décongélation . . . 40
2.1.4 Transfections . . . 41
2.1.4.1 Protocole de transfection par complexation avec un polymère cationique . . . 41
2.1.4.2 Protocole de transfection par complexation avec un précipité de Calcium-Phosphate . . . 41

2.1.5 Clonage 42
2.1.6 Constructions utilisées 42
2.1.7 Fixation et immunofluorescence 43
2.1.7.1 Fixation standard 43
2.1.7.2 Fixation et perméablisation au méthanol froid 43
2.1.7.3 Immunofluorescence 43
2.1.8 Observation de l'incorporation de la fibronectine sur des cellules vivantes 44
2.1.9 Application de forces 44
2.2 Les réactifs 45
2.2.1 Réactifs agissant sur le cytosquelette d'actine 45
2.2.1.1 Y-27632 45
2.2.1.2 Blebbistatine 45
2.2.1.3 Nocodazole 46
2.2.1.4 Latrunculine A 46
2.2.2 Réactifs agissant sur la membrane plasmique 46
2.2.2.1 Acide déoxycholique (DOA) 46
2.3 Montages optiques 46
2.3.1 Matériel 46
2.3.2 Microscopie par ondes évanescentes 47
2.4 Mesures 48
2.4.1 Mesures d'aire et d'intensité de fluorescence 48
2.4.2 Traitement des données 50

3 FORMATION DES JONCTIONS ADHÉRENTES 51
3.1 Morphologie des contacts et nomenclature 51
3.1.1 Morphologie 51
3.1.2 Nomenclature 51
3.1.2.1 Distinction entre cellule donneuse et cellule receveuse . . . 52
3.1.3 Validité des approches de fluorescence 54
3.2 Rôle de l'actine dans la formation des *doigts* 55
3.2.1 Structure du réseau d'actine au niveau des *doigts* 56
3.2.2 Cellules donneuses 57
3.2.2.1 La surexpression de protéines liées à l'actine ne modifie pas les *doigts* 58
3.2.2.2 La surexpression de Rac constitutivement actif fait disparaître précurseurs et *doigts* 59
3.2.2.3 La présence de précurseurs d'actine est nécessaire à la formation des *doigts* 61
3.2.3 Cellules receveuses 62
3.2.3.1 L'inhibition de la contractilité acto-myosine empêche la formation des *doigts* 64
3.2.3.2 L'activation de la contractilité acto-myosine augmente la longueur des *doigts* 65
3.2.3.3 Une force de traction externe permet de remplacer la contractilité acto-myosine 66

3.2.3.4 La tension membranaire n'intervient pas dans la régulation de longueur des *doigts* . . . 67
3.3 Mécanisme d'assemblage . . . 68
3.4 Conclusion . . . 72

4 Jonctions adhérentes : mesure de forces contractiles 75
4.1 Rappel de la modélisation de *doigts* en croissance . . . 75
4.1.1 Périodicité des doigts . . . 75
4.1.2 Longueur des doigts . . . 76
4.1.2.1 Force exercée par les filaments d'actine . . . 76
4.1.2.2 Paramètres d'un tube de membrane . . . 76
4.1.2.3 Tension de membrane . . . 77
4.1.2.4 Longueur du *doigt* . . . 78
4.1.2.5 Dynamique de croissance des *doigts* . . . 78
4.2 Adaptation de la modélisation dans le cas d'une croissance induite par la contractilité acto-myosine . . . 79
4.2.1 Cadre d'application de la modélisation . . . 79
4.2.2 Méthodologie . . . 80
4.2.3 Comparaison des courbes de croissance en cellules vivantes et cellules fixées . . . 81
4.3 Détermination des forces de contractilité acto-myosine . . . 82
4.3.1 Croissance de *doigts* après ajout de nocodazole . . . 82
4.3.2 Détermination de la vitesse de dépolymérisation v_- . . . 83
4.3.3 La taille maximale des *doigts* dépend de la concentration en nocodazole . . . 84
4.3.4 Évaluation de la force contractile . . . 85
4.3.5 Relation force-extension . . . 87
4.4 Conclusion . . . 89

Croissance de contacts focaux 95
A.1 Introduction . . . 95
A.2 Principe des expériences . . . 96
A.2.1 Suivi d'inhomogénéités . . . 97
A.3 Résultats . . . 99
A.3.1 Actine . . . 99
A.3.2 Vinculine . . . 100
A.3.3 Intégrine . . . 101
A.3.4 Fibronectine . . . 102
A.4 Compréhension des résultats et poursuite du projet . . . 103

Nucléation et croissance de cristaux de colloïdes 105
B.1 Introduction et méthodes expérimentales . . . 105
B.1.1 Cristaux de colloïdes à 2 dimensions . . . 105
B.1.2 Agrégation de complexes adhésifs . . . 107
B.2 Résultats . . . 108
B.2.1 Acquisition des données . . . 108
B.2.2 Détection des cristaux . . . 109
B.2.3 Analyse des résultats . . . 109
B.3 Conclusion . . . 112

Liste of Figures

1.1 Contacts cellulaires 7
1.2 Membrane plasmique 9
1.3 Schéma d'un microtubule 11
1.4 Marquage de filaments intermédiaires 12
1.5 Structure de l'actine polymérisée et cinétique de croissance des filaments . 15
1.6 Schéma récapitulatif de la polymérisation d'actine 16
1.7 Microscopie électronique de filopodes et lamellipodes 17
1.8 Diagramme de phase et exposants de croissance d'adhésion entre vésicules 22
1.9 Découverte des contacts focaux 26
1.10 Associations possibles des sous-unités de l'intégrine 27
1.11 Schéma de modélisation des contacts focaux 33
1.12 Les différentes cadhérines et la composition des jonctions adhérentes 36

2.1 Schéma du trajet optique dans le montage en ondes évanescentes 49

3.1 Brisure de symétrie des jonctions adhérentes 53
3.2 Marquage de cortactine sur les jonctions adhérentes 54
3.3 Des précurseurs d'actine sont présents aux bords libres 57
3.4 La surexpression de protéines associées à l'actine désorganise le cytosquelette d'actine 59
3.5 La géométrie de l'actine au bord libre impose la géométrie du contact . . . 60
3.6 La formation des précurseurs d'actine précède l'assemblage de la jonction adhérente 63
3.7 La contractilité de la cellule receveuse est indispensable pour la formation des *doigts* 63
3.8 La force appliquée par la cellule receveuse régule la taille des *doigts* 65
3.9 Représentation de l'assemblage des *doigts* 69

4.1 Insertion d'un monomère d'actine contre la membrane 77
4.2 Équilibre de forces dans le cadre de notre modèle 80
4.3 Croissance de *doigts* après ajout de nocodazole 82
4.4 La longueur à l'équilibre des *doigts* croît avec la concentration de nocodazole 85
4.5 Croissance des *doigts* pour différentes concentrations de nocodazole 86
4.6 Diagramme force-extension des *doigts* 88

A.1 Croissance induite de contacts focaux 96
A.2 Mise en evidence des inhomogénéités des contacts focaux 97
A.3 Principe des kymographes 99
A.4 *Treadmilling* de l'actine dans les contacts focaux 100
A.5 Évolution de la vinculine dans des contacts focaux en croissance 101
A.6 Évolution de l'intégrine dans des contacts focaux en croissance 102
A.7 Évolution de la fibronectine dans des contacts focaux en croissance 103

B.1 Principe de cristallisation des colloïdes en 2D 107
B.2 Séquence de nucléation et croissance de cristallites 110
B.3 Exposant de croissance des cristallites en fonction de la température 111
B.4 Lois de croissance de contacts focaux 113

Préambule

À première vue, le corps humain est un assemblage déjà complexe d'organes aux fonctions variées. Ces organes sont formés de différents tissus organisés qui sont eux-mêmes constitués de cellules dont la taille caractéristique est de l'ordre de la dizaine de micromètres. On trouve ainsi environ 200 types cellulaires différents dans notre organisme et un simple calcul d'ordre de grandeur permet d'évaluer à cent mille milliards le nombre de cellules le constituant. Comment former un assemblage aussi complexe ? La réponse est quelque peu déroutante puisque nous sommes tous issus d'un oeuf fécondé, une cellule unique. Cette cellule possède toute l'information nécessaire dans son génome pour se diviser, pour que les cellules filles continuent à se diviser, à se différencier, à former les premières ébauches de tissus déjà organisés comme un modèle réduit de ce que nous serons à la naissance.

Ce processus de formation de l'embryon nécessite que les cellules puissent apprécier leur environnement extérieur, émettre des signaux, capter ceux des autres cellules et finalement se déplacer suivant un schéma précis dans un espace confiné. Ces déplacements ne sont possibles que si les cellules sont capables de former des contacts avec leur environnement, que ce soit avec d'autres cellules ou avec des complexes protéiques (que nous appellerons « matrice extracellulaire »), et d'exercer des forces pour se mouvoir. Outre leur importance dans la migration, les contacts cellulaires permettent aux cellules de maintenir la cohésion des tissus, de communiquer avec d'autres cellules et de se reconnaître (Alberts *et al.*, 1994).

Un exemple fascinant regroupant tous ces comportements est celui de la réponse inflammatoire et de la diapédèse. Lors d'une infection les cellules endothéliales de la paroi des vaisseaux sanguins expriment des molécules d'adhésion permettant d'arrêter les leucocytes circulant dans le sang. Les leucocytes vont ensuite s'insinuer entre ces cellules endothéliales pour atteindre le foyer de l'infection, reconnaître l'agent infectieux et le phagocyter pour le détruire. Si le premier stade d'arrêt des leucocytes semble être un processus passif dû à la présence de protéines d'adhésion à la surface des cellules endothéliales, la diapédèse fait intervenir une application de forces et une grande déformation du corps cellulaire des

leucocytes, qui est un processus actif, c'est-à-dire associé à une consommation d'énergie chimique.

Les phénomènes de reconnaissance et de mouvement cellulaires au sein des tissus intéressent les biologistes depuis plus d'un demi-siècle. Holtfreter a remarqué en 1944 que des cellules embryonnaires de deux types différents, dissociées puis remélangées, se « triaient » spontanément pour former des tissus homogènes et cohérents (Holtfreter, 1944). L'observation du piégeage d'agrégats d'un type cellulaire à l'intérieur de structures continues formées de l'autre type cellulaire a incité Steinberg à émettre son hypothèse d'adhésion différentielle en 1963 (Steinberg, 1963). Selon cette hypothèse, la ségrégation cellulaire serait la conséquence d'une minimisation de l'énergie de surface entre cellules. Les tissus auraient ainsi une tension de surface provenant des contacts adhésifs entre cellules. Une analogie avec la physique des liquides usuels prédit que les tissus les plus cohésifs seraient enveloppés par les tissus les moins cohésifs.

Le tri cellulaire n'est pas spécifique aux cellules embryonnaires et peut être réalisé avec des cellules provenant d'organismes pluricellulaires simples comme l'hydre. Des cellules d'hydre dissociées et mélangées sont capables de régénérer une hydre entière en une semaine (Holstein *et al.*, 1992). Des études récentes de la ségrégation cellulaire dans des agrégats de cellules d'hydre ont permis d'évaluer une température équivalente de ces agrégats dans le cadre de l'analogie hydrodynamique (Rieu et Sawada, 2002). Des températures 10^8 fois supérieures à la température ambiante ont été trouvées, montrant l'importance de l'activité cellulaire dans le remodelage tissulaire. De même que pour la diapédèse, une simple hypothèse d'adhésion entre cellules ne permet pas d'expliquer le tri cellulaire.

Un candidat de choix pouvant intervenir dans de tels processus actifs mettant en jeu l'adhésion cellulaire est le cytosquelette. Le cytosquelette est un réseau tridimensionnel dense de polymères (microfilaments d'actine, microtubules et filaments intermédiaires) qui va conférer à la cellule sa forme et ses propriétés visco-élastiques (Zhu *et al.*, 2000). De plus, le processus de polymérisation et dépolymérisation des filaments d'actines (appelé « treadmilling ») va entraîner des fluctuations de la membrane cellulaire, et, associés avec des myosines, ces filaments regroupés en fibres vont pouvoir appliquer des forces de traction au niveau des complexes d'adhésion (Riveline *et al.*, 2001).

Un indice supplémentaire de l'implication du cytosquelette dans la formation des contacts cellulaires provient de la simple observation des contacts focaux formés par une cellule

adhérant sur un substrat recouvert de protéines de la matrice extracellulaire. Les patchs d'adhésion sont majoritairement formés sur le pourtour cellulaire et en général allongés suivant une direction radiale. Alors qu'une adhésion passive génère des zones d'adhésion isotropes (Boulbitch *et al.*, 2001), ces adhésions focales présentent une symétrie brisée. Cette brisure de symétrie est causée par le cytosquelette d'actine, dont les fibres d'acto-myosine se terminant au niveau de l'adhésion focale peuvent exercer des forces au niveau du contact adhésif (Riveline *et al.*, 2001). De plus, l'augmentation de la force ressentie par le contact focal entraînera un recrutement de protéines composant le complexe d'adhésion et par conséquent le renforcement de celui-ci.

Le but de cette thèse a été de comparer deux types d'adhésion cellulaires, les contacts focaux entre une cellule et la matrice extracellulaire, et les jonctions adhérentes entre deux cellules, au niveau de leurs propriétés d'assemblage. L'accent a été mis sur la recherche de mécanosenseurs, c'est-à-dire de systèmes permettant à la cellule de sentir des forces et d'y répondre, ainsi que sur le rôle du cytosquelette d'actine dans l'établissement de ces contacts cellulaires.

Le premier chapitre présente brièvement la cellule et ses constituants intervenant dans les contacts cellulaires. Après une description de quelques modèles physiques proposés pour expliquer l'adhésion cellulaire, nous verrons plus en détail la composition et l'assemblage des contacts focaux et des jonctions adhérentes.

Dans un deuxième chapitre, nous présenterons les techniques expérimentales qui ont été nécessaires à ce travail.

La troisième partie sera consacrée à dégager les rôles respectifs de la polymérisation d'actine et de la contractilité acto-myosine et proposera un mécanisme de formation des jonctions adhérentes.

Dans une quatrième partie, nous verrons comment la mesure expérimentale de croissance de jonctions adhérentes de type *doigts* permet la mesure non-invasive des forces de contractilité acto-myosine.

Nous conclurons en rappelant les principaux résultats obtenus durant cette thèse et en validant l'approche que nous avons utilisée à partir de ces résultats.

En annexe sont consignés les résultats obtenus au cours de cette thèse concernant la dynamique interne des contacts focaux en croissance et la nucléation et croissance de cristaux de colloïdes, bien que les travaux ne soient pas achevés.

1

Introduction générale

Cette introduction se veut suffisamment générale pour que tout étudiant de l'école doctorale de physique à laquelle j'appartiens puisse comprendre les idées de base qui ont mené notre réflexion. Nous commencerons donc par présenter brièvement la cellule et ses structures intervenant dans l'adhésion cellulaire. Nous présenterons ensuite quelques modèles physiques d'adhésion entre cellules et leurs vérifications expérimentales. Dans une troisième et une quatrième sections, nous présenterons respectivement les contacts focaux et les jonctions adhérentes, aussi bien d'un point de vue biologique que physique.

1.1 La cellule et l'adhésion cellulaire

1.1.1 Description succincte de la cellule

Tous les êtres vivants connus ont comme unité de base la cellule. Celle-ci peut être directement un être vivant autonome, dit unicellulaire, ou s'associer avec d'autres cellules pour former un organisme plus ou moins complexe qu'on nomme pluricellulaire. Certains organismes comme les amibes de *Dictyostelium* peuvent même vivre sous forme unicellulaire ou pluricellulaire selon les conditions environnementales. À la place de cette distinction, les cellules sont généralement séparées en deux classes basées sur l'évolution : les procaryotes, dépourvus de noyau, et les eucaryotes, possédant un noyau. Les compositions chimiques de ces deux grandes classes de cellule sont assez voisines et de nombreuses voies métaboliques leur sont communes. Cependant, les cellules eucaryotes sont généralement plus grandes que les cellules procaryotes (une taille de l'ordre de la dizaine de micromètre contre une taille de l'ordre du micromètre), possédant un rythme de division plus lent (de l'ordre de la journée contre un rythme de division de l'ordre de l'heure, voire plus rapide pour les procaryotes) et souvent associées en organismes pluricellulaires. Les organismes eucaryotes

pluricellulaires sont composés de nombreux types cellulaires différents organisés pour la plupart en tissus spécialisés aux fonctions variées.

Chaque cellule est délimitée par une membrane plasmique, bicouche de phospholipides séparant l'intérieur de l'extérieur de la cellule. L'intérieur de la cellule se compose de plusieurs compartiments cellulaires que l'on nomme organites. La caractéristique principale des cellules eucaryotes est qu'elles possèdent un noyau séparé du reste de la cellule par une enveloppe nucléaire et contenant l'ADN de la cellule, support de l'information génétique. Ce noyau est entouré du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, intervenant respectivement dans la production et la modification des protéines. Les mitochondries, « centrales énergétiques » de la cellule produisant de l'ATP sont un autre type de compartiment cellulaire. Il en existe d'autres sur lesquels nous ne nous attarderons pas ici. Le reste de la cellule, le cytosol, est une solution concentrée de nombreuses molécules, dont les protéines, aux localisations et aux interactions bien spécifiques. Le cytosquelette, qui confère à la cellule sa forme et sa motilité, est un réseau tridimensionnel de fibres contenu dans le cytosol. Il est constitué de trois types de fibres protéiques : les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules.

1.1.2 L'adhésion cellulaire

Puisque nous allons nous intéresser à l'adhésion cellulaire il est important de décrire ce qu'on entend en employant ce terme. Dans l'organisme, une cellule est au contact d'autres cellules ou de la matrice extracellulaire, composée de glycoprotéines (dont le collagène), de protéoglycanes (Katz *et al.*, 2000) et d'autres composants, qui permet l'adhésion des cellules et la résistance des tissus et des organes. L'adhésion cellulaire se définit tout d'abord comme l'interaction spécifique de couples ligands-récepteurs. Les récepteurs sont les protéines d'adhésion transmembranaires de la cellule adhérente qui reconnaissent des ligands pouvant être soit des protéines d'adhésion d'une cellule voisine, soit des protéines de la matrice extracellulaire. Dans une zone d'adhésion dite « mûre » les protéines d'adhésion s'agrègent pour former une zone d'adhésion et interagissent à l'intérieur de la cellule avec un complexe protéique faisant le lien avec le cytosquelette. Une cellule est ainsi capable de former différentes zones d'adhésion dont les propriétés diffèrent selon les protéines d'adhésion impliquées. On distingue ainsi trois grands groupes d'adhésions cellulaires :

– les jonctions imperméables (ou serrées) forment une barrière très sélective entre les

deux côtés d'un tissu épithélial et sont constituées de protéines appelées occludines et claudines ;

- les jonctions d'ancrage attachent mécaniquement les cellules à leur voisines ou à la matrice extracellulaire et sont principalement établies par des protéines membranaires de la famille des cadhérines et des intégrines ;
- les jonctions communicantes sont formées par des connexines organisées en hexamères et formant des canaux permettant le passage d'ion ou de petites molécules entre les cellules (Alberts *et al.*, 1994).

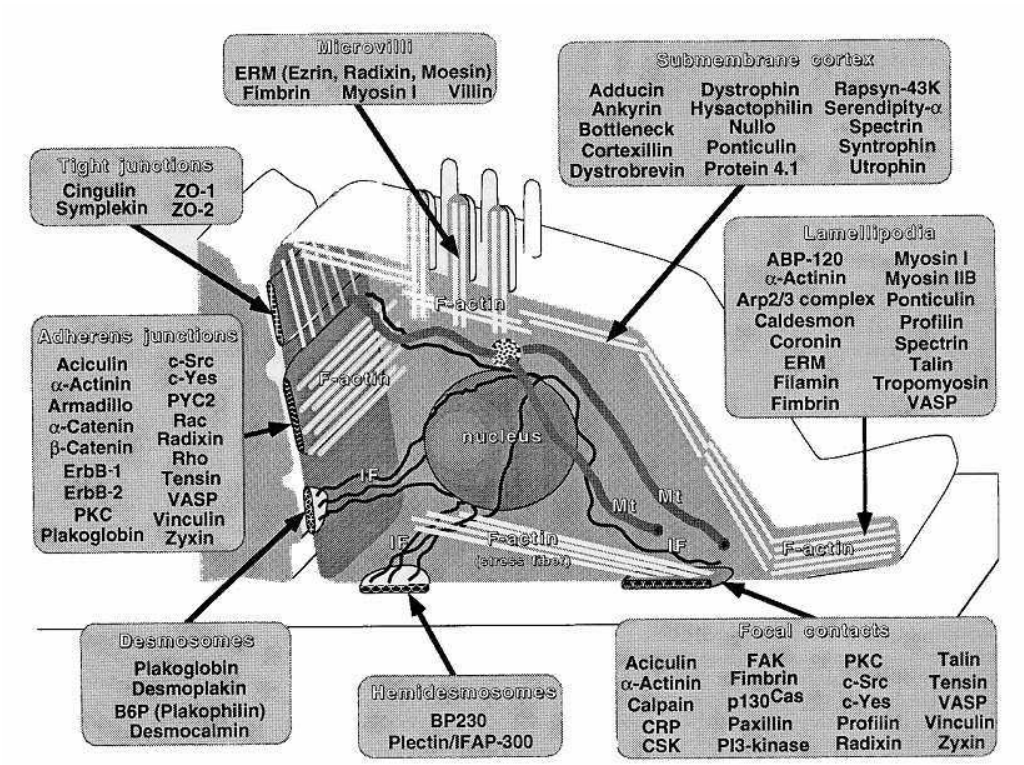


FIG. 1.1: Schéma des différents contacts cellulaires (source : (Bershadsky et Geiger, 1999)).

Les adhésions cellulaires faisant intervenir le cytosquelette sont illustrées sur la figure 1.1, ainsi que d'autres processus cellulaires faisant intervenir une interaction membrane-cytosquelette. Dans la suite, nous nous intéresserons uniquement aux jonctions d'ancrage, et, à l'intérieur de ce groupe de jonctions, à celles liées au cytosquelette d'actine, c'est-à-dire les *jonctions adhérentes* et les *contacts focaux*. Les desmosomes et hémidesmosomes font aussi partie des jonctions d'ancrage mais interagissent avec les filaments intermédiaires et ne seront pas abordés ici. Les jonctions adhérentes forment des adhésions entre deux cellules voisines et font intervenir des protéines membranaires de la grande famille des

cadhérines[2]. Les contacts focaux lient les cellules et la matrice extracellulaire par l'intermédiaire de protéines membranaires de la famille des intégrines reconnaissant spécifiquement une ou plusieurs protéines de la matrice.

La description des aspects biochimiques et de régulation de ces deux types de jonctions sera faite un peu plus loin dans cette introduction. Nous allons pour le moment nous concentrer sur les composants communs à ces jonctions, c'est-à-dire la membrane plasmique et le cytosquelette.

1.1.3 La membrane plasmique

La membrane plasmique est un double feuillet de phospholipides de quelques nanomètres d'épaisseur organisée de telle façon que les têtes polaires des lipides pointent vers l'extérieur et que leurs queues hydrophobes soient confinées à l'intérieur de la membrane. Cette organisation permet de créer une barrière de quelques nanomètres d'épaisseur, infranchissable pour la plupart des molécules polaires et/ou chargées. La membrane plasmique d'une cellule de mammifère contient de l'ordre de 10^9 molécules, consistant en une centaine environ de lipides distincts chimiquement, ainsi que des protéines transmembranaires ou adsorbées à la surface de la membrane ((Mukherjee et Maxfield, 2004), voir figure 1.2). Les propriétés de la membrane viennent donc des effets collectifs d'une multitude d'interactions faibles et non-covalentes. Les lipides sont de plus souvent sous forme d'une phase liquide désordonnée (l_d), leur permettant de diffuser librement et de se mélanger, même si ce régime de diffusion est un peu plus complexe qu'un simple mouvement brownien (Singer et Nicolson, 1972).

Il est déjà important de noter que la membrane plasmique n'est pas une frontière imperméable et qu'elle est le siège de nombreux processus de communication entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Les phénomènes d'exocytose et d'endocytose permettent respectivement l'expulsion de molécules à l'extérieur de la cellule et le transport de particules et de molécules vers l'intérieur de la cellule. On trouve également de nombreuses protéines ou complexes protéiques transmembranaires intervenant dans la communication cellulaire. Les récepteurs membranaires détectent spécifiquement des molécules de signalisation externes et déclenchent une cascade de réactions à l'intérieur de la cellule. Les canaux membranaires permettent le passage de petites molécules (eau, protons, ions cal-

[2]Les cadhérines tirent leur nom de leur dépendance aux ions Ca^{2+}(en anglais : « Ca^{2+}-dependent »).

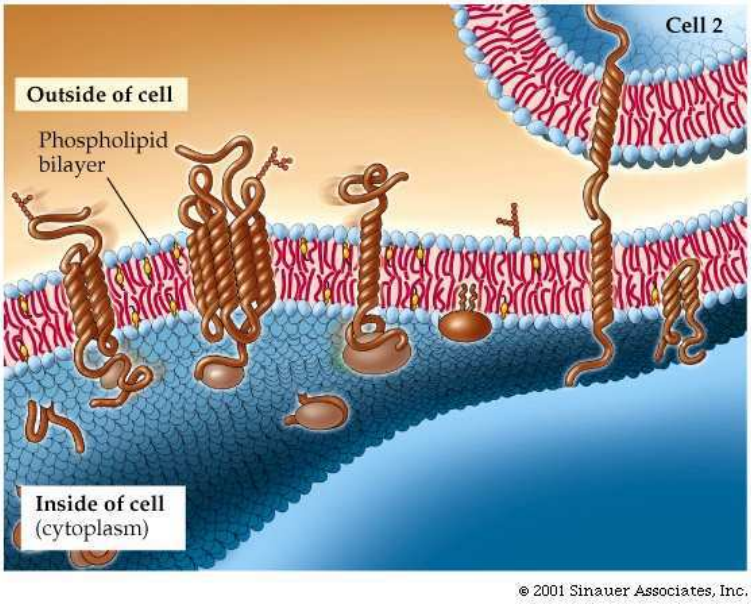


FIG. 1.2: Vue d'artiste de la membrane plasmique et des protéines transmembranaires ou adsorbées sur la membrane (source : `http://www.columbia.edu/cu/biology/courses/c2005/purves6/figure05-01.jpg`).

cium, potassium, sodium,...) et régulent notamment le potentiel transmembranaire dû à la différence de concentrations des espèces chargées de part et d'autre de la membrane plasmique.

Même si une agrégation de protéines d'adhésion est éventuellement permise par la présence controversée de *rafts lipidiques* (Nusrat *et al.*, 2000; Seveau *et al.*, 2004), les propriétés élastiques de la membrane plasmique interviennent dans la possibilité des cellules de créer des zones d'adhésion. En effet, un contact adhésif entre deux cellules ne peut croître que si :

- les membranes des deux cellules viennent en contact ;
- les membranes peuvent rester suffisamment proches sur une surface suffisamment importante.

La membrane plasmique doit donc être suffisamment « souple » pour se déformer, tout en ne permettant pas des fluctuations trop importantes. L'observation comparée d'une cellule et d'une vésicule géante permet de se rendre compte que les déformations de la membrane sont très différentes dans ces deux systèmes. Dans le cas d'une vésicule, on observera des ondulations sur tout le contour dues aux fluctuations thermiques, alors que la cellule émet des protrusions localisées de deux types :

- des lamellipodes, étendues membranaires de quelques centaines de nanomètres d'épaisseur pour des largeurs et longueurs de quelques micromètres ;
- des filopodes, tubes rigides d'environ 200 nanomètres de diamètre et pouvant atteindre plusieurs micromètres de long.

Ces différences proviennent de la présence et de l'activité du cytosquelette d'actine au voisinage de la membrane. La polymérisation dynamique de l'actine (que nous verrons plus en détail à la section 1.1.4) est la cause des protrusions émises par la cellule alors que l'absence d'ondulations de grandes amplitudes comme observées dans une vésicule modèle est due à la présence d'un réseau fortement réticulé et sous-tendant la membrane plasmique : le cortex. D'autres types de déformations membranaires dans la cellule trouvent leur origine dans l'assemblage local de lipides de géométrie particulière ou dans l'insertion ou l'adsorption de protéines sur la membrane. Ces déformations ont généralement lieu au niveau de la membrane des organites cellulaires (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi,...) et ont pour but de courber fortement la membrane afin de faciliter la formation des vésicules de transport (pour une revue voir (McMahon et Gallop, 2005)).

1.1.4 Le cytosquelette

Comme on l'a évoqué au 1.1.1, le cytosquelette est responsable des propriétés mécaniques de la cellule. C'est un réseau tridimensionnel de fibres protéiques tissées à travers la cellule que l'on peut subdiviser en trois organisations distinctes en fonction des dimensions (et de la nature protéique) des différentes fibres.

1.1.4.1 *Les microtubules*

Les microtubules sont composés de tubuline, une protéine composée de deux sous-unités α et β s'associant en dimères. Les dimères de tubuline polymérisent en fixant du GTP[3] pour former un tube cylindrique creux de 24 nm de diamètre apparaissant comme étant formé de 13 protofilaments de tubuline alternant les sous-unités α et β (voir Figure 1.3). Cette alternance de sous-unités va définir la polarité du microtubule. L'extrémité présentant les sous-unités β polymérise le plus vite et est appelée extrémité + alors que l'extrémité présentant les sous-unités α polymérise lentement et est appelée extrémité -

[3]Guanosine Tri-Phosphate

, ou extrémité *dynamique*. La polymérisation des microtubules est très particulière. La polymérisation à l'extrémité + est fortement dépendante des concentrations de tubuline libre et de GTP et, dans des conditions chimiques constantes, passe successivement (par un processus stochastique) d'un état de polymérisation à un état de dépolymérisation rapide (« évènement catastrophe »). Ce phénomène est connu sous le nom d'instabilité dynamique (Mitchison et Kirschner, 1984). Un certain nombre de protéines appelées MAP[4] régulent fortement le régime d'instabilité dynamique (Amos et Schlieper, 2005).

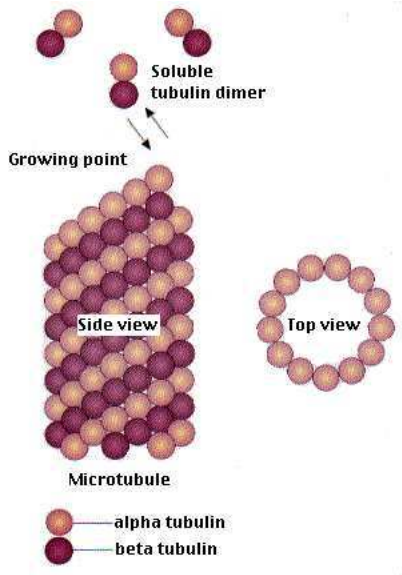


Fig. 1.3: Schéma de la structure et de la polymérisation d'un microtubule (source : `http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/M/Microtubule.gif`).

Dans la cellule, les microtubules croissent généralement à partir d'un complexe protéique appelé *centrosome* (définissant la polarité des microtubules) situé près du noyau et sont organisés en aster. L'extrémité - des microtubules est généralement associée au centrosome et ne polymérise pas (ni ne dépolymérise). Les microtubules interviennent notamment dans le trafic cellulaire. Ils servent de rails à des moteurs moléculaires (les kinésines et les dynéines) qui transportent les vésicules provenant de l'appareil de Golgi ou d'autres organites à des vitesses de l'ordre de quelques centaines de nm/s (Vale *et al.*, 1985). Les microtubules interviennent également au moment de la mitose. Deux centrosomes migrent aux pôles opposés de ce qui constituera les deux cellules filles et les microtubules croissent à partir de ces extrémités pour former le fuseau mitotique qui organise les chromosomes au centre de la cellule avant de séparer le matériel génétique de façon égale entre les deux cellules filles grâce aux moteurs moléculaires associés aux microtubules (Sharp *et al.*, 2000).

[4]Microtubule Associated Proteins

Mis à part leur activité de transport directionnel de protéines pouvant entrer en jeu dans la formation de zones d'adhésion, les microtubules sont impliqués indirectement dans la régulation de la contractilité cellulaire. En effet, la dépolymérisation des microtubules conduit à l'activation de la voie de signalisation Rho et ainsi à la formation de fibres de tension d'actine (Bershadsky *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1998), que nous appellerons fibres *de stress* dans la suite de ce document. Nous reviendrons sur cette régulation de la contractilité dans la section 1.1.5.

1.1.4.2 *Les filaments intermédiaires*

Les filaments intermédiaires sont composés de protéines d'une famille comptant plus de 50 membres qui s'assemblent, individuellement ou par groupes de deux ou trois, pour former des filaments d'environ 10 nanomètres de diamètre. Toutes ces protéines ont un domaine central allongé (hélice α) très conservé alors que le domaines N- et C-terminaux sont très variables. À partir des homologies de séquence, on distingue 6 groupes de protéines comme la kératine, la vimentine, la lamine ou encore la nestine. Chaque filament intermédiaire est généralement composé de quatre sous-filaments formés à partir de 2 protofilaments comportant chacun deux dimères assemblés antiparallèlement (Dahlstrand *et al.*, 1992). Ce type d'association implique que le filament intermédiaire n'est pas polarisé, c'est-à-dire que ces deux extrémités sont équivalentes.

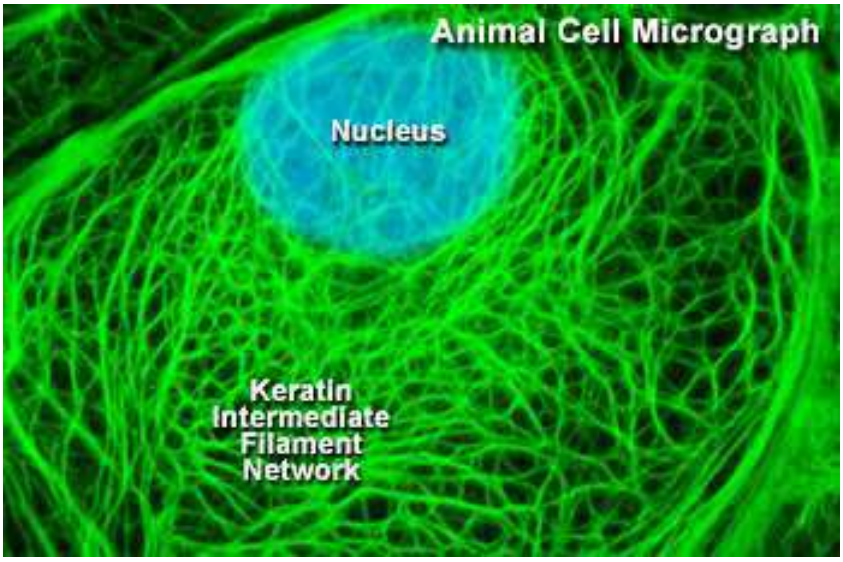


Fig. 1.4: Marquage de la kératine (vert) présente dans les filaments intermédiaires. Le noyau de la cellule est représenté en bleu. Source : `http://micro.magnet.fsu.edu/cells/intermediatefilaments/intermediatefilaments.html`

Une des fonctions principales des filaments intermédiaires est de fournir aux cellules et aux tissus leur résistance mécanique (Beil *et al.*, 2003). On trouve souvent un réseau de kératine entourant le noyau et s'étendant jusqu'à la membrane plasmique (voir Figure 1.4). On trouve aussi un réseau de lamine soutenant la membrane nucléaire (Dahl *et al.*, 2004). Les filaments intermédiaires peuvent interagir fortement avec des zones d'adhésion cellulaire, les desmosomes et hémidesmosomes, reliant respectivement deux cellules ensemble et une cellule à la matrice extracellulaire. Cette interaction permet de répartir les contraintes mécaniques appliquées à une cellule sur les cellules voisines. Les réseaux de filaments intermédiaires sont assez peu dynamiques, excepté au moment de la division cellulaire où ces réseaux se réorganisent fortement. Par exemple le réseau de lamine est complètement démantelé pendant la mitose et repolymérise dès que les noyaux des cellules-filles se reforment (Peter *et al.*, 1990).

1.1.4.3 *Les microfilaments d'actine*

L'actine est une des protéines les mieux conservées de l'évolution. C'est également la protéine intracellulaire la plus abondante dans la plupart des cellules eucaryotes. On la trouve soit sous une forme monomérique globulaire (actine G) d'un diamètre moyen de 7 nanomètres, soit sous forme d'un filament polymérisé (actine F) hélicoïdalement (voir Figure 1.5 A). L'hélice formée par le filament polymérisé possède un pas d'environ 36 nanomètres et, vue de profil, son diamètre oscille entre 7 et 9 nanomètres. De même que les microtubules, les filaments d'actine sont eux aussi polarisés et leur nomenclature vient des premières images de microscopie électronique de filaments d'actine « décorés » par des têtes de myosine (Huxley, 1963). On parle ainsi d'extrémité barbée pour l'extrémité possédant la plus grande affinité avec les monomères d'actine, et d'extrémité pointue pour l'autre. Lors de la polymérisation de l'actine dans une cellule, des monomères liés à l'ATP s'ajoutent à l'extrémité barbée du filament. L'ATP s'hydrolyse lentement le long du filament d'actine et des monomères liés à l'ADP se désassemblent du filament à l'extrémité pointue. En régime stationnaire, le filament d'actine polymérise aussi rapidement au bout barbé qu'il dépolymérise au bout pointu, entraînant en renouvellement des monomères à longueur de filament fixée. Dans le référentiel d'un monomère du filament, le filament se déplace avec un mouvement rappelant celui d'une chenille de char, on parle ainsi de *treadmilling*.

Straub fut le premier à émettre l'hypothèse d'une polymérisation d'actine en 1943

(Straub, 1943), et ce n'est que 4 ans plus tard des clichés de microscopie électronique confirmèrent ses travaux (Jakus et Hall, 1947). Malgré plus de 60 ans de recherche sur l'actine, certains aspects de sa polymérisation dans la cellule ne sont toujours pas élucidés totalement, en particulier le mécanisme d'action des protéines qui s'associent avec le bout barbé pour « aider » la polymérisation. On connaît cependant très bien ses propriétés de polymérisation *in vitro.* En présence, de $MgCl_2$, de KCl et d'ATP, l'actine est capable de polymériser *in vitro* pour former un réseau enchevêtré de filaments dont les constantes de réaction ont été déterminées (Pollard, 1986). À partir de ces constantes, on définit des concentrations critiques d'actine G permettant la polymérisation aux bouts pointus et barbés. En dessous de la concentration critique, une extrémité aura tendance à dépolymériser, alors qu'au-dessus de cette concentration, des monomères pourront s'ajouter. *In vitro*, ces concentrations sont de 0.1μM et de 0.8μM respectivement pour le bout barbé et le bout pointu du filament d'actine. Cependant, les vitesses de polymérisation obtenues *in vitro* à l'aide d'un tel milieu de motilité sont beaucoup plus faibles que les vitesses observées dans les cellules (quelques dizaines de nanomètres par seconde *in vitro* contre des vitesses pouvant atteindre plusieurs micromètres par seconde dans la cellule ; (Wegner, 1976)). Cela s'explique par la présence dans la cellule de nombreuses protéines associées à l'actine et intervenant dans sa polymérisation.

Dans des conditions physiologiques, la quantité totale d'actine (G et F) est constante et le « treadmilling » de l'actine atteint un équilibre, c'est-à-dire que la vitesse de polymérisation au bout barbé d'un filament d'actine (dépendant linéairement de la concentration en monomères) compense exactement dépolymérisation du filament d'actine au bout pointu (indépendante de la concentration en monomères). *In vitro*, la concentration d'actine monomérique à l'équilibre est faible et la vitesse de polymérisation est donc faible également. Au contraire, dans la cellule, diverses protéines interviennent dans le processus de polymérisation de l'actine. La profiline, par exemple, en se liant aux monomères d'actine complexés à l'ATP, promeut l'association des monomères au bout barbé (et empêche leur association au bout pointu). L'effet le plus important pour augmenter la vitesse de polymérisation au bout barbu est d'augmenter la concentration d'actine monomérique à l'équilibre. Pour cela, il faut induire une dépolymérisation plus rapide des filaments au bout pointu. Plusieurs protéines ont des effets provoquant cette dépolymérisation (voir Figure 1.5 B ;(Pantaloni *et al.*, 2001)) :

– l'ADF/cofiline se lie au filament d'actine polymérisé et augmente le taux de disso-

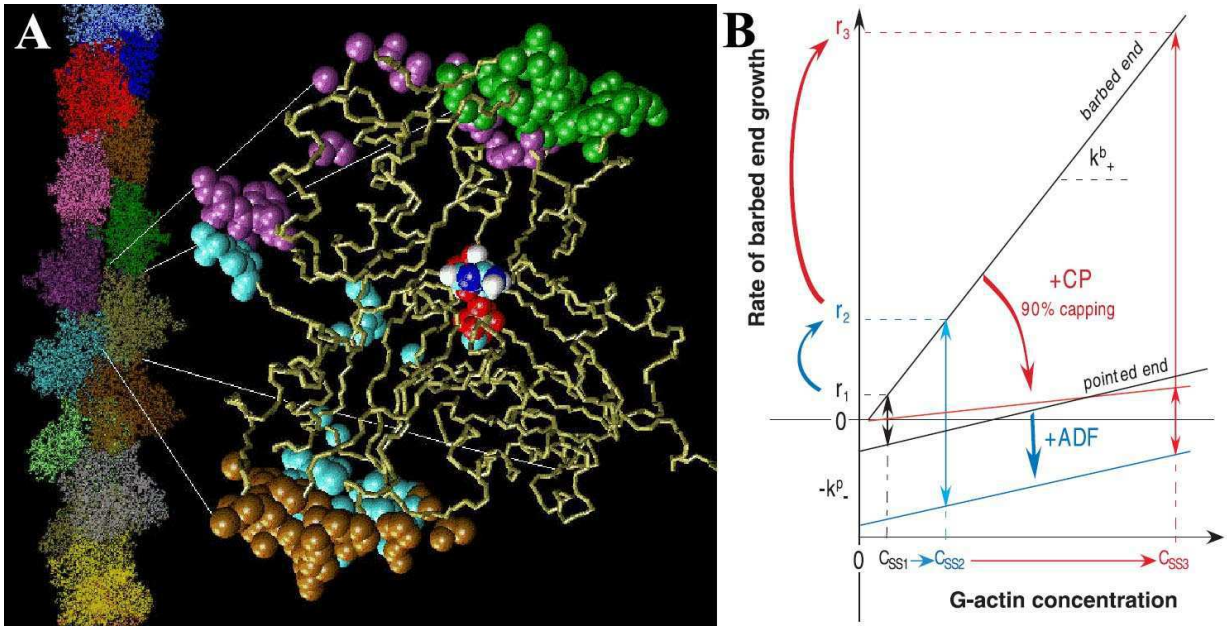


Fig. 1.5: **(A)** Structure tri-dimensionnelle d'un monomère d'actine et arrangement des monomères dans un filament (source : `http://www.ks.uiuc.edu/Research/cell_motility/actin/lorenz.gif`). **(B)** Cinétique de croissance du bout barbé des filaments d'actine en fonction de la concentration d'actine et de la présence d'ADF ou de protéines cappantes. L'état stationnaire se caractérise par une vitesse de polymérisation au bout barbé égale à la vitesse de dépolymérisation au bout pointu, ce qui définit la concentration d'actine monomérique. (source : (Pantaloni *et al.*, 2001)).

ciation des monomères au bout pointu ;

- les « capping proteins » se lient au bout barbé du filament d'actine, empêchant sa polymérisation. Les filaments à la polymérisation ainsi bloquée ne peuvent plus que dépolymériser et les filaments dont l'extrémité barbée est libre polymérisent plus vite.

Un autre moyen d'augmenter la vitesse de polymérisation d'une assemblée de filaments est d'augmenter le nombre de bouts polymérisant. Deux familles de protéines permettent de créer de nouveaux filaments d'actine. D'une part, le complexe protéique Arp2/3 se fixe sur le côté d'un filament d'actine polymérisé et initie la croissance d'une branche à 70° du filament initial en mimant le bout pointu d'un filament (Pantaloni *et al.*, 2001). Ce complexe est hautement régulé par des protéines de type WAVE ou WASP, elles-mêmes étant la cible de nombreuses voies de signalisation (Stradal et Scita, 2006). D'autre part, les protéines de la famille des formines sont capables de nucléer de nouveaux filaments d'actine (Pruyne *et al.*, 2002) tout en restant associée avec le bout barbé en élongation (Romero *et al.*, 2004). Cela permet d'empêcher la fixation de protéines de cap, tout en

facilitant l'addition de monomères d'actine liés à la profiline.

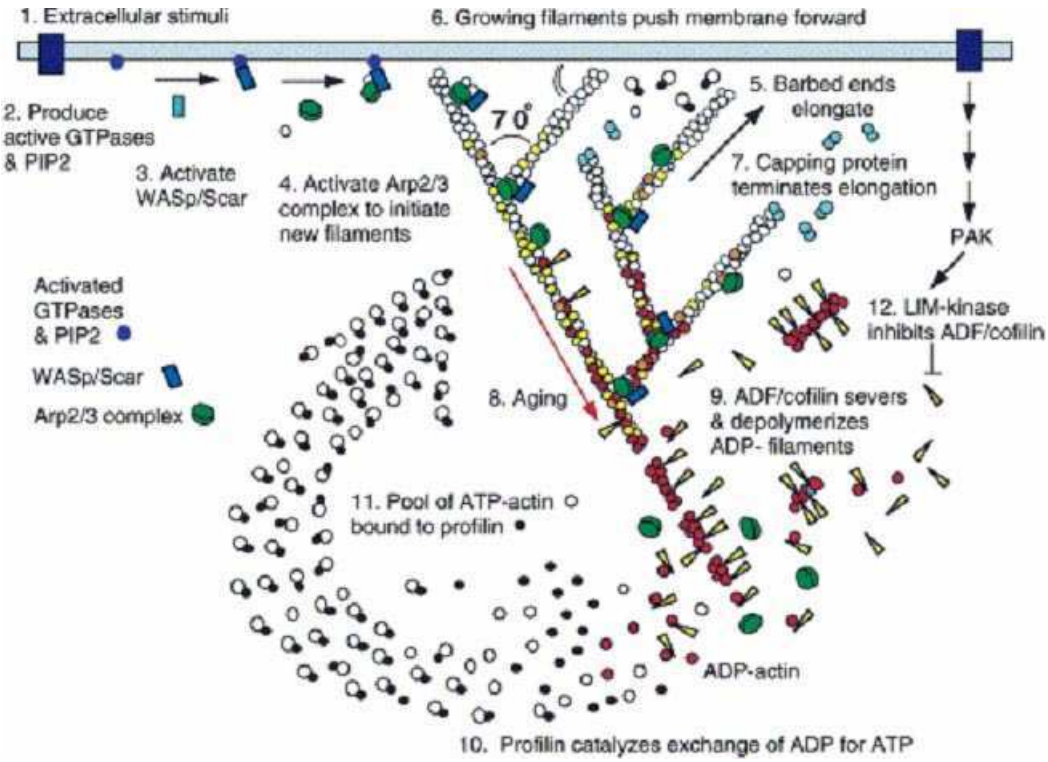


Fig. 1.6: Schéma décrivant la polymérisation du réseau d'actine au voisinage de la membrane cellulaire (source : (Pollard et Borisy, 2003))

Pour résumer, la polymérisation d'actine (résumée dans la figure 1.6) dans la cellule nécessite :

- de l'actine G, de l'ATP, de l'ADF/cofiline et des protéines de cap qui maintiennent une concentration élevée d'actine G ;
- des protéines nucléatrices de filaments et leurs activateurs ;
- d'autres protéines comme la profiline ne sont pas nécessaires mais peuvent améliorer la vitesse de polymérisation.

Le détournement de cette machinerie permet d'ailleurs à la bactérie pathogène *Listeria* de se propulser et de transpercer la membrane de sa cellule-hôte pour infecter une cellule voisine (Theriot *et al.*, 1992). Cette hypothèse a pu être confirmée *in vitro* en utilisant des billes recouvertes de protéines nucléatrices d'actine (ActA dans le cas de *Listeria*) placées dans un milieu de motilité reconstitué à partir des protéines résumées ci-dessus (Loisel *et al.*, 1999). Cependant, plusieurs modèles expliquant l'origine physique de l'application de forces et de la motilité de *Listeria* s'affrontent encore (pour une revue voir (Mogilner,

2006)).

La polymérisation dynamique d'actine joue plusieurs rôles importants dans l'activité cellulaire. Tout d'abord, en étant capable d'appliquer des forces, elle est à l'origine de la formation de structures en croissance déformant la membrane plasmique : les lamellipodes et les filopodes. Pour compléter la description succincte de la section 1.1.3, il faut ajouter que les filopodes sont formés de quelques filaments d'actine (une vingtaine) généralement liés entre eux par des protéines de pontage comme la fascine et polymérisant à l'extrémité du filopode (Svitkina *et al.*, 2003). Les lamellipodes, quant à eux, sont constitués d'un réseau branché de filaments d'actine eux aussi polymérisant contre la membrane (voir figure 1.7). Le complexe Arp2/3 est responsable du branchement des filaments (Svitkina et Borisy, 1999).

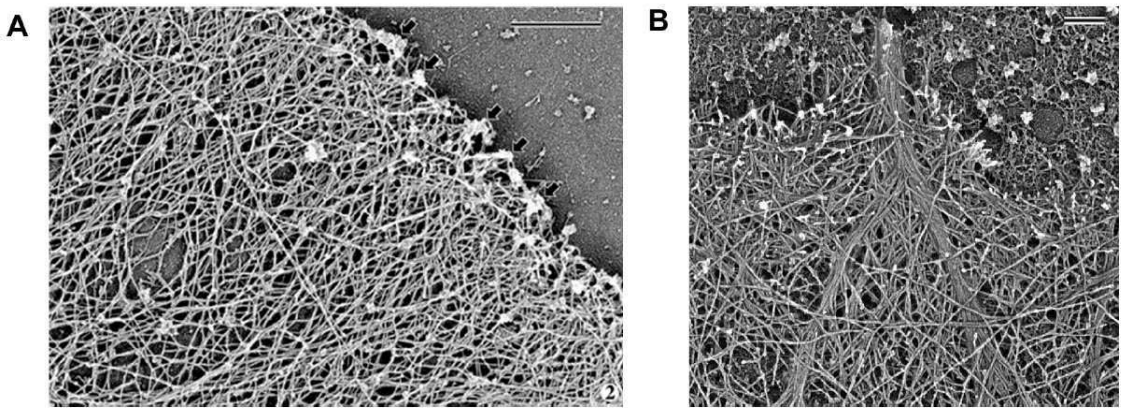


Fig. 1.7: Images de microscopie électronique sur des répliques de cytosquelette d'actine au niveau d'un lamellipode (A) et d'un filopode (B). Les barres correspondent à 500 nm (A) et 200 nm (B). Sources : (Svitkina *et al.*, 1995; Svitkina *et al.*, 2003).

Un autre rôle important de l'actine dans la cellule provient de sa capacité à former des structures de géométrie bien définie dans la cellule. On a déjà vu que les filaments d'actine sont capables de s'associer en réseaux réticulés. Ces réseaux existent soit en volume dans la cellule, soit en une couche mince bordant la membrane plasmique, qu'on appelle cortex, et qui lui confère une bonne partie de ses propriétés mécaniques. La présence de ce cortex sous la membrane va notamment augmenter son module de courbure d'un facteur 10 (Simson *et al.*, 1998). Les filaments d'actine sont également capables de se complexer avec des moteurs moléculaires appelés myosines. En présence de myosine II, les filaments s'assemblent parallèlement pour former des faisceaux denses et contractiles. Leur principal intérêt est leur capacité à pouvoir appliquer des forces au niveau des jonctions d'ancrage type jonctions adhérentes et contacts focaux auxquelles ils sont liés (Sastry et Burridge,

2000).

1.1.5 Les GTPases de la famille Rho

Les petites GTPases de la famille Rho sont des régulateurs essentiels de la polymérisation d'actine mais influencent également la polarité cellulaire, la dynamique des microtubules, l'expression de gènes, le transport directionnel intracellulaire et de nombreux processus enzymatiques (Etienne-Manneville et Hall, 2002). Ces protéines cyclent entre un état activé lié au GTP[5] et un état inactif lié au GDP[6], et reçoivent pour cela l'appellation *d'interrupteurs moléculaires*. L'activation des protéines Rho se fait par l'association avec des membres de la famille Dbl qui sont des facteurs d'échange des nucléotides guanine (GEF[7]). Les GEFs catalysent le relargage de GDP, permettant ainsi l'association spontanée du GTP et l'activation de la GTPase. L'inactivation de la protéine Rho passe par l'hydrolyse du GTP lié en GDP (Van Aelst et D'Souza-Schorey, 1997). L'activité d'hydrolyse du GTP des protéines Rho est accélérée en présence de certaines protéines, les GAPs[8], qui sont donc des inhibiteurs des protéines Rho.

CDC42, Rac1 et RhoA sont les membres de la famille Rho les mieux caractérisés et jouent un rôle primordial dans la structuration du réseau d'actine. Rac1 et CDC42 stimulent la formation respectivement de lamellipodes et de filopodes (Ridley *et al.*, 1992; Nobes et Hall, 1995). L'activation de RhoA permet, entre autres, la formation de faisceaux contractiles d'actine et de myosine dont font partie les fibres *de stress* (Ridley et Hall, 1992). Les localisations des protrusions sous le contrôle de Rac1 et CDC42 et des fibres de stress contrôlées par Rho1 sont généralement exclusives (DeMali et Burridge, 2003).

1.2 Modèles physiques généraux de l'adhésion cellulaire

D'un point de vue physique, on peut considérer au premier abord qu'une adhésion cellulaire est constituée de protéines d'adhésion diffusant dans une membrane lipidique et reconnaissant des ligands fixés sur une surface ou diffusant, eux aussi, dans une membrane

[5] Guanine-Tri-Phosphate
[6] Guanine-Di-Phosphate
[7] Guanine nucleotide Exchange Factor
[8] GTPases-Activating Proteins

lipidique. Deux membranes nues ne vont généralement pas adhérer naturellement. Bien qu'il existe des forces attractives de courte portée type Van der Waals, deux vésicules formées chacune d'une membrane lipidique fermée ne vont pas adhérer naturellement à cause des ondulations de membrane d'origine thermique qui sont à longue portée (voir (Israelachvili, 1985; Helfrich, 1973)). De plus, les cellules présentent généralement à leur surface des sucres liés à la membrane (glycocalix) induisant un effet répulsif de brosse entropique également à longue portée (Capo *et al.*, 1982). Le moteur de croissance d'adhésions entre deux membranes est le gain d'énergie apporté par les interactions entre molécules d'adhésion complémentaires de ces deux membranes (5 à 20kT, (Edelman, 1983)). Cette gamme d'énergie d'adhésion est compatible avec des conditions physiologiques : le gain d'énergie d'adhésion doit être suffisant pour vaincre les effets d'ondulation thermique, tout en restant suffisamment faible afin de permettre aux cellules de désassembler leurs contacts adhésifs (indispensable dans le cas de cellules en migration).

1.2.1 Adhésion entre deux cellules

1.2.1.1 *Le modèle de Bell-Dembo-Bongrand*

Bell a initié les travaux sur la compréhension de l'adhésion cellulaire en 1978 (Bell, 1978). Son modèle est basé sur des hypothèses simples tirés pour la plupart d'observations expérimentales. Avant de le présenter, il faut noter qu'une zone d'adhésion dont l'aire est typiquement 1 μm^2 contient de l'ordre de 10^4 molécules d'adhésion. Ainsi, d'une part, le gain d'énergie dû à l'interaction des molécules d'adhésion est important, et d'autre part, la description physique d'une adhésion cellulaire pourra utiliser les outils de la physique statistique. L'effet coopératif d'un grand nombre de liens adhésifs faibles conduit à une adhésion forte.

Dans le modèle de Bell, l'adhésion cellulaire est décrite comme la compétition entre la répulsion due au glycocalix comprimé entre les membranes des deux cellules et les interactions attractives spécifiques du type ligand/récepteur entre molécules d'adhésion. La présence du glycocalix impose une distance intermembranaire importante (de 50 à 100 nanomètres), rendant négligeable toute interaction non-spécifique de type Van der Waals ou même électrostatique étant donnée la faible longueur de Debye (de l'ordre du nm) dans un environnement physiologique (très salin). Les molécules d'adhésion sont supposées

diffuser librement dans la membrane et réaliser un équilibre chimique entre un état où le couple ligand/récepteur est libre, et un état où les deux molécules sont liées. Cette interaction spécifique permet de réguler finement le processus adhésif.

À partir de la donnée initiale du nombre de molécules d'adhésion et de la surface de chaque cellule, des potentiels chimiques des couples ligand/récepteur libres et liés, ainsi que de la répulsion surfacique due au glycocalix, le calcul de la différence d'énergie libre entre cellules éloignées ou en contact permet de déterminer si les cellules adhérent (Bell *et al.*, 1984) ainsi que la forme des cellules adhérentes en utilisant la théorie élastique des membranes (Bruinsma *et al.*, 1994).

1.2.1.2 *Améliorations du modèle*

Dans le modèle de Bell, les molécules d'adhésion sont supposées réparties de façon homogène sur la surface de contact entre les cellules et ce modèle n'explique pas la localisation des adhésions cellulaires observées. De fait, les molécules adhésives sont supposées diffuser librement sans interaction directe entre elles. Cette hypothèse est raisonnable compte tenu de la densité de molécules adhésives dans le contact. Pour une zone d'adhésion de 1 μm^2 contenant 10^4 molécules, on trouve une distance moyenne entre molécules de l'ordre de 10 nm. Une explication possible de l'agrégation observée des protéines d'adhésion serait l'existence d'interactions *cis* indirectes entre molécules d'adhésion appartenant à la même cellule. Les propriétés physiques de la membrane peuvent alors expliquer ce phénomène (Braun *et al.*, 1984). Deux hypothèses sont confrontées dans le modèle de Braun. La première propose que les protéines transmembranaires d'adhésion perturbent suffisamment les lipides environnants pour que ces protéines se regroupent, minimisant ainsi la perturbation de la structure membranaire (Huang, 1986; Dan *et al.*, 1993). Des expériences sur des vésicules géantes ont montré la possibilité d'agrégation de particules liées chimiquement à la membrane et la déformant fortement (Koltover *et al.*, 1999). La seconde prend davantage en compte l'énergie de répulsion due au glycocalix : il s'agit alors de minimiser la surface sur laquelle la répulsion entropique entre les glycocalix des deux cellules est forte (zones d'adhésion dans lesquelles la distance intermembranaire est faible) ainsi que les zones de forte courbure de la membrane, le résultat étant que les molécules d'adhésion vont également être confinées dans des zones adhésives discrètes (Bruinsma *et al.*, 1994; Menes et Safran, 1997).

La prise en compte des propriétés élastiques de membrane permet alors d'expliquer les inhomogénéités de répartition des molécules d'adhésion. Il faut rajouter un terme dans le modèle de Bell dont le Hamiltonien s'écrit alors comme la somme de trois termes :

$$H = H_{L/R} + H_{rep} + H_{el}$$

où $H_{L/R}$ représente le Hamiltonien d'interaction ligand/récepteur, H_{rep} la contribution de la répulsion entropique due au glycocalix et H_{el} l'énergie de courbure élastique de la membrane (Zuckerman et Bruinsma, 1998). Nous ne détaillerons ici que ce dernier terme que nous serons amenés à retrouver au chapitre 4.1.2. On notera juste que le Hamiltonien d'interaction ligand/récepteur comporte trois termes : l'énergie de liaison gagnée par la formation de couples ligand/récepteur, une énergie de répulsion de sphères dures entre molécules voisines et enfin, l'énergie de courbure supplémentaire induite par la contrainte de distance permettant la formation d'un couple ligand/récepteur.

Bien que les membranes soient composées d'un très grand nombre de molécules, il est possible de les décrire à partir de quelques paramètres seulement (Safran, 1994). Dans le cas d'une vésicule, le Hamiltonien de la membrane s'écrit comme la somme de trois termes : l'énergie de courbure de la membrane, l'énergie de tension superficielle de la vésicule et l'énergie de pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule. On trouve ainsi :

$$H_{el} = \frac{\kappa}{2} \int\int_{surface} \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)^2 + \gamma A - \Pi V$$

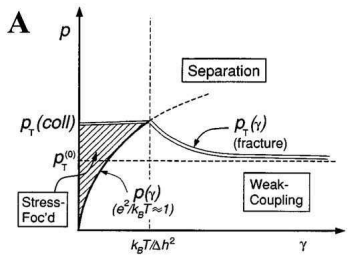
où κ représente le module de courbure de la membrane plasmique, R_1et R_2 sont les rayons de courbure en un point de la membrane, γ est la tension de surface de la membrane et A sa surface totale, enfin, V représente le volume de la vésicule et Π la différence de pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de cette vésicule.

La minimisation du Hamiltonien total a conduit Zuckerman *et al.* (Zuckerman et Bruinsma, 1998) à tracer un diagramme de phase en fonction de la tension de membrane et de la pression due au glycocalix, permettant de distinguer plusieurs régimes d'adhésion : un régime non-adhésif quand la pression du glycocalix est forte, un régime d'adhésion faible pour des petites valeurs de pression du glycocalix et un régime d'adhésif fort dans lequel tous les couples ligands-récepteurs formés ont tendance à se concentrer en un point pour

des faibles tension de membrane et pression du glycocalix. Ce phénomène de concentration possède une signature typique de décomposition spinodale (voir Figure 1.8 A).

D'autres modèles décrivant l'adhésion existent. On peut citer les travaux de Weikl dans lesquels la surface de contacts entre les deux membranes est discrétisée sur un réseau et décrite en termes de distance entre membranes et de densité de protéines d'adhésion. L'écriture d'un Hamiltonien grand canonique, sommant les contributions élastiques des membranes, leur répulsion et l'énergie d'interaction des protéines entre les deux membranes et au sein d'une même membrane, permet de déduire une séparation de phases entre une phase riche en liens adhésifs et une zone pauvre en ces liens, ainsi que l'existence d'une tension de ligne associée à cette séparation de phase (Weikl *et al.*, 2002).

Cependant, peu d'études concernent la dynamique de formation des zones adhésives. De Gennes a proposé une liste de scénarios dans le cas où une vésicule recouverte de récepteurs d'adhésion vient en contact avec une surface rigide recouverte de ligands (De Gennes *et al.*, 2003). À partir de quelques hypothèses simples (tension de membrane constante pendant l'étalement, diffusion libre des récepteurs dans la membrane hors zone d'adhésion, existence de ligands disponibles quelque soit le temps), plusieurs lois de puissance du rayon en fonction du temps sont prédites selon les conditions expérimentales (présence ou non de brosse répulsive, diffusion lente ou rapide des récepteurs au sein de la zone d'adhésion en croissance ; voir Figure 1.8 B).



B

vesicles	reaction	osmotic pressure	growth law $R \sim t^n$ $n = ...$
sticky	rapid	ideal gas	1/4
		plateau	0
	slow	ideal gas	1/2
heavy	rapid	ideal gas	1
	slow		5/2

Fig. 1.8: **(A)** Diagramme de phase d'adhésion entre deux vésicules avec p la pression dûe au glycocalix et γ la tension de membrane (source : (Zuckerman et Bruinsma, 1998)). **(B)** Exposants de croissance de la zone d'adhésion d'une vésicule recouverte de ligands sur une surface recouverte de récepteurs (source : (De Gennes *et al.*, 2003)).

1.2.1.3 *Vérifications expérimentales*

Plusieurs travaux expérimentaux permettent de tester les modèles d'adhésion. La situation expérimentale la plus courante consiste à greffer des ligands sur une surface et à

y faire adhérer une vésicule lipidique recouverte des récepteurs d'adhésion correspondant.

Guttenberg *et al.* ont ainsi utilisé des substrats recouverts d'intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ sur lesquels venaient adhérer des vésicules contenant des peptides RGD, récepteurs de cette intégrine (Guttenberg *et al.*, 2001). Ils ont montré que coexistaient deux types de zones adhésives : des zones d'adhésion forte où la membrane de la vésicule ne fluctue pas, et des zones d'adhésion faible où la fluctuation membranaire est bien visible. Cette coexistence de deux zones d'adhésion a pu être modélisée par Bruinsma *et al.* en reprenant les ingrédients du modèle de Zuckerman exposé en 1.2.1, mais en rendant mobiles les molécules répulsives de glycocalyx (Bruinsma *et al.*, 2000). Ils ont mis en évidence l'existence d'un potentiel à double puits, ce qui permet d'interpréter la coexistence de deux zones d'adhésion.

Le même type de vésicules a été utilisé par Boulbitch *et al.* pour déduire les caractéristiques de cinétiques d'adhésion sur des substrats greffés avec des concentrations différentes d'intégrines (Boulbitch *et al.*, 2001). Ils ont montré que pour de faibles concentrations de molécules adhésives, le déplacement du front de croissance d'adhésion suit une loi en $\sqrt{t}$ limitée par la diffusion des molécules, alors que pour de fortes concentrations, la loi est linéaire en t et est seulement limitée par la cinétique d'association ligand-récepteur. L'interprétation de ce genre d'études expérimentales est rendue délicate par le fait que les cinétiques d'adhésion dépendent fortement de la préparation chimique des surfaces, et plus particulièrement de l'accessibilité des ligands greffés sur la surface (Cuvelier et Nassoy, 2004).

D'autres études expérimentales ont permis de déterminer les paramètres énergétiques et cinétiques des liens ligands-récepteurs (pour une revue, voir (Bongrand, 1999)). On peut citer des études de flux hydrodynamique sur des cellules *Dictyostelium* (Decave *et al.*, 2002) menant à la détermination du taux de dissociation des liens adhésifs ($k^0_{off} = 10^{-2}\mathrm{s}^{-1}$) ainsi que leur densité membranaire ($n_0 = 10^{16}\mathrm{m}^{-2}$), ou des études d'adhésion de cellule entre des microplaques (Thoumine *et al.*, 1999) permettant de déduire le taux de formation des liens adhésifs ($3 \times 10^{-4}\ \mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$).

Tous les travaux que nous venons de présenter considèrent l'adhésion cellulaire comme un phénomène purement passif. La complexité des phénomènes observés dans la cellule autour des processus d'adhésion (motilité, réponse immunitaire, apoptose et bien d'autres) montre bien que ce sont des évènements très régulés dans la cellule, utilisés aussi bien pour collecter de l'information sur l'environnement cellulaire que pour en transmettre aux

cellules voisines. De plus, aucun des modèles présentés n'est capable d'expliquer l'asymétrie souvent retrouvée dans les complexes d'adhésion cellulaire. Nous verrons dans la suite de ce chapitre, l'implication forte dans la formation des zones d'adhésion cellulaires d'un élément qui n'a jusqu'à présent pas été considéré : le cytosquelette, et nous décrirons les modélisations théoriques prenant en compte cet élément qui expliquent la croissance de contacts cellulaires.

1.2.2 Point de vue mésoscopique sur les adhésions : le lien entre biologie et physique

La grande diversité des protéines rencontrées dans une cellule et de leurs interactions rend impossible à l'heure actuelle toute tentative d'embrasser l'ensemble des évolutions d'un phénomène cellulaire. En effet, les tentatives de dynamique moléculaire sont limitées à un petit nombre de molécules et à des durées plusieurs ordres de grandeur plus faibles que l'échelle caractéristique d'évolution des adhésions cellulaires. Les modélisations des adhésions ne peuvent donc pas se baser sur une vue moléculaire de l'assemblage des contacts.

On préfère donc raisonner suivant une approche *mésoscopique* de l'assemblage. Dans cette approche, sans nier l'importance du rôle des mécanismes moléculaires de régulation de ces structures, nous préférons faire l'hypothèse que le comportement des adhésions peut être expliqué en considérant des *modules*, c'est-à-dire des complexes protéiques. Ceci est particulièrement adapté à la considération des protéines cytoplasmiques liant les protéines transmembranaires d'adhésion au cytosquelette d'actine. La composition de ces assemblages protéiques est en effet très variable mais nous partons du postulat que la connaissance précise de leur composition n'est pas très importante pour prédire un comportement des adhésions dans une modélisation basée sur la physique statistique et donc sur une description d'assemblées de particules.

Dans les modélisations qui seront présentées dans la suite de cette introduction ainsi que dans les travaux rapportés dans ce document, nous considérerons les adhésions cellulaires comme un système à 4 « étages » : des ligands (étage 1) sont reconnus par une protéine d'adhésion (étage 2), qui est elle-même en interaction avec des complexes protéiques (étage 3) assurant la liaison à l'actine (étage 4).

1.3 Contacts focaux

Les contacts focaux ont été observés pour la première fois par Curtis en 1964 (Curtis, 1964). Plusieurs théories sur l'adhésion cellulaire s'opposaient à cette époque. Certaines émettaient l'hypothèse que les cellules adhéraient entre elles grâce aux interactions de Van der Waals entre leurs membranes alors que d'autres suggéraient que l'existence entre les cellules de molécules liant les membranes des cellules voisines entre elles. Les observations de coupes cellulaires par microscopie électronique ont montré l'existence d'un espace intercellulaire, semblant plutôt valider la seconde théorie (Robertson, 1958). Cependant, des expériences rapportant la floculation de leucocytes en présence d'ions lourds écrantant les charges de surface (D.J. *et al.*, 1962) ont amené Pethica à émettre l'hypothèse d'artefact ou de mauvaise interprétation des clichés de microscopie électronique (Pethica, 1961). Curtis défendait une troisième théorie selon laquelle l'espace intercellulaire était compatible avec l'adhésion de cellules vivantes. Selon lui, des forces attractives à longues portée de Van der Waals-London permettaient de maintenir l'adhésion entre cellules et étaient compensées à courte portée par des forces électrostatiques répulsives (Curtis, 1960; Curtis, 1962), en accord avec la théorie DLVO[9]. Convaincu que l'adhésion entre cellules ne différaient pas de l'adhésion d'une cellule sur du verre, il a utilisé une technique de microscopie interférométrique appelée RICM[10] pour imager la répartition de distance entre la membrane de fibroblastes de poulet et la lamelle de verre sur laquelle ces cellules étaient étalées (voir Figure 1.9 A). Il a observé que le corps cellulaire était généralement éloigné de 50 nm de la surface de verre, alors que de petites régions en bordure de cellules n'étaient séparées que d'une dizaine de nanomètres de cette surface. Une dizaine d'année plus tard, Izzard et Lochner ont repris et amélioré cette technique (Izzard et Lochner, 1976). Ils ont remarqué l'existence de zones de contacts fines et allongées, situées à la périphérie de la cellule, perpendiculaires à la bordure de la cellule et colocalisant avec l'extrémité de microfilaments d'actine (voir Figure 1.9 B et C). Ces zones d'adhésion étant les plus proches de la surface de verre, ils les ont appelées « contacts focaux ».

[9] Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek
[10] Reflexion Interference Contrast Microscopy

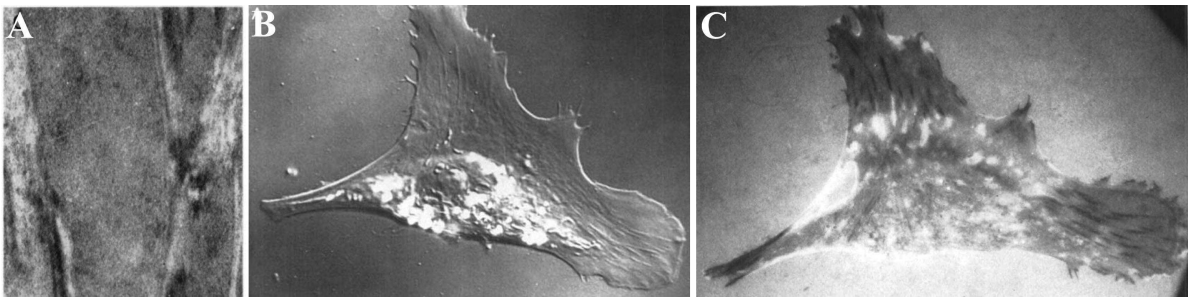


Fig. 1.9: **(A)** Image en RICM de fibroblastes de poulet étalés sur une lamelle de verre. Les zones sombres correspondent aux zones de contact alors que le corps cellulaire plus clair et plus éloigné de la lamelle (source : (Curtis, 1962)). **(B-C)** Les microfilaments d'actine d'une cellule adhérente repérés en DIC (B), correpondent avec les zones de contacts visualisées en RICM (C). Source : (Izzard et Lochner, 1976).

1.3.1 Composition

Les contacts focaux sont composés d'une famille de protéines d'adhésion transmembranaires, les intégrines, liées à l'extérieur de la cellule à une protéine de la matrice extracellulaire et connectées au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire d'un complexe protéique (Geiger *et al.*, 2001).

Les intégrines sont des hétérodimères formés par l'association de deux sous-unités appelées α et β. Chaque sous-unité est constituée d'un domaine extracellulaire globulaire responsable de l'adhésion à un ligand, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique assez court (une cinquantaine d'acides aminés) (pour une revue, voir (Zamir et Geiger, 2001)). Il existe chez les mammifères 18 sous-unités α et 8 sous-unités β différentes, pouvant s'associer pour former 24 intégrines différentes (toutes les possibilités ne sont pas représentées). Chaque couple de sous-unités reconnaît spécifiquement un ligand, comme indiqué sur la Figure 1.10 (Hynes, 1992). Toutefois, une intégrine peut reconnaître plusieurs ligands différents, de même qu'un ligand peut être reconnu par plusieurs intégrines. Ainsi, un grand nombre d'intégrines sont capables de se lier à une séquence répétée par plusieurs protéines de la matrice extracellulaire : la séquence RGD[11].

La matrice extracellulaire est une appellation générique correspondant au matériel extracellulaire organisé en fibres ou en feuillets, sécrété par les cellules. Un de ses rôles principaux est de constituer un substrat, une séparation et une structure de maintien aux tissus et organes. Cependant, on lui attribue beaucoup d'autres rôles comme celui d'interagir avec des facteurs solubles intervenant dans la prolifération cellulaire, la survie ou

[11] Arginine-Glycine-Acide aspartique

la différenciation. La matrice extracellulaire est constituée principalement de collagène et de protéines fibreuses permettant l'adhésion, parmi lesquelles on trouve la fibronectine, la laminine ou encore la vitronectine (Reichardt, 1999).

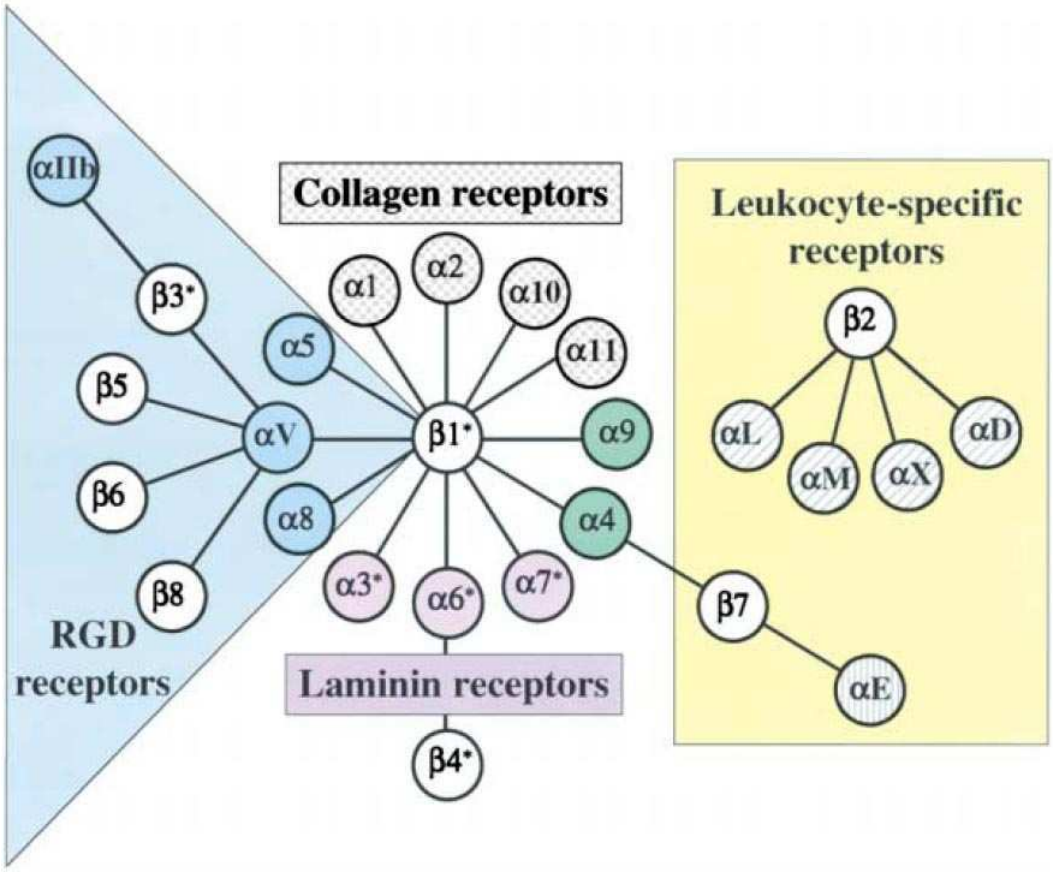


Fig. 1.10: Couples d'association possibles des sous-unités α et β des intégrines. Source : (Hynes, 1992).

Le complexe protéique liant l'intégrine au cytosquelette d'actine est composé d'un grand nombre de protéines différentes. Parmi les protéines recensées (Zamir et Geiger, 2001), on trouve des protéines associées à l'actine (vinculine, paxilline, α-actinine,...), des protéines liant le domaine cytoplasmique de l'intégrine (FAK, α-actinine, tensine,..), des kinases et des phosphatases régulant l'activité de certaines protéines (en contrôlant leur état phosphorylé ou déphosphorylé), des régulateurs de petites GTPases et d'autres enzymes. Toutes ces protéines ne sont pas présentes simultanément dans un contact focal. De plus, la composition exacte d'un contact focal dépend du type d'intégrine ou encore de la maturation du contact.

L'actine intervient dans les contacts focaux sous forme de faisceaux de filaments complexés avec la myosine II, une extrémité de ces faisceaux se terminant au niveau du contact

focal (Abercrombie et Dunn, 1975). Comme nous le verrons dans la suite, les propriétés contractiles de ces faisceaux d'actine sont très importantes dans la régulation des contacts focaux.

1.3.2 Assemblage, rôle et régulation

La grande diversité de protéines pouvant intervenir dans un contact focal laisse supposer que des zones adhésives entre cellules et matrice extra-cellulaire avec des propriétés d'adhésion et des comportements différents existent également. On distingue ainsi plusieurs catégories d'adhésions focales en fonction de leur morphologie et de leur localisation dans la cellule. Les adhésions focales les mieux documentées sont celles qu'on nomme habituellement *contacts focaux*. Ce sont des zones d'adhésion de forme ovale allongée, trouvées à la périphérie de la cellule, formées majoritairement d'intégrines $\alpha_V\beta_3$ et enrichies en paxilline, en vinculine et en protéines aux résidus tyrosine phosphorylés. Les *adhésions fibrillaires* sont des zones d'adhésion formées d'intégrines $\alpha_5\beta_1$ et enrichies en tensine et actopaxine, et organisées au centre de la cellule (Katz *et al.*, 2000; Zamir *et al.*, 1999). Les adhésions fibrillaires sont impliquées dans la formation des fibres de fibronectine par la cellule (Mao et Schwarzbauer, 2005). Une troisième catégorie d'adhésion focale a été documentée, il s'agit des *complexes focaux*. Ces zones d'adhésion de petite taille sont situées au niveau des lamellipodes (Rottner *et al.*, 1999).

La description des différentes catégories d'adhésion focales est particulièrement importante dans l'étude des cellules en migration. La migration cellulaire est le fruit d'une réorganisation du cytosquelette coordonnée avec la formation et la disparition spatialement contrôlées d'adhésions focales. En effet, une cellule en migration doit former des adhésions à l'avant de son lamellipode en croissance, tout en défaisant les contacts à l'arrière du corps cellulaire (Palecek *et al.*, 1998; Horwitz et Parsons, 1999). Les adhésions focales apparaissent initialement en tant que complexes focaux, dont la formation à la périphérie de la cellule est induite par la petite GTPase Rac1 (Rottner *et al.*, 1999). La liaison entre les complexes focaux et la matrice extracellulaire active les kinases de la famille Src (Playford et Schaller, 2004) et les FAK[12] (Parsons, 2003). Une cascade de signalisation active alors Rac1 dans le lamellipode, au niveau de la membrane (Kraynov *et al.*, 2000). L'activation de Rac1 permet en retour de promouvoir la polymérisation d'actine et donc la croissance

[12] Focal Adhesion Kinase

du lamellipode. La protéine PAK, cible des petites GTPases Rac1 et CDC42 régulant la polymérisation d'actine, interagit également avec la paxilline et est une cible de choix pour expliquer cette régulation de la formation des complexes focaux par Rac1 (Edwards *et al.*, 1999; Turner *et al.*, 1999).

L'évolution des complexes focaux en contacts focaux se fait suite à l'activation de la voie de signalisation contrôlée par RhoA (Clark *et al.*, 1998). L'activation de RhoA entraîne la formation de fibres de stress et l'activation de la contractilité acto-myosine (Ridley et Hall, 1992). Cependant, il a été possible d'induire la croissance des contacts focaux dans des cellules où l'activité de RhoA a été spécifiquement bloquée par la C3 kinase toxine en rétablissant l'activation de Rho-Kinase[13] et de Dia1 (Watanabe *et al.*, 1999). La protéine Rho-kinase inhibe la phosphatase de la chaîne légère de la myosine qui est une enzyme réduisant l'activité des myosines (Kimura *et al.*, 1996; Kawano *et al.*, 1999). L'activation de Rho-kinase entraîne une augmentation du diamètre des fibres de stress alors que son inhibition diminue la contractilité cellulaire (Katoh *et al.*, 2001). Dia1, quant à elle, est une protéine de la famille des formines capable de nucléer et d'allonger des filaments d'actine (Higgs et Peterson, 2005).

Il apparaît donc que le cytosquelette d'actine joue un rôle particulièrement important dans la régulation des contacts focaux. D'une part, la polymérisation d'actine permet l'exploration cellulaire et la formation de complexes focaux en périphérie cellulaire. D'autre part, la contractilité acto-myosine est un facteur déterminant dans la maturation des complexes focaux en contacts focaux assurant la stabilité cellulaire.

1.3.3 Mécanosension

Ce processus de maturation des complexes focaux en contacts focaux est fortement lié à un phénomène appelé *mécanosension*. Il s'agit de la capacité d'une cellule à évaluer la résistance mécanique de son environnement et à adapter son comportement en fonction de cette résistance. Des expériences ont ainsi montré que des cellules entières peuvent augmenter leur rigidité suite à l'application d'un flux hydrodynamique (Sato *et al.*, 1987). La torsion locale de billes magnétiques recouvertes de fibronectine induit une rigidification du cytosquelette proportionnelle à la contrainte appliquée (Wang *et al.*, 1993).

[13] aussi appelée ROCK

Dans certains cas, on explique le phénomène de mécanosension en faisant intervenir des canaux ioniques liés à la fois au cytosquelette et à un objet extracellulaire. Une tension (extra- ou intracellulaire) appliquée sur la canal ionique permet de moduler l'activité de celui-ci et d'activer différents processus cellulaires. Dans l'oreille interne par exemple, des canaux cationiques non-spécifiques des stéréocils sont liés au cytosquelette d'actine et à la membrane du stéréocil voisin (pour une revue, voir (Gillespie et Walker, 2001)). Cependant, Choquet a montré qu'en stoppant le mouvement rétrograde de billes liées aux intégrines d'une cellule, on observe un renforcement local de la liaison bille-cellule qui n'affecte pas le mouvement rétrograde d'autres billes sur cette cellule (Choquet *et al.*, 1997). De plus, une traction externe est capable de remplacer localement la traction des fibres *de stress* quand la contractilité acto-myosine est inhibée (Riveline *et al.*, 2001). Ce renforcement local du cytosquelette et de sa liaison aux intégrines ne peut pas être interprété par la régulation mécanique de canaux ioniques.

Ces différentes expériences concernent la réponse des cellules à l'application d'une contrainte externe. Cependant, des cellules en migration sont capables d'évaluer certaines caractéristiques de leur environnement afin de privilégier une direction et une vitesse de déplacement. Il a été ainsi montré que les cellules peuvent répondre au gradient de concentration de réactifs dissous (chimiotaxie ; (Pettit et Fay, 1998)) ou de ligands adhésifs greffés (haptotaxie ; (Harris, 1973)), au gradient d'intensité lumineuse (phototaxie ; (Saranak et Foster, 1997)), de potentiel électrostatique (galvanotaxie ; (Brown et Loew, 1994)) ou encore de potentiel gravitationnel (géotaxie ; (Lowe, 1997)). Il existe un phénomène similaire concernant les propriétés mécaniques (module d'Young) de l'environnement cellulaire. Ainsi, en fonction de la rigidité mécanique de leur substrat, les cellules adoptent différentes morphologies et vitesses de migration. En particulier, elles peuvent se déplacer d'autant plus vite que le substrat est plus souple. De plus, elles forment davantage de contacts focaux allongés sur des substrats rigides, alors qu'on ne trouvera quasiment que des complexes focaux dans des cellules étalées sur des substrats souples (Pelham et Wang, 1997). Ceci conduit les cellules à migrer vers les zones du substrat de plus grande rigidité mécanique (durotaxie ; (Lo *et al.*, 2000)).

Comment les cellules sont-elles capables de détecter la différence entre des substrats dont seule la rigidité mécanique change ? Un mécanisme plausible fait intervenir la traction des fibres de stress d'actine sur les adhésions focales, menant à différentes réponses en fonction de la rigidité du substrat (Pelham et Wang, 1997). En effet, la culture des cel-

lules en milieu sans sérum inhibe la contractilité acto-myosine et empêche la maturation des complexes focaux en contacts focaux (Bershadsky *et al.*, 1996). Le même résultat est également obtenu en présence d'inhibiteurs de la voie Rho-kinase comme Y-27632 (Uehata *et al.*, 1997) ou par surexpression de la caldesmone, un inhibiteur de la propriété d'ATPase de la myosine (Helfman *et al.*, 1999). La tension générée par les fibres de stress est donc bien nécessaire à la maturation des contacts focaux. De plus, la dépolymérisation des microtubules par le nocodazole a comme effet indirect d'activer Rho et l'élongation des contacts focaux a lieu même dans des cellules cultivées en milieu sans sérum (Bershadsky *et al.*, 1996). Il a même été montré que seule l'activation de Dia1 est réellement nécessaire pour permettre la maturation des contacts focaux : la croissance de contacts focaux est possible en présence d'inhibiteurs de la voie Rho-kinase à condition de remplacer la contractilité acto-myosine par l'application d'une force extérieure mimant cette tension (Riveline *et al.*, 2001).

Les complexes focaux sont donc susceptibles d'évoluer en contacts focaux suivant l'état de tension interne de la cellule (contrôlé par Rho) et les propriétés biochimiques et mécaniques de la matrice extracellulaire (Miyamoto *et al.*, 1995; Katz *et al.*, 2000).

1.3.4 Modélisation de la croissance des contacts focaux

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer la croissance directionnelle de contacts focaux soumis à une force. Nous allons commencer par des considérations thermodynamiques sur un agrégat protéique accroché à un substrat par une extrémité et auquel on applique une force à l'autre extrémité. Nous verrons ensuite comment une prise en compte plus globale de l'élasticité permet de prédire des comportements de croissance de contacts focaux sous cisaillement.

Shemesh *et al.* ont proposé que la mécanosensivité des contact focaux puisse être expliquée par un principe thermodynamique gouvernant l'auto-assemblage d'un agrégat protéique soumis à une force de traction (Shemesh *et al.*, 2005). Ils se sont basés sur la prédiction thermodynamique que le stockage d'énergie élastique dans un agrégat étiré diminue le potentiel chimique de celui-ci et favorise l'ajout de molécules non-agrégées à l'agrégat étiré (Hill, 1987). En effet, l'assemblage de nouvelles molécules suivant le sens de traction provoquerait une relaxation de l'énergie élastique stockée dans l'agrégat, ce qui conduit à une diminution de l'énergie libre totale : $G_{tot} = F_{elast} + F_{free} + F_{pull}$ (où

F_{elast} est l'énergie élastique stockée dans l'agrégat, F_{free} est l'énergie libre des protéines non-assemblées dans l'agrégat et F_{pull} est l'énergie libre associée à la force de traction appliquée), si le gain d'entropie, lors de l'assemblage, de la fraction de molécules libres n'est pas trop important.

Le développement à une dimension de cette modélisation met en évidence un paramètre $\chi = \frac{fl_0}{\Delta\mu^0}$ (où f est la force de traction appliquée, l_0 la longueur du contact en l'absence de contraintes et $\Delta\mu^0$ la différence de potentiel chimique standard entre les molécules libres et les molécules de l'agrégat). Plusieurs comportements sont prédits en fonction des valeurs que peut prendre ce paramètre χ, en particulier, si χ est assez grand tout en restant inférieur à une valeur critique correspondant à la densité relative de points d'ancrages sur la longueur du contact, alors l'agrégat peut croître jusqu'à atteindre une longueur maximale dépendant de la force appliquée. Cette modélisation, qui peut être appliquée indifféremment à l'étage des intégrines ou à celui des protéines de liaison au cytosquelette, ne permet néanmoins pas d'expliquer les différences de comportement des contacts focaux dépendant de l'élasticité du substrat sous-jacent, ni de prédire la brisure de symétrie des contacts focaux.

L'élasticité du substrat à été prise en compte par Nicolas *et al.* (Nicolas *et al.*, 2004). Dans ce modèle, le mécanosenseur est supposé faire partie intégrante du contact focal. Il s'agit d'une protéine dont les déformations sous l'action d'une force la font passer d'un état inactivé à un état activé. Le contact focal est supposé être une couche mince et déformable attachée sur toute sa surface inférieure au substrat et cisaillée sur sa surface supérieure par une force f s'appliquant sur une surface inférieure à la surface totale du contact et dirigée parallèlement au substrat vers l'intérieur de la cellule (traction des fibres *de stress*). Cette *localisation* de la force est importante pour éviter un cisaillement uniforme du contact focal et permet l'apparition d'une zone comprimée à l'avant du contact (vers l'intérieur de la cellule) et d'une zone dilatée à l'arrière (vers l'extérieur de la cellule).

Cette couche mince élastique est modélisée à une dimension par un ensemble de particules reliées par des ressorts de raideur k_0 (voir figure 1.11). Chaque particule représente un module liant le substrat au cytosquelette d'actine, c'est-à-dire un complexe protéique comprenant intégrines et protéines de liaison au cytosquelette d'actine. Ces particules sont liées par un ressort de raideur k_b à des points d'ancrage du substrat situés dans un potentiel sinusoïdal (assimilé à un ressort de raideur k_m pour les petites déformations), ce

qui permet de modéliser l'élasticité du substrat (voir figure 1.11). Cette approche à une dimension permet d'obtenir le profil de densité et donne des résultats très similaires au traitement complet tri-dimensionnel (Nicolas et Safran, 2004).

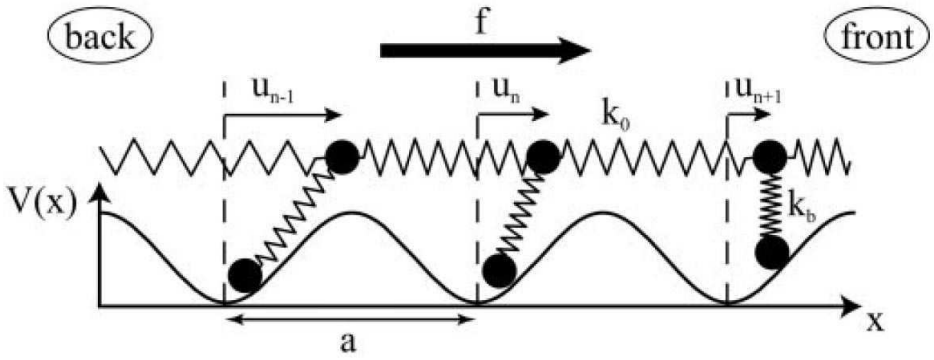


FIG. 1.11: Modèle à une dimension d'un contact focal. Les particules représentent les complexes protéiques liant l'actine au substrat. Source : (Nicolas *et al.*, 2004).

Les zones comprimées et dilatées sont situées respectivement à l'avant et à l'arrière de la surface d'application de la force, suivant la direction de celle-ci. Les profils obtenus montrent que les variations de densité protéique dues à la force au sein de ces zones sont largement plus grandes que les fluctuations thermiques de densité et que la taille caractéristique de ces zones est de l'ordre de l'épaisseur du contact focal, soit environ 100 nm. Le principal ingrédient de ce modèle est que la compression va induire une activation des protéines, permettant le recrutement de nouveaux modules dans cette zone comprimée. Le recrutement de modules de surface a^2 relargue une énergie $\Delta E_a \simeq -e\frac{f}{\sqrt{kk_0}}$ où e est la variation d'énergie libre d'un module lors du recrutement, et provoque une diminution de l'énergie élastique stockée dans le contact $\Delta E_{el} \simeq \frac{f^2a^2}{2k}$ où $k = \frac{k_bk_m}{k_b+k_m}$. Le recrutement est alors favorable ($\Delta E = \Delta E_a + \Delta E_{el} < 0$) pour des valeurs de e positives, c'est-à-dire que le recrutement est un processus exothermique.

La vitesse de recrutement au niveau de la zone comprimée est alors : $v_+ = k_{on}c_f$ avec c_f la concentration de modules libres et $k_{on} = k^0_{on}\exp\left(-\frac{\Delta E}{k_BT}\right)$où k^0_{on} représente le taux d'attachement en l'absence de force. Il existe en revanche une dissociation au niveau de la zone dilatée dont la vitesse v_- dépend du gain d'énergie élastique : $v_- = k^0_{off}\exp\left(\frac{f^2}{2k\times k_{BT}}\right)$. Le contact focal croît tant que le rapport $\frac{v_+}{v_-}$ est supérieur à 1, ce qui permet de définir une force maximale permettant la croissance : $f_{max} = \frac{2e}{al}$ avec l l'épaisseur du contact focal. L'existence d'une telle force (et donc d'une taille maximale de contact) est compatible avec les observations expérimentales de Balaban *et al.* (Balaban *et al.*, 2001).

Le facteur commun à ces deux descriptions théoriques des contacts focaux est que des comportements expérimentalement testables ont été prédits alors que la composition exacte des contacts focaux n'a pas été prise en compte. L'approximation d'un contact focal par une description en étages telle que nous l'avons avancée à la section 1.2.2 est donc suffisante pour raisonner sur le comportement de telles adhésions. De plus, c'est souvent celle implicitement utilisée dans les travaux de biologie cellulaire : un contact focal est repéré par une protéine le composant, cette protéine pouvant être indifféremment la vinculine, la paxilline, la phosphotyrosine ou d'autres encore. Nous conserverons cette approche dans nos travaux sur les contacts focaux de l'annexe A.

1.4 Jonctions adhérentes

1.4.1 Composition

Les jonctions adhérentes sont composées d'une protéine d'adhésion transmembranaire, la cadhérine, liée à l'extérieur de la cellule à une cadhérine identique d'une autre cellule et connectée au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire d'un complexe protéique (voir figure 1.12 B).

Les cadhérines constituent une grande famille de protéines d'adhésion dont les premiers membres ont été découverts pendant les années 80 (Peyrieras *et al.*, 1983; Nose et Takeichi, 1986). De nouvelles cadhérines ont été découvertes régulièrement depuis (Angst *et al.*, 2001). La famille des cadhérines comprend des cadhérines dites classiques, des protocadhérines, des cadhérines desmosomales et des protéines ressemblant aux cadhérines mais ne pouvant être classées dans une des catégories précédentes (Leckband et Prakasam, 2006). Les cadhérines classiques ont été les plus étudiées jusqu'à présent et sont nommées d'après les tissus dans lesquels on les a isolées pour la première fois. Par exemple, les E-, N- et R-cadhérines doivent leur nom respectivement aux cellules épithéliales, neuronales et rétiniennes. Il faut noter que ces cadhérines sont exprimées dans bien d'autres tissus et qu'un type cellulaire donné exprime généralement plusieurs types de cadhérines en proportions différentes (Takeichi, 1991). Les cadhérines desmosomales ne sont localisées que dans les desmosomes et les protocadhérines, les moins bien étudiées, sont exprimées entre autres dans les cellules nerveuses. Toutes ces catégories sont illustrées dans la Figure 1.12 A.

Parmi les cadhérines classiques, on distingue un sous-groupe représentant les cadhérines des chordés (dont les vertébrés font partie) divisé en cadhérines de type I, possédant le domaine très conservé HAV[14] dans le domaine extracellulaire, et les cadhérines de type II, ne possédant pas de domaine HAV. Les jonctions adhérentes que nous avons étudiées sont formées à partir de la VE[15]-cadhérine qui fait partie des cadhérine de type II. Cette cadhérine est constituée de trois régions principales :

- une région extracellulaire comportant cinq domaines homologues. Ces domaines sont numérotés de 1 à 5 en partant du côté N-terminal. Trois ions Ca^{2+} se placent entre deux domaines consécutifs (soit 12 ions Ca^{2+} pour chaque cadhérine). Ces ions permettent de rigidifier cette région extracellulaire, permettant la reconnaissance homotypique d'une autre cadhérine (Nagar *et al.*, 1996). Cette propriété est responsable de la sensibilité des jonctions adhérentes à la concentration en ions calcium dont les cadhérines tirent leur nom.
- une région transmembranaire hydrophobe.
- une région cytoplasmique permettant de lier les cadhérines au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire d'un pont protéique dont les caténines font partie. La protéine p120 est également susceptible de se lier à cette région cytoplasmique.

La liaison entre les cadhérines et le cytosquelette d'actine est assurée par un complexe protéique comprenant notamment la β-caténine. Le complexe cadhérine/β-caténine peut se lier au niveau de la β-caténine à l'α-caténine (Jou *et al.*, 1995) qui assure la liaison au cytosquelette, soit directement (Rimm *et al.*, 1995), soit par l'intermédiaire d'autres protéines associées à l'actine comme l'α-actinine (Knudsen *et al.*, 1995).

L'actine est également présente dans les jonctions adhérentes et nous reviendrons plus amplement sur son rôle à la section 1.4.3.

1.4.2 Rôle et régulation

Les jonctions adhérentes sont principalement impliquées dans la cohésion et le maintien des tissus (Steinberg et McNutt, 1999). Le dysfonctionnement de leurs propriétés adhésives est un facteur important lors du développement des tumeurs cancéreuses, puisque cela per-

[14] Histidine-Alanine-Valine
[15] Vasculaire Endothéliale

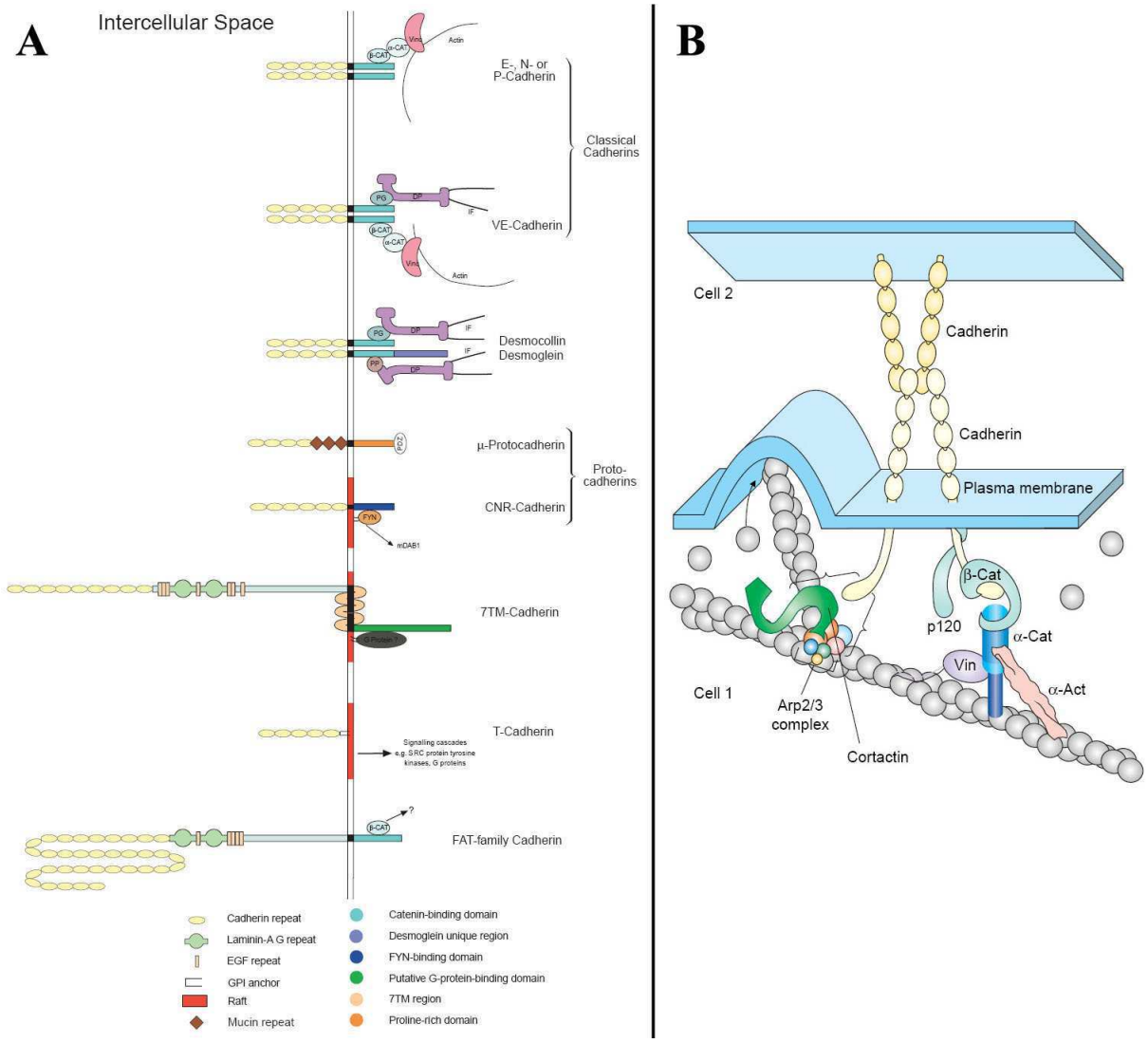


Fig. 1.12: **(A)** Quelques membres de la famille des cadhérines (Angst *et al.*, 2001). **(B)** Composition d'une jonction adhérente (Bershadsky, 2004).

met l'apparition de métastases dans l'organisme (Takeichi, 1993). Comme les propriétés adhésives diffèrent suivant le type de cadhérines mises en jeu, les cellules différenciées peuvent être triées en fonction des cadhérines exprimées à leur surface lors de l'embryogenèse (Tepass, 1999; Vleminckx et Kemler, 1999).

Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la régulation des jonctions adhérentes. IQGAP1 par exemple est une cible de la voie Rac (Fukata *et al.*, 1999) intervenant directement au niveau des jonctions adhérentes en se liant à la β-caténine sur le site de liaison de l'α-caténine, provoquant la rupture de la liaison entre l'actine et la cadhérine et par conséquent l'affaiblissement de la jonction adhérente (Kuroda *et al.*, 1998). Rac1

sous sa forme active (liée au GTP) se lie directement à IQGAP1 et empêche sa liaison à la β-caténine. La présence d'une grande quantité de Rac1 sous sa forme active permet donc de rétablir les jonctions adhérentes (Noritake *et al.*, 2004). Rap1 est une GTPase proche homologue de Ras également très impliquée dans la régulation des jonctions adhérentes (pour une revue, voir (Bos, 2005)). Outre un rôle direct sur la régulation des cadhérines des jonctions (Hogan *et al.*, 2004), Rap1 interagit notamment avec la voie de signalisation contrôlée par CDC42, menant à un possible contrôle spatial et temporel du cytosquelette d'actine au niveau des jonctions adhérentes (Schwamborn et Puschel, 2004).

L'importance de la liaison entre le cytosquelette d'actine et les cadhérines qui semble découler de ces différentes régulations de la formation des jonctions adhérentes est directement prouvée par des expériences mettant en jeu des mutants exprimant des cadhérines tronquées, sans partie cytoplasmique permettant la liaison à la β-caténine. Dans ces études, l'absence de liaison entre cadhérines et β-caténines empêche la formation correcte des jonctions adhérentes (Nagafuchi et Takeichi, 1988). De plus, deux phénomènes clés de la formation des jonctions adhérentes faisant intervenir le cytosquelette d'actine ont été mis en évidence. Il s'agit d'une part de la polymérisation d'actine, et d'autre part de la contractilité acto-myosine de l'autre.

1.4.3 Implication du cytosquelette d'actine dans la formation des jonctions adhérentes

La polymérisation d'actine intervient tout d'abord en permettant l'exploration cellulaire et la mise en contact des membranes de cellules voisines. De plus, des faisceaux de filaments d'actine polymérisent au niveau des jonctions adhérentes, maintenant les membranes en contact (Vasioukhin *et al.*, 2000). Ces faisceaux sont nucléés par la formine-1 qui interagit avec l'α-caténine (Kobielak *et al.*, 2004). Ainsi, plus le contact croît et recrute de protéines, plus les filaments d'actine polymérisent au niveau des jonctions adhérentes. Puisque les cadhérines sont en permanence renouvelées dans les jonctions adhérentes (Delanoe-Ayari *et al.*, 2004b), la dynamique de polymérisation du cytosquelette d'actine semble pouvoir dicter la dynamique des jonctions adhérentes. Cette hypothèse a servi de base à une modélisation de la croissance d'une morphologie particulière de jonctions adhérentes faisant intervenir la VE-cadhérine (Delanoe-Ayari *et al.*, 2004b). Dans cette modélisation, un équilibre de force entre des filaments d'actine qui polymérisent contre une membrane qui

résiste permet de prédire une loi de croissance des jonctions adhérentes ajustées sur des courbes expérimentales. Nous détaillerons cette modélisation au chapitre 4.1.

Le rôle de la contractilité acto-myosine est mis en évidence par la localisation et le rôle de la myosine II au niveau des jonctions adhérentes (Bertet *et al.*, 2004). L'inhibition de la contractilité acto-myosine entraîne la disparition des jonctions adhérentes alors que son activation promeut leur formation (Gloushankova *et al.*, 1998). Il a été de plus montré que la myosine II est la cible de la voie de signalisation Rho-kinase intervenant dans la régulation des jonctions adhérentes (Shewan *et al.*, 2005). Enfin, la contractilité acto-myosine semble pouvoir réguler la morphologie des jonctions adhérentes (Krendel *et al.*, 1999).

Dans ces études, l'implication du cytosquelette d'actine dans la formation des jonctions adhérentes a été considérée soit du point de vue de la polymérisation d'actine, soit du point de vue de la contractilité acto-myosine. Nous essaierons au chapitre 3 de réconcilier ces deux approches.

1.5 Conclusion

Nous avons tenté de donner dans cette introduction une vue d'ensemble des phénomènes mis en jeu par la cellule lors de l'adhésion cellulaire. En particulier, nous nous sommes intéressés à deux types d'adhésions cellulaires que sont les jonctions adhérentes et les contacts focaux. Deux points ont été particulièrement mis en avant, il s'agit tout d'abord du rôle du cytosquelette d'actine dans la formation de ces adhésions et ensuite qu'un point de vue mésoscopique des adhésions permet de prédire des comportements vérifiables expérimentalement sans pour autant contredire les résultats moléculaires obtenus par ailleurs.

2

Méthodes expérimentales

2.1 Les cellules

2.1.1 Types cellulaires

Deux types cellulaires ont été utilisés dans l'étude des jonctions adhérentes :

- EA-hy926 (nous y ferons référence sous l'appelaltion simplifiée EAhy) : c'est une lignée stable, résultat de la fusion d'une lignée stable A549 et de cellules de cordons ombilicaux humain (HUVEC[2]), et qui exprime naturellement la VE-cadhérine et d'autres cadhérines.
- CHO VE : c'est une lignée stable établie au laboratoire à partir de cellules CHO-K1[3] exprimant de façon stable la VE-cadhérine-GFP et aucune autre cadhérine.

Ces deux lignées ont des intérêts différents. Les CHO VE permettent d'observer directement des jonctions adhérentes fluorescentes sur toutes les cellules de l'échantillon. Cependant, ces cellules sont des fibroblastes et n'ont par ailleurs pas d'inhibition de contact. L'observation de monocouches cellulaires est donc rendue difficile car la densité cellulaire peut être très inhomogène sur l'échantillon. De plus, les cellules continuent à se diviser avec le même rythme, même quand les cellules forment une monocouche, limitant la durée de la fenêtre expérimentale . Les EAhy expriment naturellement les VE-cadhérines et leur inhibition de contact leur permet de former des monocouches régulières.

La lignée stable de cellules humaines SV80 a été utilisée dans l'étude des contacts focaux.

[2] Human Umbilical Vein Endothelial Cell
[3] Chinese Hamster Ovary

2.1.2 Entretien des cellules

Les cellules sont cultivées habituellement dans du Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) dans lequel est rajouté 10% de sérum de veau (BCS[4]) et 1% d'antibiotiques (pénicilline-streptomycine). Elles sont resuspendues deux fois par semaine en les détachant avec de la trypsine à 0.25%-1mM EDTA (1 min 37°C) et en les diluant environ 20 fois.

2.1.3 Congélation et décongélation des cellules

2.1.3.1 Congélation

1. Décoller les cellules confluentes d'une boite de Petri de 100 mm à la trypsine 0.25%-1mM EDTA.
2. Centrifuger (3 min, 500 g).
3. Resuspendre les cellules dans 1mL de milieu composé de 70% DMEM (contenant 1% d'antibiotiques), 20% BCS, 10% DiMethyl SulfOxide (DMSO).
4. Congeler à -20°C pendant 1 heure.
5. Conserver à -80°C.

2.1.3.2 Décongélation

1. Laisser les cellules décongeler dans la glace.
2. Laisser les cellules 10 minutes à température ambiante.
3. Resuspendre les cellules dans 10 mL de milieu de culture avec sérum.
4. Centrifuger (3 min, 500 g).
5. Resuspendre les cellules dans 10 mL de milieu de culture avec sérum et les déposer dans deux boites de Pétri de 60 mm.
6. Le lendemain, changer le milieu de culture.

[4] Bovine Calf Serum

2.1.4 Transfections

2.1.4.1 *Protocole de transfection par complexation avec un polymère cationique*

Nous avons utilisé de l'Exgen 500 (Euromedex) qui est une solution de polyethylenimine (PEI) linéaire de 22 kDa. Le protocole suivant a été utilisé pour transfecter les cellules EAhy et CHO VE et les quantités correspondent à une boite de Petri de 35mm :

1. Une demi-heure avant transfection, changer le milieu de culture pour du milieu sans serum en diminuant de moitié le volume (1mL).
2. Diluer 1 μg d'ADN dans 50 μL de DMEM.
3. Diluer 10 μL d'Exgen 500 dans 40 μL de DMEM.
4. Ajouter la solution d'Exgen 500 **sur** la solution d'ADN.
5. Agiter au vortex.
6. Laisser incuber 10 min à température ambiante.
7. Ajouter les 100 μL à la boite de Pétri et replacer la boite dans l'incubateur.
8. Rincer 2 heures plus tard avec du milieu contenant du serum.

2.1.4.2 *Protocole de transfection par complexation avec un précipité de Calcium-Phosphate*

Ce protocole a été utilisé pour transfecter les cellules SV80 et les quantités correspondent à une boite de Petri de 35mm :

1. Une demi-heure avant transfection, remplacer le milieu de culture.
2. Diluer 2μg d'ADN dans 150 μL de solution de $CaCl_2$ à 250 mM.
3. Tout en agitant au vortex, ajouter goutte à goutte la solution d'ADN à 150 μL de HEPES-Buffered Saline (HBS) 2x (140 mM NaCl, 1.5 mM Na_2HPO_4. $2H_2O$, 50 mM HEPES, pH 7.05).
4. Ajouter la solution de précipité à la boite de Pétri.
5. 3 heures plus tard, rincer plusieurs fois les cellules avec du milieu contenant du sérum.

2.1.5 Clonage

Le site actif VCA de la protéine N-WASP a été cloné dans le vecteur HA-pCGN entre les sites de restriction XbaI et BamHI. Nous avons utilisé les amorces suivantes pour la PCR[5] :

- 5'-GCT-CTA-GAC-CTT-CTG-ATG-GGG-AC-AT-3' (XbaI)
- 5'-CGG-GAT-CCT-CAG-TCT-TCC-CAC-TCA-TCA-TC-3' (BamHI)

Les amorces ont été achetées chez MWG-Biotech et la construction obtenue a été vérifiée par séquençage (Genome Express).

2.1.6 Constructions utilisées

Constructions	Source
Actine-GFP	(Choidas *et al.*, 1998)
Actine-RFP	(Kodama *et al.*, 2003)
Cofiline-S3A	(Arber *et al.*, 1998)
Fibronectine-GFP	(Ohashi *et al.*, 1999)
Gelsoline	Don de A. Lader
Integrin-β_3-GFP	(Ballestrem *et al.*, 2001)
Paxilline-GFP	(Zamir *et al.*, 2000)
Rac constitutivement actif	(Helfman *et al.*, 1999)
VASP-GFP	(Huttelmaier *et al.*, 1999)
VE-Cadherin-GFP	(Delanoe-Ayari *et al.*, 2004b; Delanoe-Ayari *et al.*, 2004a)
Vinculine-GFP	(Zamir *et al.*, 1999)
WASP-GFP	(Le Page *et al.*, 2004)
Zyxin-RFP	(Rottner *et al.*, 1999)

Tab. 2.1: Constructions utilisées et leur source.

[5] Polymerase Chain Reaction

2.1.7 Fixation et immunofluorescence

2.1.7.1 *Fixation standard*

La plupart des fixations ont été réalisées au ParaFormAldéhyde (PFA) et les membranes solubilisées avec du Triton X-100 en suivant le protocole suivant :

1. Changer le milieu de culture pour une solution de PFA 3% dans du tampon phosphate (PBS).
2. Laisser fixer 20 min.
3. Changer la solution de fixation pour une solution de Triton X-100 0.5% dans la même solution que précédemment.
4. Laisser perméabiliser 3 min.
5. Rincer 3 fois avec une solution de PBS en laissant 5 minutes entre chaque rinçage.

2.1.7.2 *Fixation et perméablisation au méthanol froid*

Cette méthode de fixation a été utilisée lorsque seul un marquage des cadhérines est nécessaire et permet d'obtenir par la suite un marquage intense des cadhérines.

1. Changer le milieu de culture pour une solution de méthanol à -20°C.
2. Laisser à -20°C pendant 10 min.
3. Rincer 3 fois avec une solution de PBS en laissant 5 minutes entre chaque rinçage.

2.1.7.3 *Immunofluorescence*

Les marquages par immunofluorescence sont généralement réalisés à l'aide d'un anticorps primaire reconnaissant la protéine cible et d'un anticorps secondaire fluorescent reconnaissant l'anticorps primaire. Le marquage de l'actine se fait à l'aide de phalloïdine fluorescente et ne nécessite qu'une incubation.

1. Incuber la lamelle 45 min avec une solution d'anticorps primaire.

2. Rincer 3 fois avec une solution de PBS en laissant 5 minutes entre chaque rinçage.
3. Incuber la lamelle 45 min avec une solution d'anticorps secondaire.
4. Rincer 3 fois avec une solution de PBS en laissant 5 minutes entre chaque rinçage.

Les lamelles peuvent être montées sur une lame porte-objet avec du Mowiol ou conservées dans du PBS à 4°C pour une observation ultérieure avec une cellule porte-lamelle. Cette dernière méthode permet de conserver une fluorescence optimale et un contraste de phase inchangé, contrairement au Mowiol qui gêne l'observation en contraste de phase.

2.1.8 *Observation de l'incorporation de la fibronectine sur des cellules vivantes*

Pour observer l'incoporation de fibronectine dans les contacts focaux repérés par la vinculine-GFP, nous avons utilisé de la fibronectine marquée par l'Alexa-546, fournie par le groupe de Viola Vogel, et suivi un protocole inspiré de celui décrit par Barker *et al.* (Barker *et al.*, 2005) :

1. Jour 0 : transfecter les cellules avec la construction codant pour la vinculine-GFP.
2. Jour 1 : resuspendre les cellules sur les lamelles d'observation dans du DMEM + 5% de BCS (dans lequel la fibronectine d'origine bovine a été remplacée par de la fibronectine d'origine humaine (Sigma, F0895)). 5 à 8 heures plus tard, remplacer le milieu par du DMEM sans sérum.
3. Jour 2 : Observation les échantillons sous microscope. Ajouter 2.5 μg/mL de fibronectine humaine marquée par l'Alexa-546 (pour suivre l'incorporation) et 10 μM de nocodazole (pour induire la croissance des contacts focaux).

2.1.9 *Application de forces*

L'application de forces sur les cellules à été réalisée à l'aide de micropipettes comme Riveline *et al.* (Riveline *et al.*, 2001). Ce sont des capillaires de verre (Clark Electromedical Instruments, GC100F-10) étirés à l'aide d'une étireuse de pipettes à filament (Sutter Instruments, P97). Les capillaires étirés ont une constante de raideur de l'ordre de 1 nN/μm au niveau de la pointe. Les micropipettes sont donc suffisamment souples pour ne pas

casser lorsqu'on les appuie sur la lamelle de verre, mais suffisamment rigides pour exercer des forces de quelques nN sur les cellules. Contrairement à Riveline *et al.*, les micropipettes n'ont reçu aucun traitement de surface. Un micromanipulateur (Sutter Instrument, MP-285) a été utilisé pour déplacer la micropipette.

L'application de forces a été réalisée de la façon suivante : la pointe de la micropipette est appuyée sur une zone sans cellules de la lamelle de verre au voisinage immédiat des contacts sur lesquels la force sera appliquée. On continue de descendre la micropipette pour la courber jusqu'à ce qu'elle vienne toucher la surface apicale des cellules. La pipette est alors déplacée vers l'intérieur de la cellule pour appliquer une contrainte de cisaillement sur la cellule.

2.2 Les réactifs

Ce paragraphe détaille les différents réactifs que nous avons ajouté au milieu de culture des cellules dans le but de modifier les propriétés du cytosquelette d'actine ou de la membrane plasmique.

2.2.1 Réactifs agissant sur le cytosquelette d'actine

2.2.1.1 *Y-27632*

Ce réactif est un inhibiteur de la voie de signalisation Rho-kinase (Uehata *et al.*, 1997). Utilisé à une concentration de 10 μM pendant 30 min, ce réactif permet d'inhiber la contractilité acto-myosine des cellules.

2.2.1.2 *Blebbistatine*

Ce réactif est un inhibiteur de l'activité ATPase de la myosine II (Straight *et al.*, 2003). Utilisé à une concentration de 100 μM pendant 30 min, ce réactif permet également d'inhiber la contractilité acto-myosine des cellules.

2.2.1.3 *Nocodazole*

Ce réactif est un agent dépolymérisant des microtubules, également connu pour activer la voie de signalisation contrôlée par Rho (Bershadsky *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1998). Utilisé à une concentration de 10 μM, ce réactif permet d'augmenter la contractilité acto-myosine. Il a été utilisé pendant des durées allant de 30 à 180 minutes.

2.2.1.4 *Latrunculine A*

Ce réactif est un agent dépolymérisant des filaments d'actine (Coue *et al.*, 1987). Son mode d'action est de séquestrer les monomères d'actine. Utilisé à une concentration de 1 μM pendant 15 minutes, ce réactif fait passer la concentration d'actine libre dans les cellules sous la concentration critique des filaments d'actine, ce qui entraîne la dépolymérisation du cytosquelette d'actine.

2.2.2 *Réactifs agissant sur la membrane plasmique*

2.2.2.1 *Acide déoxycholique (DOA[6])*

Ce réactif est un lipide qui vient s'intercaler dans la membrane plasmique des cellules, diminuant ainsi la tension membranaire. Utilisé à une concentration de 0.4 mM, ce réactif permet de diminuer la tension de membrane de 25% (Raucher et Sheetz, 1999).

2.3 *Montages optiques*

2.3.1 *Matériel*

Les cellules sont observées sur un microscope Olympus inversé IX70 placé dans une enceinte régulée à 37°C (Air-Therm, World Precision Instruments) pour l'observation des cellules vivantes. Selon les expériences, 3 objectifs à immersion à huile sont utilisés :

- PlanApo 60x NA=1.4 Ph3

- UPlanFl 100x NA=1.3 Ph3
- PlanApo 60x TIRFM NA=1.45

Selon le type d'images acquises, 3 sources de lumière sont utilisées :

- une source de lumière blanche pour les images de contraste de phase.
- une lampe à arc à vapeur de mercure pour les images d'épifluorescence (jonctions adhérentes).
- un laser à Argon (177-G02, 395 mW ; Spectra-Physics) pour les images en ondes évanescentes (contacts focaux).

Le temps d'exposition est régulé à l'aide d'une roue à filtres (Lambda 10-2, Sutter Instruments) utilisée en tant qu'obturateur sur la trajet optique. Différents jeux de filtres (Omega, Melles Griot) sont utilisés en fonction des fluorophores observés. Les images sont acquises à l'aide d'une caméra CCD 12 bits refroidie à -15°C (MicroMAX-1300YHX, Ropper Scientific) pilotée par le logiciel d'acquisition Metamorph (Universal Imaging).

2.3.2 *Microscopie par ondes évanescentes*

L'observation de contacts focaux à l'aide de protéines fusionnées à la GFP se fait généralement par épi-fluorescence. Cependant le contraste des images est fortement affaibli par la superposition de la fluorescence provenant des fluorophores présents dans les plans successifs du volume d'excitation (voir figure 2.1 B). En effet, le faisceau excitateur traverse l'ensemble de l'échantillon et tous les fluorochromes sont excités. L'idée de la microscopie par ondes évanescentes est de n'exciter que les fluorochromes présents au niveau des contacts focaux. Ceci peut être réalisé par l'intermédiaire d'une onde évanescente à l'interface verre-cellule dont le faible pouvoir de pénétration permettra une excitation sélective des fluorochromes au voisinage de la surface.

Le montage à ondes évanescentes que nous utilisons est inspiré de celui décrit par Tokunaga *et al.* (Tokunaga *et al.*, 1997). Dans notre montage, l'onde évanescente est réalisée grâce à un objectif à forte ouverture numérique qui permet un angle d'incidence du rayon laser, au niveau de l'interface lamelle-échantillon, supérieur à l'angle critique de réflexion totale (voir figure 2.1 A). La profondeur de pénétration de l'onde évanescente peut ensuite être réglée en jouant sur l'angle d'incidence du faisceau. Lorsqu'on reste

juste au-dessus de l'angle critique, l'onde évanescente a une longueur caractéristique de pénétration de l'ordre de la centaine de nanomètres. Cela nous convient donc parfaitement pour n'éclairer que les protéines fluorescentes présentes dans les contacts focaux. On estime en effet qu'elles se trouvent au plus à quelques centaines de nanomètres de l'interface. Le signal obtenu possède un contraste beaucoup plus important permettant de repérer des contacts invisibles en épi-fluorescence (voir figure 2.1 C).

2.4 Mesures

2.4.1 Mesures d'aire et d'intensité de fluorescence

Un problème inhérent à la microscopie de fluorescence utilisant des protéines fusionnées à la GFP est le photoblanchiment des fluorophores. L'intensité du signal décroît alors en fonction du temps d'exposition qu'ont subit les fluorophores. Or, la densité de protéines marquées présentes en un endroit est directement proportionelle à la quantité de fluorophores et donc, à l'intensité du signal détecté par la caméra. Pour évaluer la quantité de protéines fluorescentes, il faut tenir compte du photoblanchiment et corriger le signal de façon appropriée.

Pour cela, on va faire l'hypothèse que la quantité totale de protéines fluorescentes reste à peu près constante pendant la durée de l'experience. La comparaison de l'intensité moyenne du signal de fluorescence sur une cellule entière à un temps t ($I_{cell}(t)$) par rapport à l'intensité moyenne au temps initial ($I_{cell}(0)$) nous indique quelle proportion de fluorophores ont été blanchis au temps t. Cette comparaison nécessite qu'on ne tienne compte que du signal provenant de la cellule et pas du signal de bruit provenant de la caméra elle-même. On mesure l'intensité moyenne de bruit $I_{bruit}(t)$ sur une zone sans cellule. À l'intensité moyenne de fluorescence mesurée sur une cellule ($I_{cell-mesure}(t)$) on doit donc retrancher l'intensité moyenne de bruit.

$$I_{cell}(t) = I_{cell-mesure}(t) - I_{bruit}(t) \tag{2.1}$$

La proportion de fluorophores non-blanchis au temps t est donc $\frac{I_{cell}(t)}{I_{cell}(0)}$. L'intensité de fluorescence en un point d'un contact à un instant donné ($I_{contact}(X, Y, t)$) peut alors être

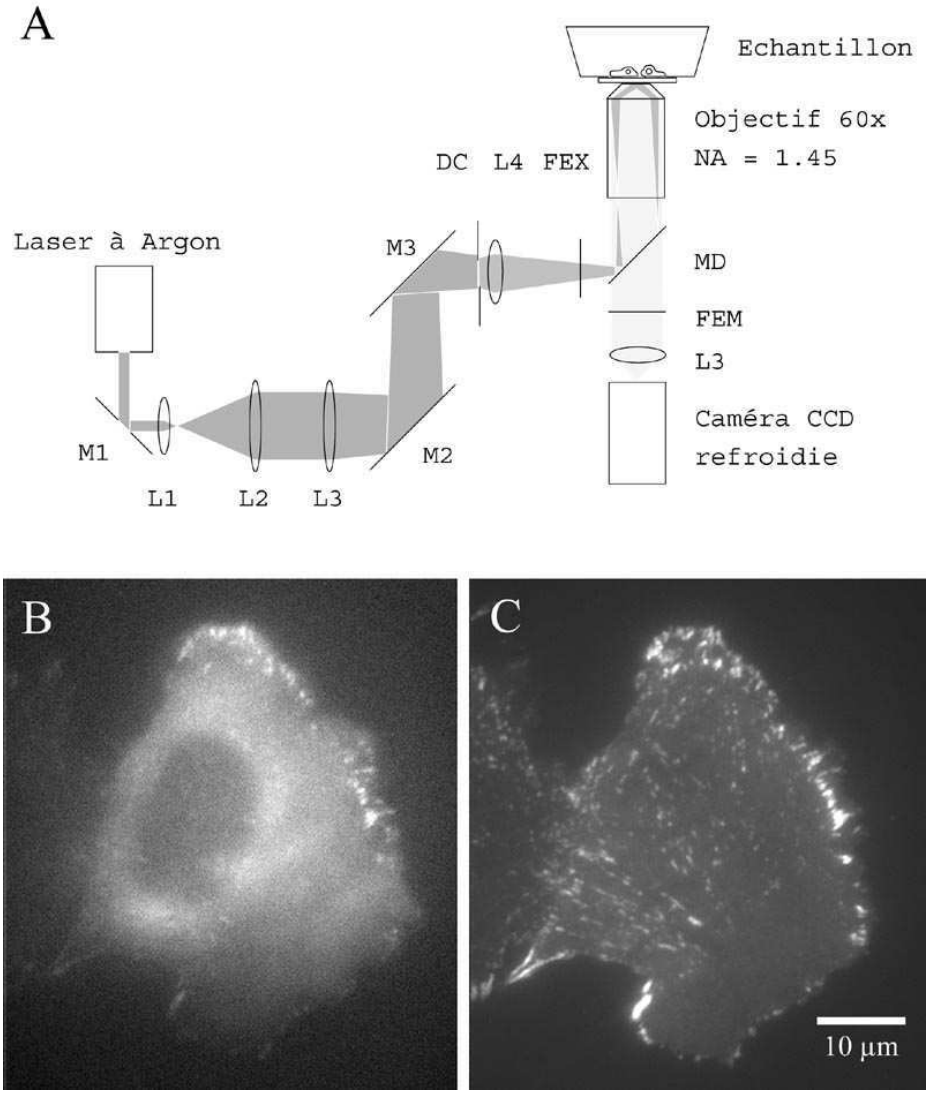


Fig. 2.1: **(A)** Schéma du trajet optique utilisé dans le montage en ondes évanescentes. Le faisceau laser est élargi à l'aide d'un télescope (lentilles L1 et L2), puis focalisé à l'aide des lentilles L3 et L4 dans le plan focal arrière de l'objectif pour obtenir un faisceau parallèle en sortie d'objectif. Les miroirs M2 et M3 permettent d'aligner le faisceau suivant l'axe optique de l'objectif. Le déplacement du miroir M3 suivant la direction de la flèche permet de décaler le faisceau en restant parallèle à l'axe optique, ce qui conduit à incliner le faisceau parallèle en sortie d'objectif, jusqu'à l'obtention d'une réflexion totale et la formation d'ondes évanescentes. M1 : miroir ; DC : diaphragme de champ ; FEX : filtre d'exitation ; FEM : filtre d'émission ; MD : miroir dichroïque. **(B-C)** Comparaison d'images d'une même cellule en épifluorescence (B) et en ondes évanescentes (C).

calculée à partir de l'intensité du signal mesuré en ce point du contact ($I_{contact-mesure}(X, Y, t)$) à laquelle on soustrait l'intensité moyenne de bruit à cet instant

$$I_{contact}(X, Y, t) = I_{contact-mesure}(X, Y, t) - I_{bruit}(t)$$

Cette intensité est alors compensée pour tenir compte du photoblanchiment :

$$I_{contact-reelle}(X, Y, t) = \frac{I_{contact}(X, Y, t) \times I_{cell}(0)}{I_{cell}(t)} \tag{2.2}$$

$I_{contact-reelle}(X, Y, t)$ est directement proportionnelle à la quantité de protéines fluorescentes en ce point et sera utilisée pour quantifier un recrutement ou un désassemblage par exemple. Cette méthode de correction de la fluorescence est également utilisée pour corriger les séquences acquises sur les contacts focaux en croissance avant de tracer les kymographes (voir A.3).

Les mesures d'aire et d'intensité de fluorescence des contacts peuvent se faire simultanément sur les images corrigées. L'application d'un seuillage définit les contours des contacts observés. Le logiciel d'acquisition mesure alors l'aire des contacts et leur intensité intégrée sur leur surface.

2.4.2 Traitement des données

Les données provenant des analyses d'images sont récupérées et traitées par Origin 6.0 (Microcal Software). Les incertitudes présentées sont celles données par ce logiciel avec un taux de confiance P=0.95 (Protassov, 2002).

3

Formation des jonctions adhérentes

3.1 Morphologie des contacts et nomenclature

3.1.1 Morphologie

Les deux types cellulaires que nous avons utilisés dans cette étude (EAhy et CHO VE), assemblent des jonctions adhérentes de VE-cadhérine suivant deux morphologies distinctes :

- les contacts peuvent être des *lignes*, situés dans le plan perpendiculaire à la lamelle dans lequel se situe l'interface de contact entre cellules. Cette morphologie de jonction est habituellement décrite comme formant une ceinture de contact tout autour des cellules.
- les contacts *doigts* se trouvent dans le plan parallèle à la lamelle mais perpendiculaires à l'interface entre les cellules (voir figure 3.1 A-B). De plus, ils sont situés exclusivement d'un côté de l'interface entre les deux cellules.

La symétrie entre deux cellules formant des *doigts* est donc brisée deux fois : les *doigts* sont des objets fortement anisotropes et localisés asymétriquement par rapport à l'interface entre deux cellules *a priori* identiques. Nous nous intéresserons uniquement à cette morphologie dans le reste du chapitre.

3.1.2 Nomenclature

Pour que les cadhérines soient assemblées d'un côté de l'interface entre cellules, il faut qu'une des deux cellules projette de la membrane dans ou sur la cellule voisine. Alors que certaines études privilégient l'hypothèse d'une interdigitation de filopodes appartenant

aux deux cellules voisines pour expliquer la formation des *doigts* (Vasioukhin *et al.*, 2000), l'observation d'une monocouche de cellules EAhy par microscopie électronique à balayage révèle l'existence de lamellipodes envoyés par certaines cellules *sur* leurs cellules voisines (voir figure 3.1 H). Ce résultat nous incite à utiliser la nomenclature suivante afin de distinguer les deux cellules participant à l'établissement de la jonction adhérente de type *doigt* :

- la cellule projetant le lamellipode sur l'autre cellule sera appelée cellule *donneuse*,
- la cellule recevant le lamellipode de la cellule donneuse sera appelée cellule *receveuse*.

3.1.2.1 *Distinction entre cellule donneuse et cellule receveuse*

Cette nomenclature revient à chercher à savoir quelle cellule est sous l'autre au niveau de la zone de recouvrement. Rien n'empêche *a priori* la cellule donneuse de projeter un lamellipode **sous** la cellule receveuse. En effet, la profondeur de recouvrement est suffisamment faible pour que les contacts adhésifs entre une cellule et le substrat ne soient pas rompus par l'intrusion d'un lamellipode d'une cellule voisine sous cette cellule. Cependant, comme nous le verrons à la section 3.2.3, l'activation de la contractilité acto-myosine de la cellule receveuse entraîne la formation de *doigts* très longs qui ne peuvent exister qu'au dessus de la cellule receveuse et non entre cette cellule et le substrat. La microscopie électronique à balayage permet de déterminer quelle cellule est au-dessus de l'autre au niveau d'une zone de recouvrement entre cellules donneuse et receveuse. Cependant, il est difficile d'utiliser couramment à la fois la microscopie de fluorescence et la microscopie électronique sur un même échantillon.

Dans la plupart des cas, nous avons utilisé le contraste de phase pour distinguer la cellule donneuse de la cellule receveuse. Le contraste de phase permet de distinguer nettement le contour cellulaire lorsque les cellules sont isolées ou que leur densité est suffisamment faible. On utilise alors des arguments de morphologie du contour cellulaire pour faire la distinction entre cellules donneuse et receveuse. La croissance de lamellipodes et de filopodes se caractérise par un bord cellulaire assez fluctuant et la présence de déformations semblables à des filopodes colocalisant avec les *doigts* observés en fluorescence est caractéristique d'une cellule donneuse (voir les cellules de droite sur les figures 3.1 C, D et F, G). En revanche, un bord cellulaire très « lisse » au niveau d'une jonction adhérente appartient donc à une cellule receveuse (voir les cellules de gauche sur les figures 3.1 C,

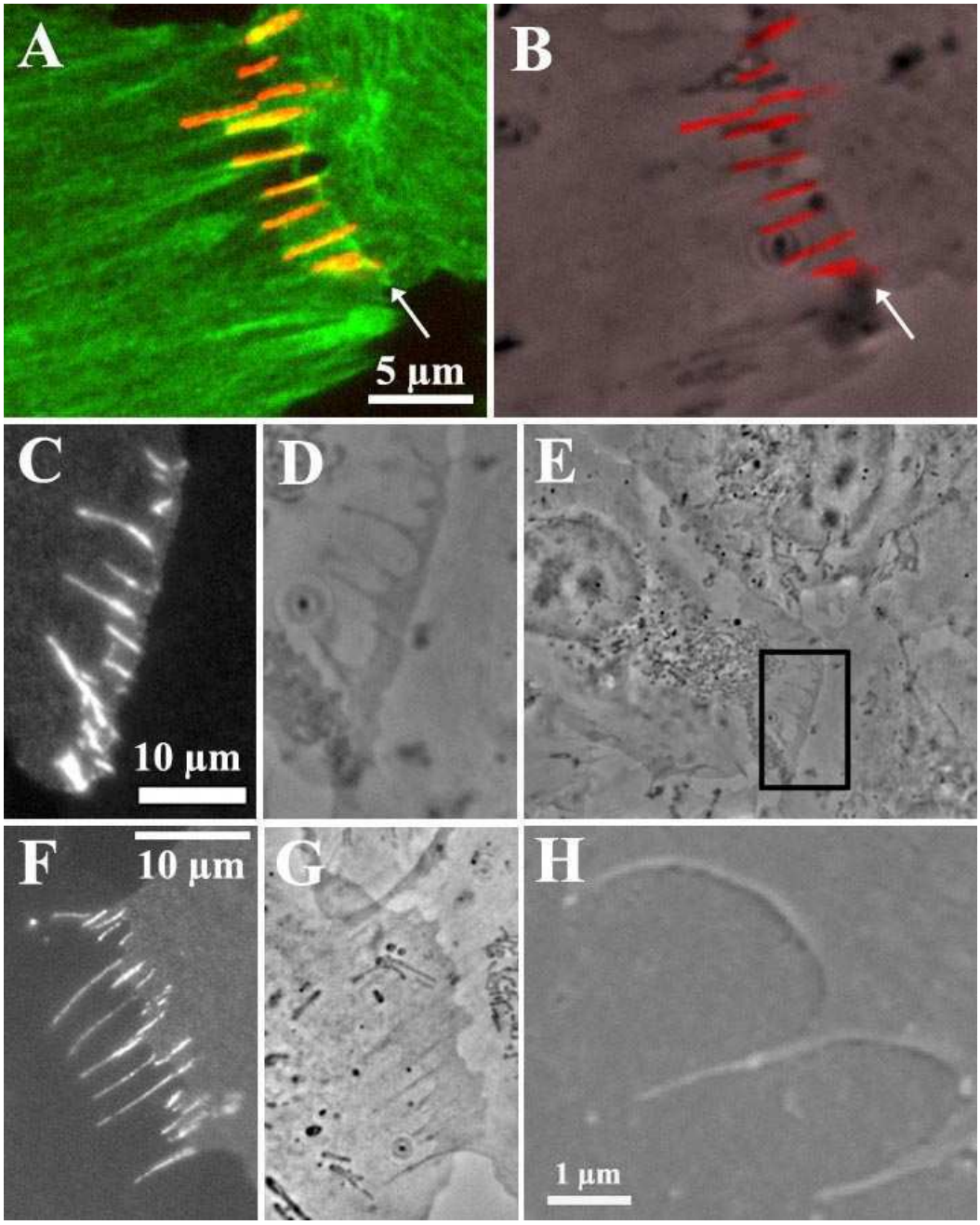


FIG. 3.1: ***Brisure de symétrie des jonctions adhérentes***. *(A-B) Les* doigts *de VE-cadhérine (rouge, marquage) sont assemblés d'un côté de l'interface entre cellules (B), repérée par les flèches. La cellule donneuse assemble des fibres* de stress *se terminant sur les* doigts *(A, vert, marquage de l'actine par la phalloïdine). (C-E) La cellule receveuse exprime la VE-cadhérine-GFP. Les* doigts *observés en fluorescence sur la cellule receveuse (C) colocalisent avec les protrusions type filopodes envoyés par la cellule donneuse (cellule de droite de l'image D, contraste de phase, zoom de la partie encadrée de E). (F-G) La cellule donneuse exprime la VE-cadhérine-GFP. Les* doigts *observés en fluorescence (F) colocalisent avec les protrusions de la cellule donneuse (G). (H) La cellule donneuse projette un lamellipode sur la cellule receveuse (microscopie électronique à balayage).*

D et F, G). Nous sommes néanmoins conscients que le rôle de toutes les cellules ne peut pas être déterminé ainsi. Un marquage du cytosquelette d'actine donne alors des indices supplémentaires pour faire la distinction. De même, la cortactine permet de déterminer quelle cellule est la cellule donneuse puisque cette protéine se localise majoritairement au bord du lamellipode (voir figure 3.2, (Wu et Parsons, 1993)).

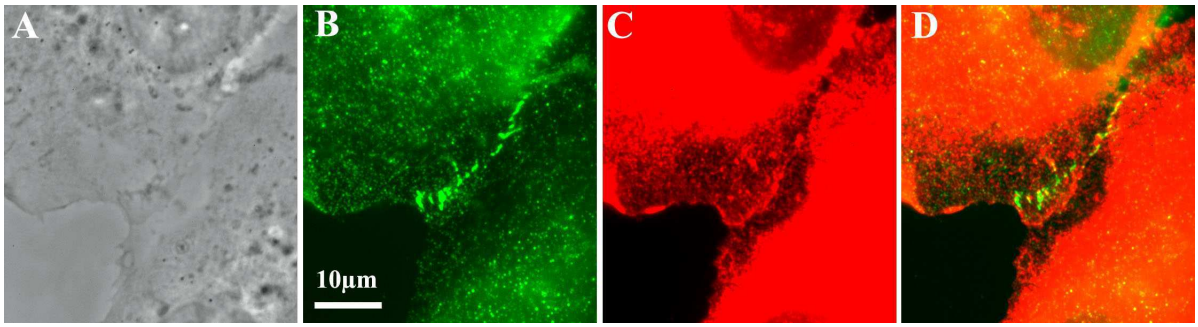


Fig. 3.2: La cellule donneuse (haut gauche) présente un marquage de cortactine caractéristique de lamellipode au bord cellulaire. Les contours cellulaires sont repérés sur l'image de phase (A). Le marquage de cortactine (rouge, C) colocalise avec le bord cellulaire de la cellule de gauche. Cette cellule est déterminée « cellule donneuse » par le profil des *doigts* de VE-cadhérine (vert, B) qu'elle forme avec la cellule de droite. La figure D superpose les signaux de cadhérine avec ceux de cortactine.

Lorsque la densité est plus élevée et que les cellules forment une monocouche, la plus grande épaisseur des cellules gêne une observation précise des contours cellulaires par contraste de phase. Cependant, l'interface principale entre cellules voisines est visible et la position des *doigts* observés en fluorescence par rapport à cette interface permet de distinguer la cellule receveuse (celle du même côté de l'interface que les *doigts*) de la cellule donneuse (celle de l'autre côté de l'interface par rapport aux *doigts*). La figure 3.1 B illustre ce cas.

Il faut noter dès à présent que cette nomenclature fait référence à des propriétés locales des deux cellules considérées et ne s'applique qu'au niveau de l'interface entre ces deux cellules, voire seulement sur une partie de cette interface. En effet, une cellule projetant un lamellipode pour établir des *doigts* pourra elle-même recevoir un lamellipode projeté par une de ses cellules voisines sur une autre interface.

3.1.3 Validité des approches de fluorescence

Afin de s'assurer que les cadhérines sont assemblées par les deux cellules et non juste piégées au voisinage de faisceaux de filaments d'actine, nous avons observé des contacts

entre cellules dont une seulement exprime des cadhérines fluorescentes. Pour cela, nous avons utilisé des transfections transitoires de cellules Eahy à confluence avec la construction VE-Cadhérine-GFP. Les transfections transitoires sont assez peu utilisées dans l'étude de monocouches cellulaires puisqu'elles ont l'inconvénient de ne transfecter qu'une petite proportion des cellules (autour de 10% avec le protocole que nous utilisons). Dans notre cas, cet inconvénient devient un avantage puisque nous cherchons justement à observer des jonctions adhérentes entre une cellule transfectée et une cellule non-transfectée. Une cellule exprimant des cadhérines fluorescentes va non seulement pouvoir être reconnue grâce aux jonctions adhérentes qu'elle forme, mais aussi par le fond de fluorescence provenant des cadhérines diffusant librement dans la membrane plasmique. Cette propriété nous permet alors d'être certains qu'une seule des cellules participant à la jonction adhérente repérée est transfectée avec le plasmide codant pour la cadhérine fluorescente. La figure 3.1 montre les différentes configurations possibles :

- la cellule *receveuse* est transfectée (voir figure 3.1 C-E),
- la cellule *donneuse* est transfectée (voir figure 3.1 F-G).

Le signal de fluorescence observé dans le cas d'une cellule donneuse transfectée (voir figure 3.1 F) montre bien que les cadhérines sont recrutées uniquement au niveau de la zone de recouvrement des deux cellules (voir figure 3.1 G). De plus, lorsque seule la cellule receveuse est transfectée, les *doigts* sont visibles en fluorescence (voir figure 3.1 C) et colocalisent avec les filopodes projetés par la cellule donneuse (voir figure 3.1 D-E). Ces deux résultats montrent que les jonctions adhérentes sont formées par l'association de cadhérines provenant des deux cellules en contact.

3.2 *Rôle de l'actine dans la formation des* doigts

Les cadhérines interagissant pour former une jonction adhérente sont liées au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire notamment des caténines. Cette liaison des cadhérines à l'actine est cruciale pour la formation des *doigts*. En effet, la suppression du lien à l'actine par l'utilisation de cadhérines tronquées ne pouvant plus se lier aux caténines empêche la formation des *doigts* au profit de *lignes* (Delanoe-Ayari, 2003). Puisque l'actine est fortement impliquée dans la formation des *doigts*, il est nécessaire de regarder précisément les propriétés du réseau d'actine dans chaque cellule participant au contact.

3.2.1 *Structure du réseau d'actine au niveau des* doigts

Un marquage d'actine au niveau des jonctions adhérentes fait apparaître une colocalisation de faisceaux d'actine avec les *doigts*. Une observation détaillée de la structure du réseau d'actine fait apparaître quelques différences entre cellules donneuses et receveuses. En effet, le réseau d'actine de la cellule donneuse est assez homogène et rappelle une structure du réseau d'actine caractéristique d'un lamellipode (cellule de droite sur la figure 3.1 A). Un marquage d'actine de la cellule receveuse montre quant à lui l'existence de faisceaux de filaments d'actine se terminant au niveau des *doigts* révélés par un marquage de la VE-cadhérine (cellule de gauche sur la figure 3.1 A). Ces faisceaux sont morphologiquement semblables aux fibres *de stress* documentées au niveau de contacts focaux et qui se terminent en particulier au niveau de ceux-ci.

L'observation du cytosquelette d'actine dans un lamellipode libre, c'est-à-dire qui n'est en contact avec aucune cellule, vient compléter cette première approche. Un marquage d'actine en fluorescence montre que le réseau d'actine n'est pas complètement homogène mais présente des faisceaux denses de filaments d'actine proches du bord cellulaire (voir figure 3.3 C-D, (Svitkina *et al.*, 2003; Svitkina *et al.*, 1995)). Ces faisceaux denses sont également observés sur des images de microscopie électronique de répliques de cytosquelette d'actine d'un bord libre cellulaire (voir figure 3.3 A) et correspondent aux filopodes observés en contraste de phase. Les images de microscopie électronique de répliques au niveau d'une zone de contact entre cellules montre l'existence de faisceaux de filaments d'actine très semblables à ceux observés sur un bord libre (voir figure 3.3 B). Ces faisceaux sont régulièrement espacés avec la même périodicité que les *doigts* riches en cadhérines des jonctions mûres et s'étendent d'une cellule jusque sur la cellule voisine.

Cette différence forte observée dans l'organisation du cytosquelette d'actine justifie bien la distinction faite entre cellules donneuses et receveuses à partir d'observations de contraste de phase et de microscopie électronique à balayage. Les zones denses en actine à l'intérieur du lamellipode pourraient donc servir de précurseurs à la formation des futures jonctions adhérentes. Les cadhérines diffusant dans la membrane plasmique peuvent être temporairement piégées au niveau de ces structures, augmentant localement la concentration de cadhérines et initiant la jonction adhérente en interagissant avec les cadhérines de la cellule voisine. Dans ce schéma, la géométrie de la jonction adhérente est imposée par la géométrie des précurseurs d'actine présents dans le lamellipode de la cellule donneuse.

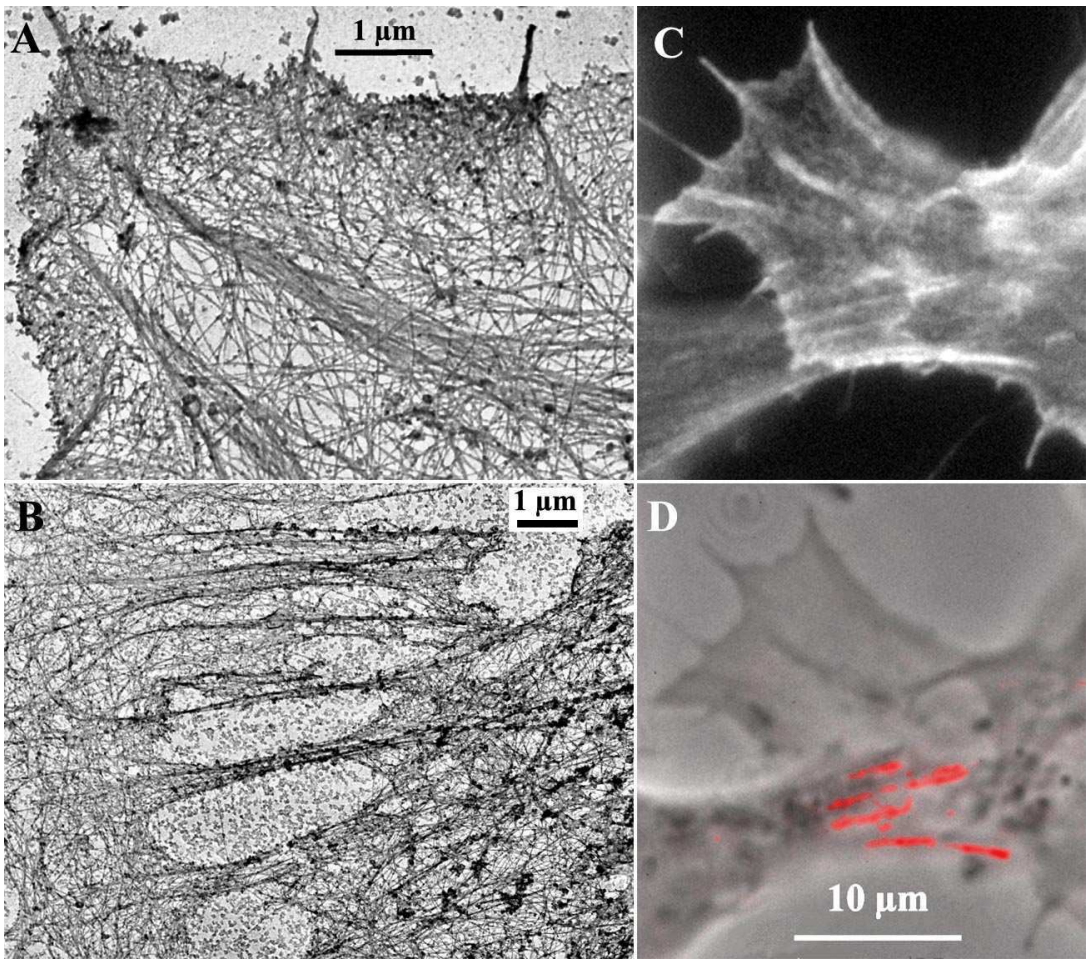


FIG. 3.3: ***Les bords libres présentent des faisceaux d'actine semblables à ceux colocalisant avec les* doigts*.*** ***(A-B)*** *Répliques de cytosquelette d'actine observées par microscopie électronique. Les faisceaux d'actine sont présents au bord cellulaire (A) et l'interface cellule-cellule (B).* ***(C-D)*** *Un marquage d'actine (C) montre l'existence de faisceaux similaires au bord de la cellule (vu par fluorescence (C) et contraste de phase (D)) et colocalisés aux* doigts *(D, en rouge).*

3.2.2 Cellules donneuses

Afin de tester cette hypothèse de précurseurs imposant la géométrie du contact, nous nous sommes d'abord intéressés aux bords libres cellulaires. L'observation en contraste de phase de cellules isolées est très informative sur la structure et la dynamique des bords libres. Les filopodes et les lamellipodes croissent et se rétractent périodiquement, à la fois spatialement et temporellement. Cette dynamique est régulée par les propriétés de polymérisation du cytosquelette d'actine. L'idée que nous avons suivie est la suivante : si nous sommes capables de modifier les propriétés de polymérisation de l'actine, la dynamique et la structure du réseau d'actine des bords libres sera changée et la formation des jonctions adhérentes pourra être modifiée également.

3.2.2.1 *La surexpression de protéines liées à l'actine ne modifie pas les* doigts

Plusieurs protéines ont été identifiées *in vitro* comme modifiant fortement la polymérisation d'actine. En particulier, la cofiline et les protéines « cappantes » comme la gelsoline augmentent la vitesse de polymérisation des filaments d'actine (Pantaloni *et al.*, 2001). VASP et WASP vont quant à elles agir sur les propriétés de branchement du complexe Arp2/3 (voir INTRO). Nous avons surexprimé séparément la gelsoline, un mutant constitutivement actif de la cofiline (Arber *et al.*, 1998), VASP (Reinhard *et al.*, 1992), N-WASP et le domaine VCA de N-WASP responsable de l'activation d'Arp2/3 (Miki *et al.*, 1996; Miki *et al.*, 1998), dans les cellules EAhy et CHO VE afin de modifier la polymérisation d'actine *in vivo*. L'organisation du cytosquelette d'actine a été fortement modifiée par les différentes transfections (voir figure 3.4 A-F). En particulier, les cellules surexprimant la gelsoline et la cofiline présentent beaucoup moins d'actine polymérisée que les cellules non-transfectées (voir figure 3.4 A-B, D-E), alors que les cellules surexprimant le domaine VCA forment un réseau d'actine très dense et homogène (voir figure 3.4 C, F), résultat de la nucléation importante de filaments d'actine dans tout le cytoplasme et non seulement au voisinage de la membrane. En revanche, aucun effet significatif sur la morphologie des *doigts* n'a été relevé (voir figure 3.5 E-G) : les distributions de longueurs et de périodicités des *doigts* observés sur ces cellules sont tout-à-fait semblables à celles relevées sur des monocouches standards (voir table 3.1). Il faut noter que les cellules aussi bien donneuse que receveuse participant au contact sont transfectées et ont des niveaux d'expression similaires des protéines surexprimées (voir les figures 3.5 E-G). Cette configuration permet d'exclure qu'une cellule non transfectée participant au contact soit suffisante pour maintenir l'aspect habituel des *doigts*.

Ce résultat est surprenant dans le sens où les cellules transfectées avec ces protéines ont un cytosquelette d'actine visiblement très désorganisé, que la densité du réseau soit beaucoup plus faible ou beaucoup plus importante que dans les cellules non transfectées. La désorganisation du cytosquelette d'actine doit perturber fortement les propriétés de contractilité acto-myosine. Cependant, une conservation du réseau d'actine au niveau du cortex n'est pas à exclure malgré les surexpressions de ces protéines et une tension due à ce cortex peut toujours exister et se substituer à la tension contractile. De plus, on peut imaginer que les voies de signalisation contrôlant la polymérisation d'actine soient suffisamment redondantes pour que, localement, la polymérisation d'actine soit peu modifiée et qu'en particulier la dynamique de formation des lamellipodes et des filopodes reste peu

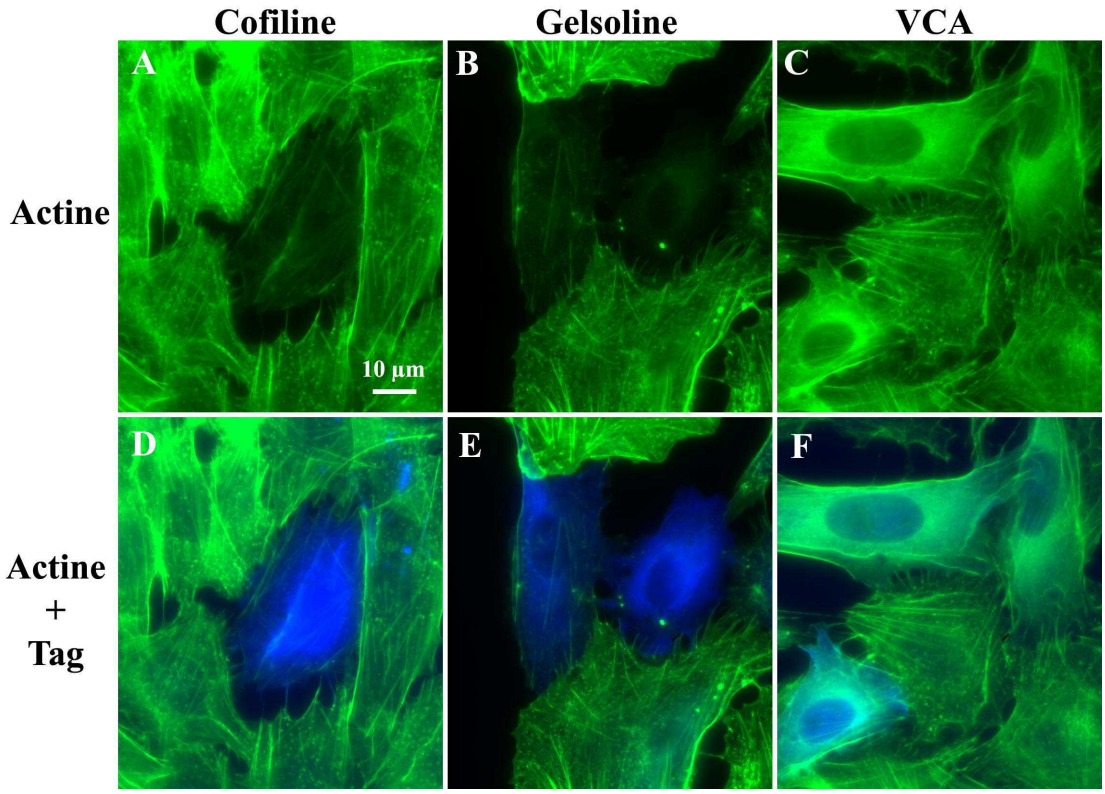


FIG. 3.4: **La surexpression de protéines associées à l'actine désorganise le cytosquelette d'actine.** La transfection avec la cofiline (A,D) ou la gelsoline (B,E) diminue considérablement la densité d'actine alors que la transfection avec VCA (C,F) provoque une polymérisation dense et anarchique de l'actine. L'actine est représentée en vert et les cellules transfectées en bleu.

perturbée. En effet, la dynamique des bords libres de cellules surexprimant ces protéines est restée qualitativement similaire à celle des cellules non-transfectées. Le point commun principal entre les réseaux d'actine dans les différentes conditions et le réseau d'actine des cellules contrôles est la présence aux bords libres de précurseurs d'actine (voir figure 3.5 A-C).

3.2.2.2 *La surexpression de Rac constitutivement actif fait disparaître précurseurs et* doigts

Une seule condition expérimentale en transfection a permis de changer radicalement la morphologie des jonctions adhérentes. Il s'agit de la surexpression d'un mutant constitutivement actif de la petite GTP-ase Rac (Helfman *et al.*, 1999). La morphologie générale des cellules surexprimant Rac constitutivement actif est particulière : les cellules étalées sont très isotropes (forme d'oeuf sur le plat) et possèdent un lamellipode fin faisant gé-

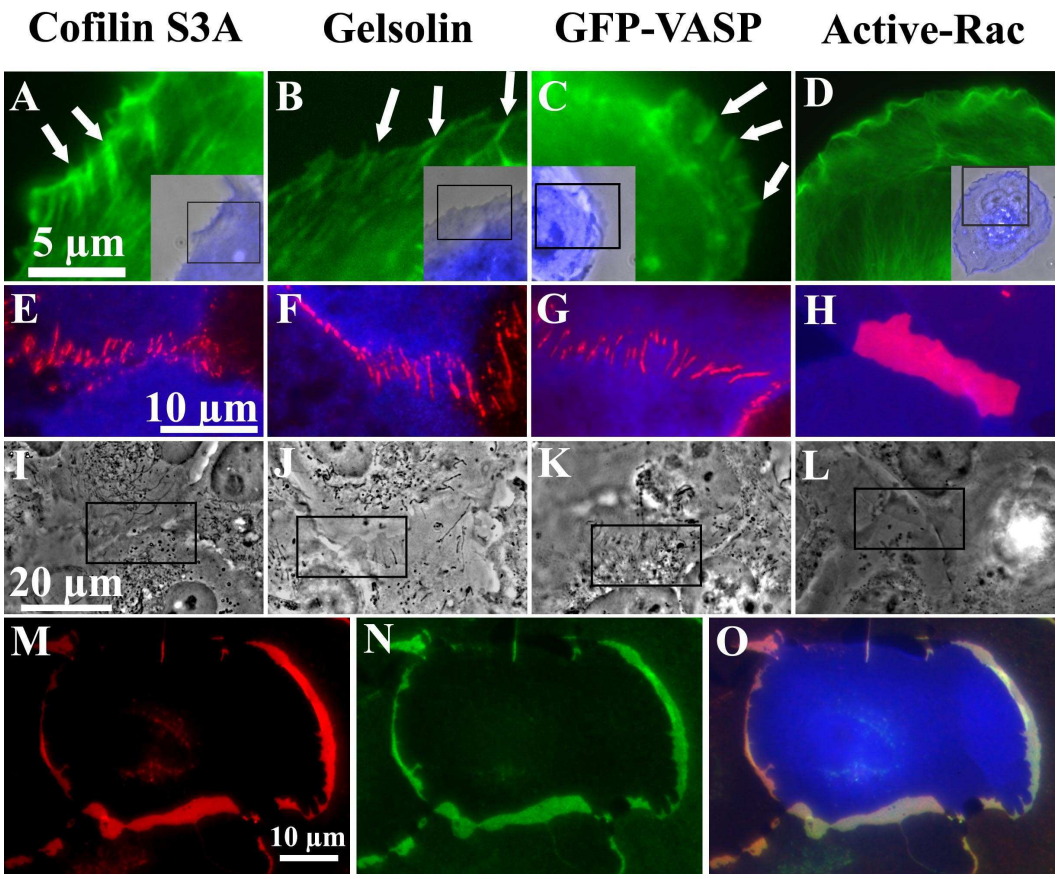


Fig. 3.5: **La géométrie de l'actine au bord libre impose la géométrie du contact.** La transfection avec des protéines associées à l'actine (cofiline en A,E,I ; gelsoline en B,F,J et VASP en C,G,K) n'empêche pas la formation de faisceaux d'actine au bord libre (voir les flèches sur les marquages d'actine, vert, en A-C ; les encarts montrent le signal de contraste de phase superposé au marquage de la protéine en bleu). Aucune modification de la morphologie des jonctions n'est alors repérée (marquages de VE-cadhérine E-G, rouge ; la couleur bleue signale les cellules transfectées ; ces régions correspondent aux zones encadrées sur les images de contraste de phase I-K). En revanche, la transfection des cellules avec Rac constitutivement actif conduit à la disparition des *doigts* au profit de *nappes* continues de cadhérines (H), qui colocalisent avec la β-caténine (M) et l'actine (N-O). Le marquage d'actine d'une cellule transfectée avec Rac constitutivement actif ne révèle aucun précurseur d'actine (D).

néralement le tour de la cellule. Lorsqu'au moins une des cellules formant des jonctions adhérentes surexprime Rac constitutivement actif, les morphologies habituelles de jonctions adhérentes (*lignes* et *doigts*) ne sont plus observées en fluorescence au profit de *nappes* continues de VE-cadhérines s'étendant sur toute la surface de recouvrement entre les deux cellules (voir figure 3.5 H). Ces *nappes* sont également riches en β-caténine et en actine (voir 3.5 M-O) et donc très semblables en composition aux jonctions adhérentes plus « classiques ». Comment la surexpression de Rac constitutivement actif permet-elle d'empêcher la formation de doigts ? Le marquage de l'actine sur des cellules isolées surexprimant Rac constitutivement actif montre une modification significative de la structure du

EAhy

Condition	Longueur (μm)	n	N	Période (μm)	n	N
Contrôle	1.7 ± 0.1	119	6	1.3 ± 0.1	103	6
Gelsoline	1.7 ± 0.2	25	2	1.3 ± 0.2	21	2
Cofiline-S3A	2.0 ± 0.2	34	3	1.4 ± 0.2	29	3
VCA	1.9 ± 0.1	92	4	1.4 ± 0.1	84	4
N-WASP-GFP	1.7 ± 0.2	26	2	1.4 ± 0.2	23	2
VASP	1.7 ± 0.2	29	2	1.2 ± 0.2	23	2
Blebbistatine				1.4 ± 0.2	40	2
DOA	1.7 ± 0.2	153	8			

CHO VE

Condition	Longueur (μm)	n	N	Période (μm)	n	N
Contrôle	1.5 ± 0.2	73	2	1.0 ± 0.1	50	2
Gelsoline	1.5 ± 0.2	13	1	1.0 ± 0.2	12	1
Cofiline-S3A	1.9 ± 0.4	18	1	1.0 ± 0.2	16	1
VCA	1.9 ± 0.1	92	4	1.0 ± 0.1	31	2
Blebbistatine				1.1 ± 0.1	50	1

TAB. 3.1: *Distributions de longueurs de* doigts *et de distances entre* doigts *quand différentes protéines associées à l'actine sont surexprimées dans des cellules EAhy et CHO VE, ainsi qu'en présence de blebbistatine et d'acide déoxycholique (DOA). Les statistiques ont été réalisées à partir de la mesure sur n* doigts *appartenant à N cellules.*

cytosquelette d'actine au niveau des lamellipodes : les précuseurs d'actine n'existent plus dans les cellules surexprimant Rac constitutivement actif (voir figure 3.5 D). La présence d'un réseau d'actine dense et homogène tend donc à recruter les cadhérines sur une surface beaucoup plus grande que les *doigts*. En effet, la densité de fluorescence de marquages de VE-cadhérine au niveau de *nappes* sur des cellules transfectées Rac constitutivement actif est du même ordre que celle au niveau de *doigts* sur des cellules non-transfectées.

3.2.2.3 *La présence de précurseurs d'actine est nécessaire à la formation des* doigts

Il semble donc que la présence de précurseurs d'actine soit nécessaire à la formation

de *doigts*. Si cette hypothèse est juste, alors les précurseurs doivent exister avant la nucléation de la jonction adhérente et colocaliser avec les *doigts* naissant. Afin de tester cette hypothèse, nous avons observé la formation de jonctions adhérentes dans des cellules transfectées en actine-RFP et en VE-cadhérine-GFP. La nucléation et la croissance de jonctions adhérentes peut être provoquée en forçant la rupture des jonctions adhérentes et en permettant ensuite leur reformation (Delanoe-Ayari *et al.*, 2004b). La dépolymérisation du cytosquelette d'actine par la latrunculine A provoque la rétraction des cellules et la rupture de leurs contacts. Il suffit ensuite de remplacer le milieu de culture par du milieu sans latrunculine A pour permettre aux cellules de s'étaler à nouveau et de reformer les *doigts*. Nous avons pu observer que les précurseurs d'actine sont présents au niveau de la zone de recouvrement entre les cellules avant l'apparition du signal de fluorescence des cadhérines marquant la nucléation de la jonction adhérente (voir figure 3.6 A, C). Au moment de l'apparition des *doigts*, les précurseurs d'actine existent toujours dans le lamellipode de la cellule donneuse et colocalisent avec les *doigts* en croissance (voir figure 3.6 B, D).

Cette expérience confirme bien notre hypothèse, à savoir que la morphologie de *doigts* des jonctions adhérentes découle de la structure du lamellipode de la cellule donneuse au moment de la rencontre entre cellules voisines. En particulier, tant que les précurseurs d'actine sont présents dans le lamellipode de la cellule donneuse, les *doigts* peuvent se former.

3.2.3 Cellules receveuses

La structure du cytosquelette d'actine révèle que des fibres *de stress* se terminent au niveau des *doigts* dans les cellules receveuses (voir figure 3.1 A). Ce résultat suggère l'implication de la contractilité acto-myosine dans la formation des jonctions adhérentes.

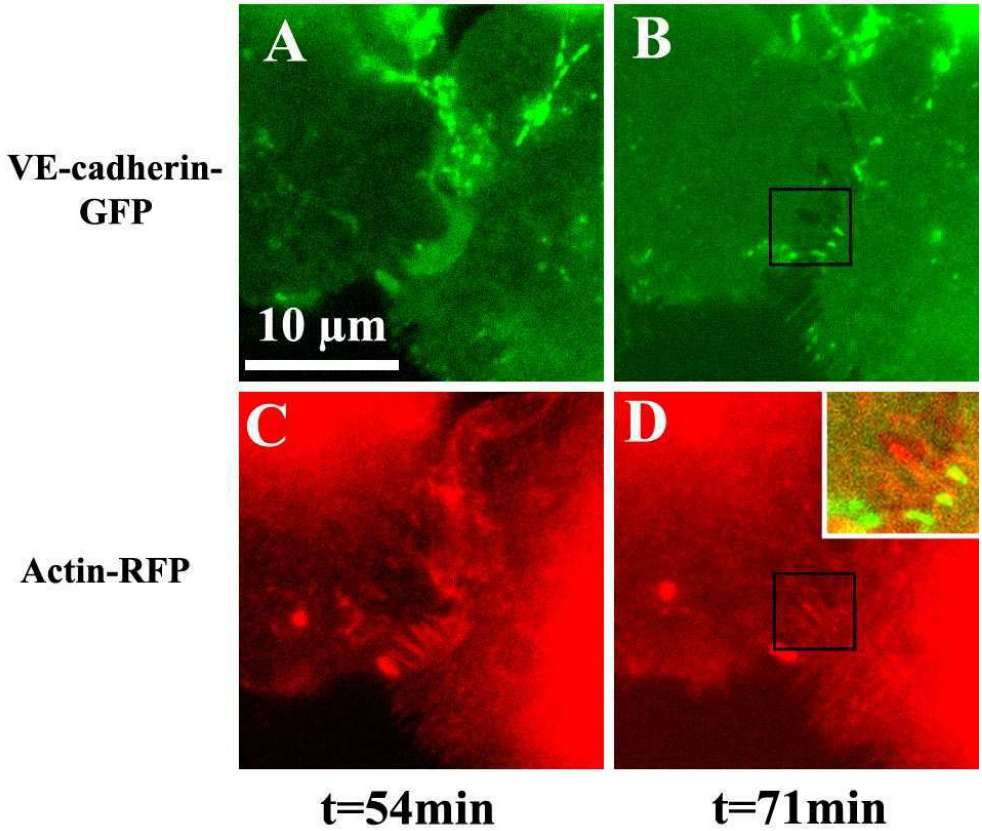
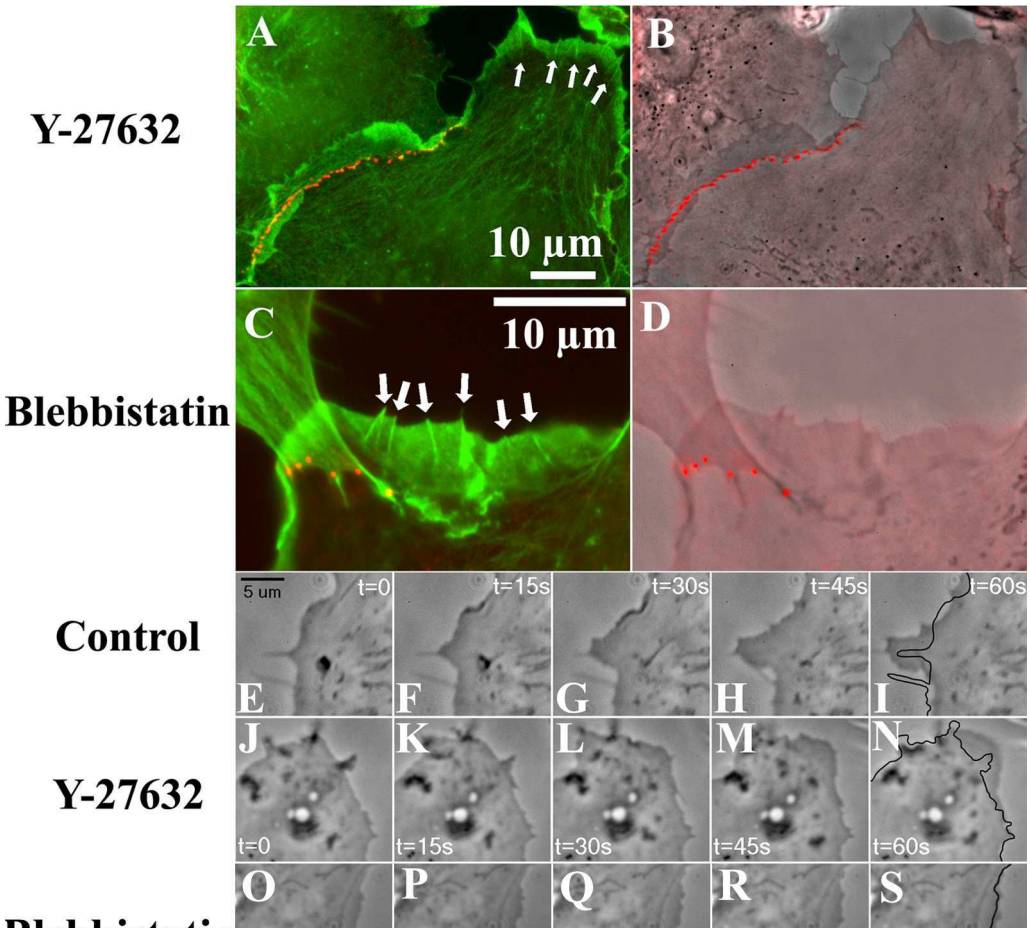


FIG. 3.6: ***La formation des précurseurs d'actine précède l'assemblage de la jonction adhérente.*** *Des cellules EAhy transfectées en VE-cadhérine-GFP et actine-RFP forment des jonctions adhérentes après incubation en latrunculine A (1µM) et lavage (t=0). À t=54 minutes, les* doigts *n'ont pas commencé à croître (fluorescence homogène en A) alors que des faisceaux d'actine sont visibles dans le lamellipode de la cellule donneuse (C). À t=71 minutes, des* doigts *sont apparus (B) et colocalisent avec les faisceaux d'actine assemblés par la cellule donneuse (D). L'insert en D montre la superposition des signaux de fluorescence de l'actine et des VE-cadhérines.*



3.2.3.1 *L'inhibition de la contractilité acto-myosine empêche la formation des* doigts

Pour tester cette hypothèse, nous avons commencé par utiliser deux inhibiteurs de la contractilité acto-myosine :

- Y-27632, un inhibiteur de la voie de signalisation Rho-kinase (Uehata *et al.*, 1997) ;
- la blebbistatine, un inhibiteur de l'activité ATP-ase de la myosine II (Straight *et al.*, 2003).

Dans les deux cas, les *doigts* disparaissent et les jonctions adhérentes sont réduites à une suite de points régulièrement espacés (voir figures 3.7 A et C) avec la même période que les *doigts* dans les monocouches standard (voir Table 3.1). La morphologie des cellules en présence de ces inhibiteurs reste identique aux cellules contrôles. En effet, les précurseurs d'actine existent toujours dans les lamellipodes (voir flèches sur les figures 3.7 A et C). De plus, les cellules en contact conservent une zone de recouvrement (voir figures 3.7 B et D) et les jonctions ponctuelles se situent au bord de la cellule receveuse (cellules de gauche sur les figures 3.7 A-D).

La dynamique du bord libre cellulaire en présence de Y-27632 reste semblable qualitativement à la dynamique du bord d'une cellule contrôle (voir figure 3.7 E-N). Ce résultat montre que l'inhibition de la contractilité acto-myosine n'interfère pas, dans le cadre de notre hypothèse, avec les propriétés de polymérisation dynamique d'actine des cellules et en particulier des cellules donneuses. Seules les propriétés de la cellule receveuse intervenant dans la formation des jonctions adhérentes ont donc été affectées par l'inhibition de la contractilité acto-myosine. La présence des précurseurs d'actine n'est donc pas une condition suffisante à l'existence des *doigts*.

Cependant, il faut noter dans le cas de l'ajout de blebbistatine, que ce réactif fait disparaître presque totalement les fluctuations du lamellipode (voir figure 3.7 O-S) . Alors que dans le cas de Y-27632, seule la voie Rho-kinase est inhibée, la blebbistatine inhibe directement l'activité ATP-ase des myosines II. Cet effet peut éventuellement dépasser le simple cadre de la contractilité acto-myosine et interférer avec la polymérisation dynamique d'actine dans le lamellipode.

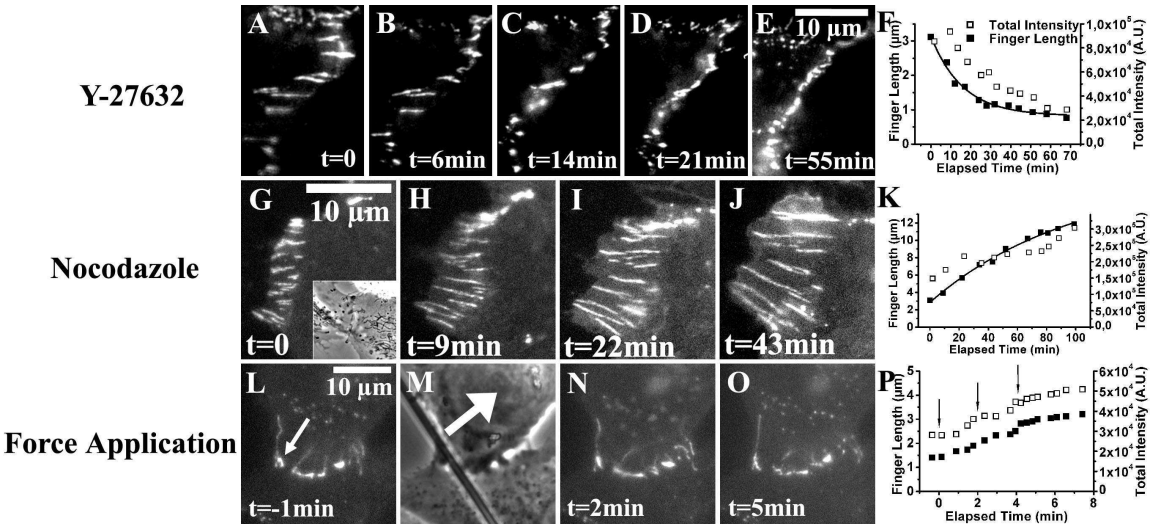


FIG. 3.8: ***La force appliquée par la cellule receveuse régule la taille des* doigts.** *Quand la contractilité acto-myosine est inhibée en présence de Y-27632, la disparition des* doigts *(VE-cadhérine-GFP, A-E) s'accompagne d'un désassemblage de la jonction adhérente (F). En revanche, l'augmentation de la contractilité en présence de nocodazole promeut la croissance des* doigts *(G-J) ainsi qu'un recrutement de cadhérines (K). Cette croissance des* doigts *peut être reproduite localement par application de force sur la cellule receveuse (L-O, la direction de la force est indiquée par la flèche en M) ; des cadhérines sont également recrutées au contact (P).*

Le suivi sur des cellules vivantes de la l'évolution de *doigts* en présence de Y-27632 permet de s'assurer que ce n'est pas simplement la formation des *doigts* qui est empêchée par l'inhibition de la contractilité acto-myosine mais que les doigts déjà existants disparaissent après ajout de ce réactif (voir figure 3.8 A-E). L'analyse de l'intensité de fluorescence des VE-cadhérines-GFP au niveau des *doigts*, proportionnelle à la quantité de cadhérines présentes dans les jonctions adhérentes, révèle que les contacts entre les cellules se sont désassemblés après ajout de Y-27632 (voir figure 3.8 F). Tout ceci montre que la contractilité acto-myosine est nécessaire au maintien en place des *doigts* qui se désassemblent quand la cellule receveuse arrête d'exercer une force de traction sur les *doigts*.

3.2.3.2 *L'activation de la contractilité acto-myosine augmente la longueur des* doigts

Nous avons montré que les fibres *de stress* assemblées par la cellule receveuse permettent de maintenir la forme allongée des *doigts*. Pour sonder l'importance de la contractilité acto-myosine dans la formation des *doigts*, nous avons augmenté la contractilité acto-myosine

en incubant les cellules en présence de nocodazole. L'effet principal de ce réactif est la dépolymérisation des microtubules mais il a comme effet indirect d'activer la voie de signalisation contrôlée par Rho (Bershadsky *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1998), c'est-à-dire d'augmenter la contractilité acto-myosine.

En présence de nocodazole, la longueur des *doigts* augmente continûment (voir figure 3.8 G-J). Simultanément des cadhérines sont recrutées au niveau des *doigts* (voir figure 3.8 K). La croissance observée des *doigts* n'est donc pas une simple déformation due à la traction des fibres *de stress* mais est accompagnée d'un assemblage supplémentaire de complexes protéiques composant les *doigts.*

La dynamique du bord libre de cellules en présence de nocodazole a également été observée afin de contrôler un effet éventuel sur la dynamique de polymérisation d'actine de la cellule donneuse. Cette dynamique apparaît qualitativement semblable à la dynamique des cellules contrôle. La contractilité acto-myosine n'intervient donc pas dans les propriétés de polymérisation d'actine de la cellule donneuse. Seule l'augmentation de la contractilité acto-myosine de la cellule receveuse est impliquée dans la croissance des *doigts* en présence de nocodazole. Puisque, de plus, une inhibition de la contractilité conduit à la disparition des *doigts*, la traction appliquée par les fibres *de stress* de la cellule receveuse sur les jonctions adhérentes permet donc de réguler la longueur des *doigts.*

3.2.3.3 *Une force de traction externe permet de remplacer la contractilité acto-myosine*

Afin de vérifier si la traction des fibres *de stress* est bien le seul effet responsable de la régulation de la longueur des *doigts* nous avons appliqué une force externe sur la cellule receveuse similaire à celle utilisée pour induire la croissance de contacts focaux (Riveline *et al.*, 2001). La force a été appliquée par une micropipette contrôlée par un micromanipulateur. La micropipette est appuyée sur la lamelle de verre jusqu'à ce qu'elle soit au contact de la surface apicale de la cellule receveuse. À ce moment, la micropipette est déplacée en quelques secondes vers le noyau de la cellule de manière à appliquer une contrainte de cisaillement sur la cellule et donc de tirer sur les fibres *de stress* se terminant au niveau des *doigts* (voir 2.1.9). La croissance localisée de *doigts* a ainsi pu être provoquée dans le cas où les *doigts* sont encore de petite taille (voir figure 3.8 L-O). Sur cette figure, seul le contact désigné par la flèche a montré une croissance franche, alors que les contacts

situés plus loin de la zone d'application de la force n'ont pas changé de taille, suggérant que ces *doigts* n'ont pas ressenti la force appliquée par la pipette.

De plus, comme le montre la courbe de la figure 3.8 P, l'augmentation de longueur du *doigt* est accompagnée d'un recrutement simultané de VE-cadhérines. Cette mesure montre que la croissance observée n'est pas due à une déformation du contact sous l'effet de la traction par la pipette mais bien d'un recrutement des composants du contact. Ainsi, un effet de traction mécanique des fibres *de stress* sur la jonction adhérente permet de contrôler la longueur du *doigt*, suggérant une origine purement mécanique à cette régulation.

L'application de forces par une micropipette nécessite tout de même une configuration cellulaire assez particulière. Il faut trouver deux cellules dont l'interface est assez parallèle à la micropipette. De plus, il faut un échantillon sous-confluent et que les deux cellules soient situées juste à côté d'une zone sans cellules, permettant ainsi d'appuyer la micropipette sur la lamelle sans risquer de toucher une autre cellule et d'exercer des contraintes indirectes sur les cellules participant à la jonction adhérente considérée.

3.2.3.4 *La tension membranaire n'intervient pas dans la régulation de longueur des* doigts

Puisque la traction appliquée par les fibres *de stress* permet de réguler la longueur, nous nous sommes intéressés à la contribution de la tension de membrane dans les forces appliquées au niveau de *doigts*. En effet, les forces de traction appliquées par la cellule receveuse sur les jonctions adhérentes peuvent être responsables des déformations semblables à des filopodes observées sur le lamellipode de la cellule donneuse (voir figure 3.1 D). Or une déformation membranaire comme l'extrusion d'un tube a un coût énergétique et la membrane exerce donc une force de rappel au niveau des *doigts*. Ainsi, pour une force de traction des fibres *de stress* donnée, la longueur de *doigt* sera dépendante de la tension de membrane de la cellule donneuse.

Afin d'évaluer la contribution de la tension de membrane dans le bilan des forces appliquée au niveau des *doigts*, nous avons diminué la tension de membrane des cellules en utilisant l'acide déoxycholique. À une concentration de 0.4 mM, ce détergent diminue d'environ 25% la tension membranaire (Raucher et Sheetz, 1999). Dans ces conditions,

aucune modification de la distribution de longueur des *doigts* n'a pu être décelée (voir tableau 3.1). Ce résultat n'est pas surprenant puisque la traction d'un tube de membrane requiert une force de l'ordre de 10 pN (Raucher et Sheetz, 1999) alors que nous verrons au chapitre 4.3.4 qu'une fibre *de stress* est capable d'appliquer des forces de l'ordre de quelques centaines de pN. Seule la déformation du réseau d'actine de la cellule donneuse est capable d'opposer une force suffisante pour contrebalancer les forces de traction de la cellule receveuse. Nous reviendrons sur ce point au paragraphe suivant (3.3).

3.3 Mécanisme d'assemblage

Notre compréhension de la formation des jonctions adhérentes est la suivante : une cellule (cellule donneuse) projette un lamellipode sur une cellule voisine (cellule receveuse) par le simple fait de la polymérisation d'actine. Ce lamellipode en croissance contient des faisceaux de filaments (précurseurs) inclus dans le réseau d'actine polymérisant. Les cadhérines diffusant dans la membrane sont piégées au niveau de ces précurseurs et rencontrent les cadhérines diffusant dans la membrane de la cellule receveuse. La formation d'un noyau de cadhérines des deux cellules interagissant initie la formation de fibres *de stress* dans la cellule receveuse. Ces fibres *de stress* exercent une traction sur la jonction adhérente naissante, maintenant en place le lamellipode de la cellule donneuse (par l'intermédiaire des liaisons cadhérine-cadhérine) et induisant la croissance des *doigts*.

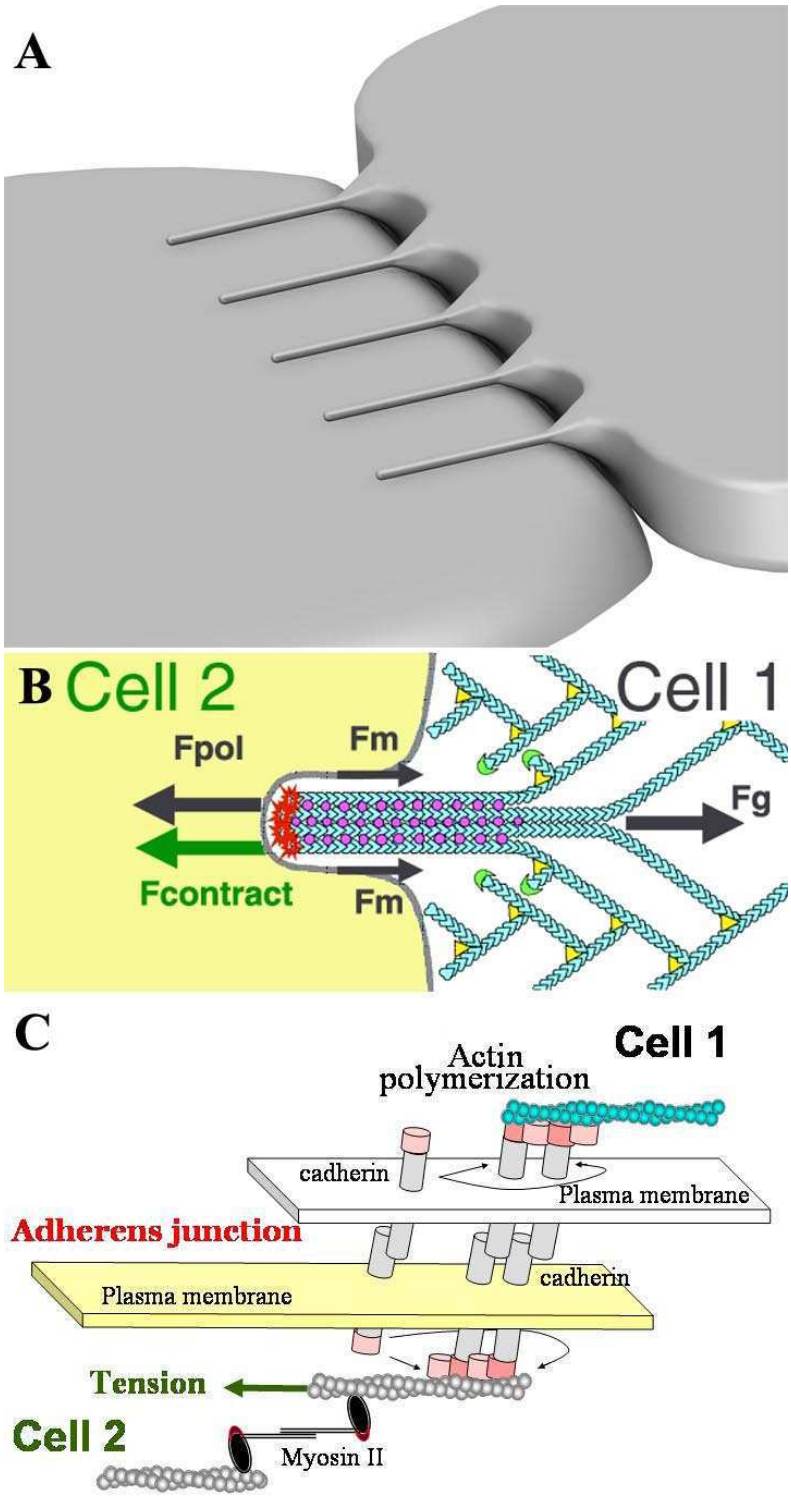


FIG. 3.9: ***Représentation de l'assemblage des* doigts.** ***(A)*** *Vue 3D d'un couple cellule donneuse et cellule receveuse.* ***(B)*** *Vue détaillée d'un* doigt *que la cellule de droite (Cell 1, donneuse) projette sur la cellule de gauche (Cell 2, receveuse). Seule l'actine de la cellule donneuse est représentée et les forces dues à la polymérisation d'actine (F_{pol}), à la contractilité acto-myosine ($F_{contract}$), à la membrane (F_m) et à la déformation du réseau d'actine (F_g).* ***(C)*** *Schéma d'une jonction adhérente. Les cadhérines sont représentées par des cylindres gris et les protéines de liaison au cytosquelette par des cylindres roses.*

La figure 3.9 A donne une représentation tridimensionnelle de notre vision des *doigts* périodiques que nous avons décrits dans ce chapitre. Puisque la cellule donneuse projette un lamellipode sur la cellule receveuse et qu'en retour la cellule receveuse applique une traction sur les jonctions adhérentes qui se forment, l'action combinée de la polymérisation d'actine et de la contractilité acto-myosine permet d'expliquer les brisures de symétrie de position (*doigts* localisés uniquement d'un côté de l'interface entre les cellules) et de forme des *doigts*.

La périodicité des doigts s'explique par la présence de précurseurs d'actine dans la lamellipode. Ces précurseurs sont le résultat de l'agrégation de protéines nucléatrices de filaments, voire du regroupement des filaments d'actine polymérisant en faisceaux par des protéines comme la fascine (voir la figure 3.9 B, (Svitkina *et al.*, 2003)). Ce phénomène peut s'interpréter comme une instabilité dynamique de croissance (Bohin et Pelce, 2001) : des protéines nucléatrices d'actine diffusent dans la membrane avec un coefficient de diffusion D. La polymérisation de l'actine pousse et perturbe la membrane qui se déplace à une vitesse v. Il apparaît alors naturellement une longueur d'onde caractéristique $\lambda = \frac{D}{v}$. Pour des paramètres cellulaires classiques ($D = 10^{-11}\mu\text{m}^2/\text{s}$ et $v = 1$ nm/s), on trouve une période de l'ordre du μm, ce qui est cohérent avec les observations de périodes de *doigts*.

Il faut noter que nous nous sommes placés dans le cas de la **croissance** des jonctions adhérentes. De telles morphologies pourraient également être expliquées par la rétraction du lamellipode de la cellule donneuse sous l'effet d'une augmentation de la contractilité acto-myosine dans la cellule donneuse (Giannone *et al.*, 2004). Cependant, en présence de nocodazole, on observe que la base des *doigts* reste au niveau de l'interface entre les cellules et que l'extrémité des *doigts* croît vers le noyau de la cellule receveuse. Cette observation est incompatible avec un phénomène de rétraction pour lequel l'extrémité des *doigts* sur la cellule receveuse resterait fixe et la base des *doigts* se déplacerait en direction de la cellule donneuse. Ces signatures permettent donc de distinguer, sur des cellules vivantes, les *doigts* en croissance des *doigts* en rétraction.

La formation des jonctions adhérentes avait été expliquée jusqu'à présent soit comme étant un résultat de la polymérisation d'actine, soit dépendant de l'état de contractilité des cellules. Nous avons montré que ces deux propriétés du cytosquelette d'actine sont essentielles à la formation et à la régulation des *doigts*. Afin de mieux comprendre le mécanisme de croissance des *doigts*, il est important de regarder plus précisément le bilan des forces

ressenties par la jonction adhérente. La figure 3.9 B détaille les contributions des deux cellules à la croissance d'un *doigt*. Tout d'abord, la cellule donneuse polymérise de l'actine qui pousse la membrane avec une force F_{pol}, ce qui permet de faire croître le lamellipode. Des travaux expérimentaux *in vitro* ont permis d'évaluer les forces exercées par une comète d'actine polymérisant à partir d'une bille (Marcy *et al.*, 2004). Des forces dues à la polymérisation d'actine de l'ordre de 100 pN sont donc attendues. Or, la création d'un tube de membrane ne nécessite qu'une force F_m de l'ordre de 10 pN, indépendante de la longueur du tube (Derenyi *et al.*, 2002). Cette force résistive est donc largement insuffisante pour contrebalancer à la fois la polymérisation d'actine de la cellule donneuse et la traction des fibres *de stress* de la cellule receveuse qui agissent dans le même sens. Au niveau des contacts focaux, les fibres *de stress* appliquent une contrainte de l'ordre de 1 nN/μm^2. En supposant que la contrainte est du même ordre de grandeur, on évalue la force contractile ressentie par les *doigts* ($F_{contract}$) à environ 100 pN également (1 nN/μm^2 appliqué sur une surface d'environ 1 μm sur 100 nm). Cependant, la force appliquée par les fibres *de stress* est transmise au faisceau d'actine de la cellule donneuse participant au doigt par l'intermédiaire des liaisons cadhérine-cadhérine (voir figure 3.9 C). Cette force a tendance à extraire ce faisceau d'actine du réseau d'actine de la cellule donneuse, provoquant une déformation de ce réseau. Si on considère un module d'Young à deux dimensions de l'ordre de 10^{-3}J/m^2 pour le réseau d'actine (Bausch *et al.*, 1998), la force résistive induite par la déformation de ce réseau peut atteindre 10nN/μm^2 pour une déformation de l'ordre du μm. Ceci ce traduit en une force par *doigt* F_g de l'ordre de 1 nN, bien supérieure à ce qui serait nécessaire pour contrebalancer les forces de traction de la cellule receveuse. On peut donc supposer une déformation plus faible que celle envisagée pour le calcul d'ordre de grandeur. Ce bilan de forces sera utilisé au chapitre suivant pour estimer de manière plus quantitative les forces contractiles appliquées au niveau des jonctions adhérentes.

La figure 3.9 C montre une vue plus moléculaire de la jonctions adhérente. Les cadhérines (en gris) sont liées au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire d'un complexe protéique (en rose) dont les caténines font partie. Les cadhérines des deux cellules interagissent, permettant ainsi de lier les cytosquelettes des deux cellules et donc de transmettre les forces de traction des fibres *de stress* de la cellule receveuses jusqu'aux faisceaux de filaments d'actine de la cellule donneuse. Néanmoins, cette vision moléculaire est fausse dans le sens où les cadhérines continuent de diffuser dans la membrane et ne restent pas fixées au niveau de la jonction adhérente. En effet, des expériences de FRAP[2] sur le

[2]Fluorescence Recovery After Photobleaching

même système montrent un retour de fluorescence au niveau des *doigts* blanchis de même morphologie que le *doigt* initial en présence de nocodazole (Delanoe-Ayari *et al.*, 2004b), ce qui prouve que les cadhérines de la jonction adhérente sont échangées constamment. Une analyse quantitative du retour de fluorescence montre que 60% des cadhérines sont renouvelées au niveau d'un *doigt* en l'espace de quelques minutes. Ce résultat est cohérent avec des mesures sur d'autres systèmes comme la *Drosophile* où seulement 10% des cadhérines restent liées dans les jonctions adhérentes (Lecuit, 2005). Cependant, l'actine piégeant indirectement les cadhérines, on s'attend à trouver à chaque instant suffisamment de cadhérines liant les cytosquelettes des deux cellules pour transmettre les forces.

Une vision plus précise du mécanisme d'assemble des *doigts* serait donc la suivante. Une fois le noyau de cadhérines intéragissantes des deux cellules formé, la contractilité acto-myosine de la cellule receveuse applique une force sur le *doigt* naissant. Cette force a plusieurs effets. Tout d'abord, elle permet de maintenir le lamellipode de la cellule donneuse en place. Ensuite, elle permet de faciliter l'insertion de monomère d'actine à l'extrémité du *doigt* de façon similaires aux expériences de croissance de comètes d'actine *in vitro* par Marcy *et al.* (Marcy *et al.*, 2004). Dans ces expériences, une bille recouverte de N-WASP était placée dans un milieu de motilité et une comète d'actine se formait d'un côté de la bille. La comète était ensuite aspirée par une micropipette. La traction de la micropipette sur la comète permettait d'accélérer la polymérisation d'actine, alors que pousser la comète contre la bille ralentissait la vitesse de polymérisation et pouvait aller jusqu'à l'arrêter si la force appliquée était suffisante. Dans notre système, les fibres *de stress* de la cellule receveuse peuvent jouer le rôle de la pipette et faciliter l'insertion de monomères d'actine au bout des filaments d'actine composant le *doigt* de la cellule donneuse.

3.4 Conclusion

Les jonctions adhérentes de type *doigts* que nous avons étudiées dans ce chapitre présentent une double symétrie brisée : les *doigts* sont allongés et perpendiculaires à l'interface entre cellules, les *doigts* sont situés d'un côté de cette interface. Cette dernière asymétrie nous permet de distinguer les deux cellules participant au contact : une cellule donneuse projette un lamellipode sur une cellule receveuse.

La cellule donneuse, par la polymérisation d'actine au niveau de sa membrane, permet

aux membranes des deux cellules voisines d'entrer en contact et de permettre à des cadhérines des deux cellules d'interagir. Les cadhérines sont alors piégées au niveau de faisceaux d'actine particulièrement denses, présents dans le lamellipode de la cellule donneuse. La présence de ces précurseurs d'actine est nécessaire pour que les *doigts* puissent se former. En effet, les cellules surexprimant Rac constitutivement actif, présentent un lamellipode dense et homogène en actine, sans ces précurseurs, et forment des *nappes* continues plutôt que des *doigts*. La surexpression de protéines associées à l'actine comme la cofiline, la gelsoline ou VCA, ne modifient pas la morphologie des *doigts*. Or, les cellules surexprimant ces protéines possèdent toujours des précurseurs d'actine. La présence de ces précurseurs dans le lamellipode de la cellule donneuse est donc indispensable pour que les *doigts* puissent se former.

La cellule receveuse assemble quant à elle des fibres *de stress* se terminant au niveau des *doigts*, ce qui suggère qu'une traction de la cellule receveuse permettrait de faire croître les *doigts*. L'inhibition de la contractilité acto-myosine par Y-27632 ou la blebbistatine empêche la formation des *doigts*. En revanche, l'activation de la contractilité par incubation en présence de nocodazole permet une croissance supplémentaire des *doigts*. La traction appliquée par les complexes acto-myosines sur les *doigts* permet donc de réguler la croissance des *doigts*. L'effet de la contractilité sur les *doigts* est dû uniquement à la cellule receveuse, puisqu'aucune modification des fluctuations de bords libres membranaires n'a été détectée dans ces conditions. L'application d'une contrainte locale sur un *doigt* a mené à la croissance spécifique du *doigt* sans que les *doigts* au voisinage ne se mettent à croître. La force appliquée sur le *doigt* par la cellule régule donc la longueur du *doigt*.

L'étude de la formation de jonctions adhérentes hautement asymétriques a donc permis de dissocier les effets respectifs de la polymérisation d'actine et de la contractilité sur le mécanisme de formation. La cellule donneuse initie la formation du contact en imposant la géométrie et la localisation des jonctions adhérentes par la polymérisation d'actine. La cellule donneuse stabilise et régule la longueur du contact en application des forces de traction via des fibres *de stress*.

4

Jonctions adhérentes : mesure de forces contractiles

4.1 *Rappel de la modélisation de* doigts *en croissance*

Cette section a pour but de décrire la modélisation des *doigts* effectuée par Hélène Delanoë-Ayari *et al.* (Delanoe-Ayari *et al.*, 2004b) et sur laquelle nous nous baserons dans la suite du chapitre. L'ingrédient principal de cette modélisation est la dynamique d'une assemblée de filaments d'actine parallèles polymérisant contre une membrane cellulaire. Les cadhérines sont supposées diffuser librement dans la membrane et être piégées passivement par le cytosquelette d'actine.

4.1.1 *Périodicité des doigts*

Une périodicité de $1.0 \pm 0.1\mu$m entre *doigts* a été mesurée sur des cellules CHO exprimant la VE-cadhérine-GFP. L'hypothèse de départ est qu'une nucléation d'agrégats de cadhérines entraîne un mécanisme de polymérisation d'actine (Kobielak *et al.*, 2004). Une instabilité de croissance liée à la polymérisation d'actine et aux déformations de membrane (Bohin et Pelce, 2001) peut expliquer l'apparition d'une distance caractéristique. Dimensionnellement, le rapport du coefficient de diffusion d'une espèce nucléatrice d'actine dans la membrane et de la vitesse d'avancée d'un front de croissance fait apparaître une longueur. On définit ainsi la longueur d'onde d à partir du coefficient de diffusion D des cadhérines dans la membrane et de la vitesse v de croissance des *doigts* : $d = \frac{D}{v}$. Des mesures de ces paramètres ($D \simeq 10^{-11}\text{cm}^2/\text{s}$ pour des cadhérines liées au cytosquelette et $v \simeq 1\text{nm/s}$ (Pollard, 1986)) conduisent à une période de $d \simeq 1\mu$m.

4.1.2 Longueur des doigts

La longueur finie des *doigts* peut s'expliquer en supposant que la polymérisation d'actine entre en compétition avec la tension de la membrane (Raucher et Sheetz, 2000) empêchant les *doigts* de croître indéfiniment.

4.1.2.1 *Force exercée par les filaments d'actine*

Quand une force ponctuelle (c'est-à-dire sur une surface petite devant 1 μm^2 dans notre système) suffisante est appliquée sur une membrane lipidique, un tube de membrane en est extrait. On suppose que les *doigts* sont formés par la polymérisation d'un faisceau de filaments d'actine appliquant une force ponctuelle sur la membrane. Chaque *doigt* est donc supposé être un cylindre dont la longueur moyenne a été mesurée sur une monocouche cellulaire de cellules CHO VE ($L = 1.3 \pm 0.1\mu$m (Delanoe-Ayari *et al.*, 2004b)) et de rayon $R = 0.1\mu$m (estimé à partir de clichés de microscopie électronique de filopodes (Svitkina *et al.*, 2003)), contenant n filaments d'actine parallèles (on estimera ce nombre n par la suite). La force f exercée par chaque filament d'actine est estimée en partant d'un modèle développé par Mogilner & Oster (Mogilner et Oster, 2003; Mogilner et Oster, 1996). L'extrémité libre d'un filament est traitée comme une corde élastique de longueur l, de longueur de persistance l_p et de module de courbure $B = l_p k_b T$. L'extrémité libre de chaque filament est en contact avec la membrane alors que son autre extrémité est fixée au réseau d'actine. Les fluctuations thermiques permettent de courber les filaments et d'éloigner leur extrémité libre de la membrane. Si la distance séparant l'extrémité libre d'un filament et la membrane dépasse la taille δ d'un monomère d'actine, un monomère peut être ajouté. Les fluctuations thermiques peuvent alors redresser le filament et pousser la membrane (voir figure 4.1). Un filament d'actine est capable, d'après ce modèle, d'exercer une force $f = \frac{3B}{l^2}$. En prenant $l_p = 10$ μm (Ott *et al.*, 1993) et $l = 100$ nm (Medalia *et al.*, 2002), on trouve une force f de l'ordre de 10 pN. La force exercée par tous les filaments d'un *doigt* est donc : $F_{tot} = \frac{3nl_p k_b T}{l^2}$.

Si cette force f_{tot} est supérieure à la force critique f_c nécessaire pour extraire un tube de la membrane, alors le *doigt* peut croître (Derenyi *et al.*, 2002).

4.1.2.2 *Paramètres d'un tube de membrane*

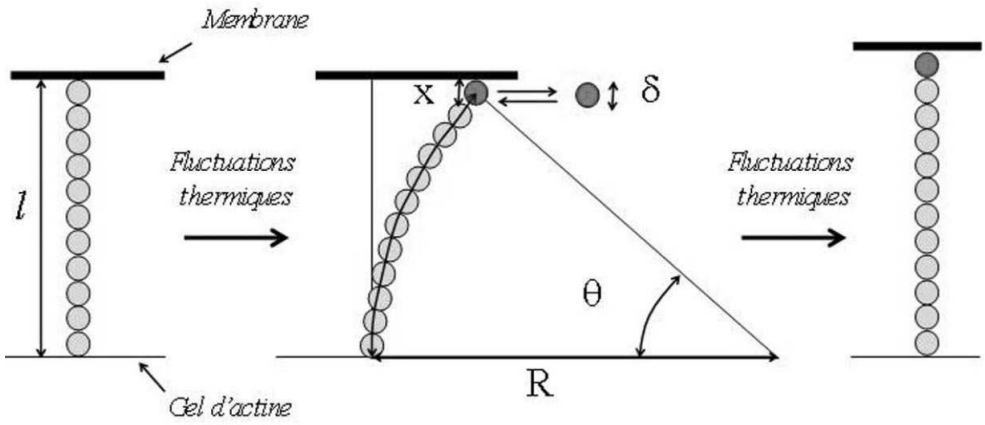


FIG. 4.1: L'extrémité libre d'un filament d'actine peut fluctuer et permettre l'insertion d'un monomère d'actine qui va ensuite pousser la membrane, provoquant la croissance du *doigt* (Delanoe-Ayari, 2003).

L'énergie F_{tube} d'un tube de membrane assimilé à un cylindre de rayon R et de longueur L est la somme d'une énergie de courbure et d'une énergie de tension intégrées sur la surface du tube, ainsi que le travail sur la longueur du tube de la force f nécessaire à son extraction. L'énergie F_{tube} est donc donnée par :

$$F_{tube} = \left(\frac{\kappa}{2R^2} + \sigma\right) 2\pi R^2 - fl \tag{4.1}$$

avec κ la rigidité de courbure et σ la tension de membrane (Derenyi *et al.*, 2002).

La minimisation de cette énergie par rapport au rayon R et à la longueur L permet de définir la valeur à l'équilibre du rayon ($R = \sqrt{\frac{\kappa}{2\sigma}}$) ainsi que la force critique pour extraire un tube ($f_c = 2\pi\sqrt{2\sigma\kappa}$). Les caractéristiques d'un tube de membrane sont donc entièrement déterminées par la tension de membrane σ et la rigidité de courbure κ (Derenyi *et al.*, 2002).

4.1.2.3 *Tension de membrane*

Un tube peut alors croître indéfiniment en longueur à force constante si un réservoir lipidique permet de conserver la tension de membrane constante. Dans le cas où aucun réservoir lipidique n'existe, l'allongement du tube étire la membrane et la tension de membrane augmente avec l'aire du tube suivant la loi : $\sigma = \sigma_0 + k^m \frac{\delta A}{A}$ où σ_0 est la tension de membrane avant croissance du *doigt*, k^m est le module de compressibilité de la membrane,

A l'aire totale de la membrane cellulaire et δA l'accroissement d'aire de la membrane. Le rayon du tube est supposé constant au cours du temps et vaut donc : $R = \sqrt{\frac{\kappa}{2\sigma_0}}$. Des valeurs raisonnables de κ et R ($\kappa = 400k_bT$ (Simson *et al.*, 1998) ; $R = 100$ nm, mesures sur des clichés de microscopie électroniques de filopodes par Svitkina *et al.* (Svitkina *et al.*, 2003) permettent d'évaluer $\sigma_0 \approx 8.6 \times 10^{-5} N/m$, ce qui est proche des valeurs mesurées par Raucher & Sheetz (Raucher et Sheetz, 2000).

4.1.2.4 *Longueur du* doigt

Au fur et à mesure que le *doigt* croit, la tension de membrane augmente et la force de rappel exercée par la membrane augmente également. Lorsque cette force compense la force exercée par la polymérisation d'actine, le *doigt* atteint sa longueur maximale L_0. L'accroissement de surface de la cellule est alors de : $\delta A = p2\pi RL_0$ où p est le nombre de *doigts* que forme la cellule. En supposant que $\sigma_0 \ll k^m \frac{\delta A}{A}$, le bilan des forces à l'équilibre s'écrit : $nf = 2\pi Rk^m \frac{p2\pi RL_0}{A}$ et donc :

$$L_0 = \frac{Af\rho}{4\pi pk^m} \tag{4.2}$$

où $\rho = \frac{n}{\pi R^2}$ est la densité surfacique de filaments d'actine dans une section du *doigt*. Des valeurs raisonnables de A, p (mesurés sur une monocouche de cellules CHO VE (Delanoe-Ayari *et al.*, 2004b)) et k^m (0.1 N/m (Evans et Needham, 1987)), ainsi que la valeur moyenne mesurée de L_0 (Delanoe-Ayari *et al.*, 2004b) permettent d'évaluer la densité surfacique de force appliquée par la polymérisation d'actine : $f\rho \approx 10^4 N/m^2$. Si on reprend la valeur de f estimée à la section 4.1.2 ($f \approx 10pN$), on trouve de l'ordre de 100 filaments d'actine par *doigt*.

4.1.2.5 *Dynamique de croissance des* doigts

Puisque le *doigt* croît par addition de monomère d'actine, la variation de longueur du *doigt* en fonction du temps peut s'écrire :

$$\frac{dL}{dt} = v_+ exp\left(\frac{-f_m\delta}{k_bT}\right) - v_- \tag{4.3}$$

où v_+ et v_-sont respectivement les vitesses de polymérisation et dépolymérisation de l'ac-

tine en l'absence de membrane, et $exp\left(\frac{-f_m\delta}{k_bT}\right)$ représente la probabilité de créer un espace de taille δ pour insérer un monomère d'actine. Puisqu'on suppose l'équilibre thermodynamique au temps longs (lorsque $F = F_m$), on a également : $\frac{v_+}{v_-} = exp\left(\frac{f\delta}{k_bT}\right) = exp\left(\frac{L_{eq}}{\lambda}\right)$en posant $\lambda = \frac{k_bTA\rho}{4\pi k^m p\delta}$. La loi de croissance du *doigt* en fonction du temps s'écrit alors :

$$L(t) = L_{eq} + \lambda \ln\left(1 - \left(1 - \exp\left(\frac{-L_{eq}}{\lambda}\right)\right)\exp\left(\frac{-tv_-}{\lambda}\right)\right) \tag{4.4}$$

L'ajustement des courbes de croissance expérimentales avec cette loi temporelle permet de déterminer L_{eq}, λ et v_-. En pratique, L_{eq} est déterminé par la valeur aux temps longs de la taille des *doigts*. L'expression analytique du paramètre λ ne permet d'en tirer une signification claire à part certaines dépendances dont en particulier l'aire totale des cellules et la densité de fialements d'actine poussant dans un *doigt*. On ne pourra donc évaluer ce paramètre que par l'ajustement des courbes de croissance. Cependant, des valeurs de v_- différentes conduisent à des évaluations de λ différentes (et donc de la force nf par *doigt*). Il apparaît dès à présent important d'évaluer correctement la vitesse de dépolymérisation d'actine afin d'obtenir des résultats de force pertinents.

4.2 Adaptation de la modélisation dans le cas d'une croissance induite par la contractilité acto-myosine

4.2.1 Cadre d'application de la modélisation

Nous avons utilisé la même base de modélisation en tenant compte des résultats obtenus dans le chapitre précédent. Nous considérerons donc qu'à l'équilibre, quand la taille des *doigts* est maximale, les forces de polymérisation d'actine de la cellule donneuse ($\overrightarrow{F}_{pol}$) et de contractilité acto-myosine de la cellule receveuse ($\overrightarrow{F}_{contract}$) compensent les forces de rappel de la membrane ($\overrightarrow{F}_m$) et de déformation du réseau d'actine ($\overrightarrow{F}_g$) de la cellule donneuse (voir figure 4.2). Le bilan de force à l'équilibre à considérer est donc le suivant :

$$\overrightarrow{F}_m + \overrightarrow{F}_g = \overrightarrow{F}_{pol} + \overrightarrow{F}_{contract} \tag{4.5}$$

Chaque *doigt* comportant un nombre n de filaments d'actine polymérisant contre la

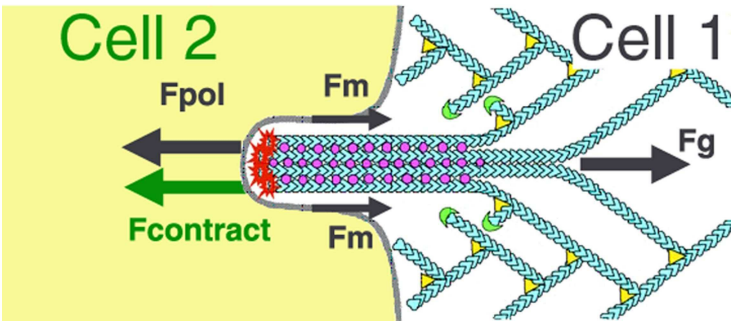


Fig. 4.2: **Équilibre de forces dans le cadre de notre modèle.** La cellule 1 (donneuse) projette un *doigt* sur la cellule 2 (receveuse). La force de polymérisation de l'actine (F_{pol}) s'oppose à la résistance de la membrane (F_m). La cellule 2 « tire » sur le *doigt* avec une force $F_{contract}$ et la déformation du réseau d'actine de la cellule 1 entraîne une force résistive F_g.

membrane, la valeur de force estimée par l'ajustement des courbes de croissance expérimentale correspond donc à : $nf = F_{pol} + F_{contract} - F_{gel} - F_m$. Or, les tentatives pour changer la vitesse de polymérisation d'actine ou la tension de membrane n'ont pas donné de modifications apparentes de tailles de *doigts* (voir la section 3.2.2 du chapitre précédent). En revanche, l'augmentation de la contractilité acto-myosine est facilement accessible par addition de nocodazole. Nous nous sommes attachés à cette condition expérimentale pour sonder le modèle de formation des *doigts* proposés au chapitre précédent.

4.2.2 Méthodologie

Les expériences de croissance de *doigts* sur des cellules vivantes ont l'avantage de pouvoir suivre l'évolution temporelle de *doigts* donnés. Cependant, une expérience ne permet de suivre que de l'ordre de la dizaine de *doigts* en croissance. De plus, le choix des zones suivies est lié aux cellules exprimant la VE-cadhérine-GFP et, parmi ces cellules, le choix dépendant de l'appréciation de l'observateur. Afin d'augmenter à la fois la statistique de croissance et d'assurer l'objectivité des données mesurées, nous avons suivi le protocole suivant :

- Pour chaque concentration de nocodazole, 8 monocouches de cellules EAhy sont préparées et incubées simultanément avec le milieu de culture contenant du nocodazole.
- Les monocouches sont fixées à des temps différents, déterminés à partir des expériences de croissance de *doigts* en cellules vivantes de façon à obtenir un bon échantillonnage (fixations plus rapprochées au début, quand le taux de croissance des *doigts* est important).

- Les monocouches sont ensuite marquées pour la VE-cadhérine en suivant un protocole standard de marquage.
- Pour chaque monocouche, 10 zones sont repérées par déplacement aléatoire de la platine motorisée du microscope et les images correspondantes sont acquises.
- Les longueurs de 150 à 200 *doigts* sont mesurées pour chaque condition expérimentale.

4.2.3 Comparaison des courbes de croissance en cellules vivantes et cellules fixées

Ce protocole expérimental permet d'obtenir l'évolution d'une distribution de longueur des *doigts* au cours du temps. On ne peut alors tirer des conclusions que de l'évolution de la distribution sans être certains de l'évolution réelle de chaque *doigt* observé. Les expériences en cellules vivantes permettent quant à elles d'obtenir l'évolution de la longueur de quelques *doigts* bien déterminés au cours du temps. Ces dernières expériences représentent l'évolution d'un point de la distribution mesurée sur les échantillons fixés.

Alors que l'observation d'un échantillon fixé en conditions standard ne permet pas de déterminer si les *doigts* observés sont dans un régime de croissance ou de rétraction, nous faisons ici l'hypothèse que l'ajout de nocodazole synchronise tous les *doigts* de l'échantillon dans un régime de croissance. Cette hypothèse est partiellement vérifiée par le fait que tous les *doigts* observés lors des expériences sur cellules vivantes ont cru après ajout de nocodazole. Seule la répétition des expériences sur cellules vivantes (en éliminant la subjectivité du choix des cellules observées) jusqu'à l'obtention d'une statistique comparable à celles obtenues sur les échantillons fixés permettrait de valider cette hypothèse. Nous faisons donc une sorte d'hypothèse ergodique en considérant que les distributions obtenues en mesurant la longueur de M *doigts* sur chaque échantillon fixé à des temps différents sont identiques à celles qu'on obtiendrait en suivant la croissance de M *doigts* sur des cellules vivantes.

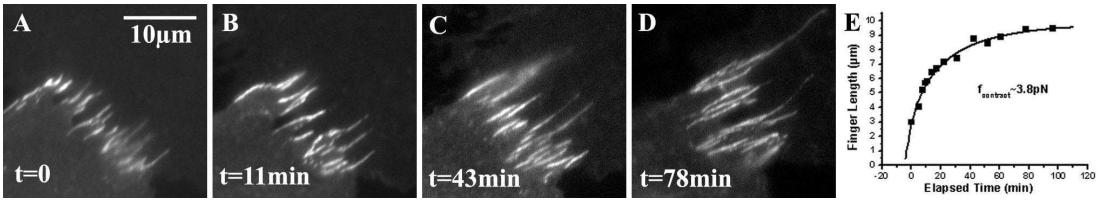


Fig. 4.3: **Croissance de *doigts* après ajout de nocodazole. (A-D)** Croissance de *doigts* sur des cellules vivantes. Le temps 0 correspond à l'ajout de 1μM de nocodazole. Les *doigts* sont déjà allongés avant le début de l'expérience. **(E)** Courbe de croissance correspondante des doigts en fonction du temps. Les longueurs sont moyennées sur les 10 *doigts* observés.

4.3 Détermination des forces de contractilité acto-myosine

4.3.1 Croissance de doigts après ajout de nocodazole

Après addition de 1μM de nocodazole dans le milieu d'observation des cellules, les jonctions adhérentes de type *doigt* croissent en direction du noyau de la cellule donneuse (voir figure 4.3 A-D + 3.8 G-J). C'est-à-dire en particulier que la position de l'interface entre cellules en contact n'est pas modifiée et que les *doigts* ne changent pas de position par rapport à cette interface. La longueur des doigts atteint un plateau après 2 à 3 heures d'incubation en nocodazole.

L'allure de la courbe de croissance après ajout de nocodazole (voir figure 4.3) est similaire à celles obtenues dans des expériences de croissance après incubation en latrunculine A (pour rompre les contacts) et lavage (Delanoe-Ayari *et al.*, 2004b)). La croissance des *doigts* peut alors être vue comme la réponse cellulaire d'un échelon de force appliqué sur un noyau de jonction adhérente. L'addition de nocodazole produit un nouvel échelon de force appliqué sur le *doigt* par l'intermédiaire de la contractilité acto-myosine. L'ajustement de la courbe de croissance peut alors être réalisé avec la même loi de croissance dans les deux cas (voir figure 4.3 E et (Delanoe-Ayari *et al.*, 2004b)). La comparaison des paramètres d'ajustement L_{eq} et λ obtenus dans une expérience de croissance en présence de nocodazole avec les paramètres similaires provenant de la croissance *de novo* de *doigts* en conditions standard permettra d'évaluer la force supplémentaire ΔF par *doigt* induite par l'incubation en présence de nocodazole.

4.3.2 Détermination de la vitesse de dépolymérisation v_-

La loi de croissance utilisée (voir l'équation 4.4 du paragraphe 4.1.2) dépend explicitement de 3 paramètres : λ, L_{eq} et v_-. L_{eq} correspond à la longueur des *doigts* à l'équilibre, quand la croissance atteint un plateau, et sa valeur est facilement vérifiable sur la courbe expérimentale. λ et v_- sont donc impliquées dans l'allure de la loi de croissance et ne sont pas mesurables directement sur la courbe expérimentale (en particulier la pente à l'origine vaut : $\frac{dL}{dt}(0) = v_- \left(\exp\left(\frac{L_{eq}}{\lambda}\right) - 1\right)$). La vitesse de dépolymérisation v_- de l'actine ne dépend pas *a priori* de l'état de contractilité de la cellule et sera considérée constante dans toutes les conditions expérimentales. Il convient donc de lui déterminer une valeur raisonnable avant de réaliser l'ajustement de toutes les courbes expérimentales.

L'étude a été réalisée à partir de la courbe représentée sur la figure 4.3 E. Nous avons testé des valeurs de v_- allant de 10^{-4} μm/min à 100 μm/min. Il peut paraître étrange de tester des valeurs de v_- sur une aussi grande gamme de valeurs mais ce test permet de justifier que seules peu de valeurs de v_- donnent des résultats d'ajustements pertinents. Les paramètres résultant de l'ajustement de la courbe expérimentale pour toutes ces valeurs de v_- sont indiqués dans le tableau 4.1, ainsi que les valeurs de forces obtenues à partir de λ et L_{eq}. Il apparaît tout de suite que l'ajustement des courbes est bon quelles que soient les valeurs de v_- utilisées. Cependant, les valeurs de L_{eq} obtenues pour des valeurs de v_- inférieures ou égales à 10^{-2} sont trop élevées par rapport au plateau déterminé expérimentalement. Ensuite, les valeurs de force évaluées pour des valeurs de v_- supérieures ou égales à 10 sont trop petites en comparaison des forces appliquées par des fibres *de stress* et mesurées sur d'autres systèmes expérimentaux (Balaban *et al.*, 2001). Une évaluation de λ à partir de sa forme analytique posée à la section 4.1.2 ($\lambda = \frac{k_b T A \rho}{4\pi k^m p \delta}$) et de valeurs expérimentales ($A = 5000\mu m^2$, $p = 50$, $k^m = 10^{-1}$N/m (Evans et Needham, 1987), $\delta =$ 2.7nm (Pollard, 1986) et $\rho = 7000\mu m^{-2}$(Delanoe-Ayari *et al.*, 2004b)) donne $\lambda \approx 1\mu$m. La valeur de λ obtenue pour $v_- = 0.1\mu$m/min est la plus proche de cette estimation et nous conserverons cette valeur de vitesse de dépolymérisation d'actine pour les ajustements de courbe dans la suite de ce chapitre.

v_- (μm/min)	L_{eq} (μm)	λ (μm)	F (pN)	χ^2
10^{-4}	20.6	2.04	16.2	0.08
10^{-3}	16.0	2.06	12.4	0.08
10^{-2}	12.0	2.26	8.5	0.08
10^{-1}	9.8	4.13	3.8	0.06
1	9.3	22.4	0.66	0.07
10	9.3	205	7.3×10^{-2}	0.08
10^2	9.3	2030	7.3×10^{-3}	0.09

Tab. 4.1: **Paramètres d'ajustement obtenus pour différentes valeurs de v_-.** Les valeurs de longueur moyenne à l'équilibre L_{eq} et du paramètre λ sont obtenues à partir de l'ajustement de la courbe expérimentale de la figure 4.3 E. La force F est calculée à partir des valeurs de L_{eq} et λ comme dans le paragraphe 4.1.2.

4.3.3 La taille maximale des doigts *dépend de la concentration en nocodazole*

Le nocodazole possède comme effet principal de dépolymériser les microtubules. Il agit également sur la contractilité acto-myosine en activant la voie Rho-kinase (Zhang *et al.*, 2001). Le lien entre concentration de nocodazole et intensité d'activation de la contractilité acto-myosine n'a pas été étudié quantitativement. La concentration d'utilisation typique du nocodazole dans d'autres études (10μM) est suffisamment importante pour obtenir un effet franc et indiscutable.

Un moyen de sonder la réponse de la contractilité cellulaire à la concentration de nocodazole est de regarder la longueur moyenne des *doigts* sur une monocouche pour différentes concentrations de nocodazole, une fois que le plateau de croissance a été atteint. En effet, d'après l'équation 4.2 du paragraphe 4.1.2, la longueur des *doigts* à l'équilibre croît linéairement avec la force F ressentie par chaque filament d'actine du *doigt*. Si la contractilité acto-myosine augmente, alors la force ressentie par le *doigt* en croissance augmente également et sa longueur à l'équilibre est plus élevée.

La figure 4.4 représente les valeurs de longueurs à l'équilibre (après 3h d'incubation) moyenne des *doigts* d'une monocouche pour des concentrations de nocodazole variant de 100 nM à 20 μM. Les valeurs du plateau de croissance augmentent suffisamment dou-

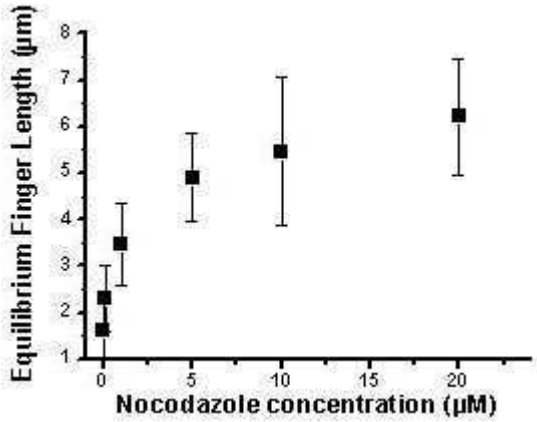


FIG. 4.4: **La longueur à l'équilibre des *doigts* croît avec la concentration en nocodazole.** La longueur moyenne à l'équilibre (L_{eq}) des *doigts* est tracée en fonction de la concentration de nocodazole. Les barres verticales correspondent aux largeurs de distribution autour des longueurs moyennes.

cement avec la concentration de nocodazole pour que la variation de contractilité acto-myosine puisse être utilisée expérimentalement. Les valeurs du plateau constituent un bon indice expérimental pour appréhender qualitativement l'évolution des forces contractiles. L'ajustement de la loi de croissance théorique aux courbes expérimentales de croissance en présence de nocodazole fournira une évaluation quantitative des forces de contractilité acto-myosine.

4.3.4 Évaluation de la force contractile

Les mêmes concentrations de nocodazole ont été utilisées (contrôle, 100nM, 1μM, 5μM, 10μM et 20 μM), en suivant le protocole décrit à la section 4.2.2 afin d'obtenir les distributions statistiques de longueur de *doigts* en fonction du temps pour différentes concentrations de nocodazole. Les courbes de croissance expérimentales, ainsi que les lois de croissance ajustées sont représentées sur la figure 4.5 A. La figure 4.5 B représente la distribution de longueurs de *doigts* après 110 minutes d'incubation en nocodazole, pour différentes concentrations, ainsi que pour l'échantillon contrôle.

Pour toutes les concentrations de nocodazole utilisées, les courbes expérimentales de croissance ont une allure similaire et se différencient uniquement par la valeur du plateau atteinte et la pente au début de la croissance. Outre des longueurs de *doigts* plus importantes, l'augmentation de la concentration en nocodazole augmente la largeur absolue de la distribution, sans toutefois modifier la largeur relative de la distribution (voir tableau 4.2

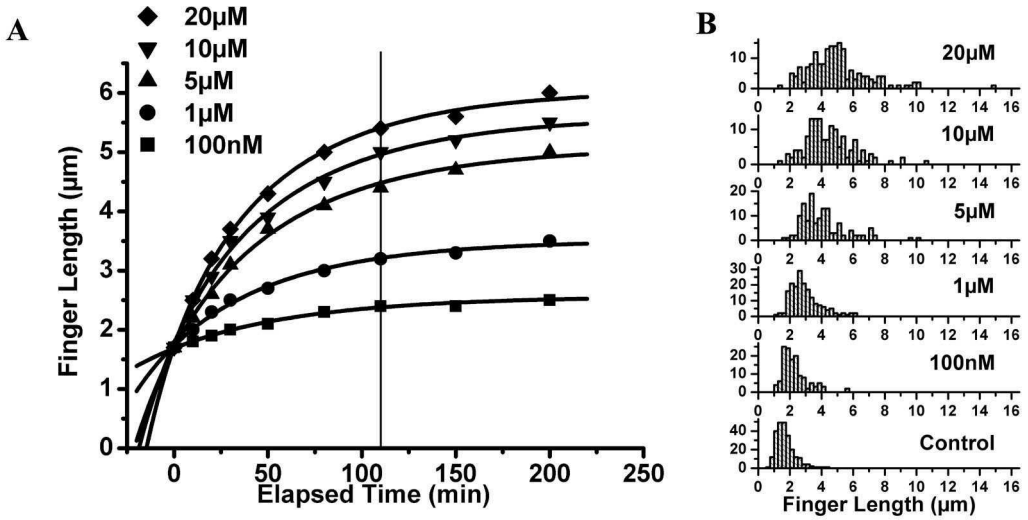


Fig. 4.5: **Croissance des *doigts* pour différentes concentrations de nocodazole (échantillons fixés). (A)** Superposition des courbes expérimentales de longueur moyenne de *doigts* en fonction du temps pour des concentrations de nocodazole allant de 100nM à 20μM. Les ajustements de ces courbes sont également tracés. Chaque point correspond à une moyenne sur 150 à 200 *doigts*. **(B)** Distribution de longueurs pour différentes concentrations de nocodazole après le même temps d'incubation (110 min, trait vertical en A), ainsi que pour la condition contrôle.

B). Il est à noter que les distributions de longueurs de *doigts* à différents temps pour une concentration de nocodazole fixée donnent une évolution similaire de l'allure des distributions qui gardent une largeur relative constante. Des longueurs nettement plus grandes que dans l'échantillon contrôle sont atteintes pour de fortes concentrations de nocodazole. Cependant, des *doigts* relativement courts existent toujours pour ces fortes concentrations. Cela peut signifier soit que les *doigts* de la partie basse de la distribution initiale croissent peu, même quand la concentration de nocodazole est élevée, ou que la nucléation et croissance de nouveaux *doigts* est permise, même en présence de nocodazole. L'observation sur des cellules vivantes de la croissance de *doigts* initialement courts permettrait de répondre en partie à cette question. Malheureusement, lorsque de telles expériences ont été réalisées, les *doigts* observés ont été choisis assez allongés avant ajout de nocodazole, de manière à observer une croissance sans ambiguïté.

L'ajustement de la loi de croissance sur les courbes expérimentales à été réalisée à l'aide d'Origin 6.0. Comme indiqué à la section 4.3.2, la valeur de v_- est fixée à 0.1 μm/min, soit 1.7 nm/s. Le paramètre λ évolue librement à partir d'une valeur initiale de 1 μm et une fourchette autour du plateau évalué expérimentalement est donnée pour contraindre les valeurs de L_{eq}. Les résultats obtenus à partir des ajustements sont résumés dans le tableau 4.2 A. Il est important de noter que la paramètre λ reste à peu près constant quelle que

soit la concentration de nocodazole utilisée, et que seule la valeur de longueur des *doigts* à l'équilibre augmente quand la contractilité acto-myosine est activée. Ce résultat reste cohérent avec les hypothèses de travail, en particulier avec l'expression du paramètre λ qui ne dépend *a priori* pas de la force contractile. Le calcul de la force totale se fait à partir des paramètres L_{eq} et λ ($f = \frac{L_{eq}k_bT}{\lambda\delta}$) et ce que nous appelons dans cette section « force contractile » représente en fait le gain de force contractile lorsque la contractilité acto-myosine est activée par le nocodazole, par rapport à une croissance standard de *doigts*. Les forces contractiles évaluées à partir de l'ajustement des courbes expérimentales montrent une augmentation effective de la contractilité acto-myosine avec la concentration de nocodazole effectuée. Ces forces sont de l'ordre du pN par filament d'actine poussant, ce qui correspond au niveau d'un *doigt* à une force moyenne de l'ordre de 100 pN, soit un stress de 0.2nN/μm^2 pour un *doigt* de 5μm de long et de 100nm de diamètre. Ces résultats sont à comparer avec les estimations de forces contractiles réalisées au niveau des contacts focaux (Balaban *et al.*, 2001). Il ressort que les stress mesurés ici sont environ 10 fois plus faibles que ceux mesurés sur les contacts focaux.

4.3.5 Relation force-extension

Les valeurs de forces contractiles calculées ici permettent de tracer le diagramme force-extension associé à la croissance des *doigts*. Nous avons supposé que l'activation de la contractilité soumet les *doigts* à un échelon de force, c'est-à-dire que la force contractile est supposée constante tout au long de la croissance et ne dépend que des paramètres λ et L_{eq}. Il convient donc de comparer cette force contractile à la longueur des *doigts* une fois l'état d'équilibre atteint. Un tel diagramme est représenté sur la figure *4.6* B. On observe que les points semblent alignés suivant une droite de pente 4.3 ± 0.3 μm/pN passant par l'origine, c'est-à-dire que les *doigts* ressentent une contrainte de l'ordre de 250 pN/μm^2 . Des expériences couvrant de façon plus complète les forces contractiles que peuvent exercer les cellules sur les *doigts*, notamment les variations de force contractile inférieure à 0.5 pN, permettraient d'affiner cette évaluation.

Un grand avantage lié à l'existence d'une relation force-extension est la possibilité de mesurer des forces de façon non-invasive. En effet, la seule mesure d'une longueur de *doigt* à l'équilibre permet de déterminer la force contractile associée grâce à un tel diagramme.

A

[nocodazole] (μM)	L_{eq} (μm)	λ (μm)	$\Delta F_{contract}$ (pN)	χ^2
0.1	2.5 ± 0.1	7.1 ± 0.9	0.6 ± 0.1	8×10^{-4}
1	3.5 ± 0.1	6.6 ± 0.7	0.8 ± 0.1	3×10^{-3}
5	5.1 ± 0.1	7.2 ± 0.6	1.1 ± 0.1	6×10^{-3}
10	5.6 ± 0.2	7.0 ± 0.5	1.3 ± 0.1	10^{-2}
20	6.0 ± 0.1	6.6 ± 0.4	1.5 ± 0.1	6×10^{-3}

B

[nocodazole] (μM)	$< L_{110\,min} >$ (μm)	σ (μm)	$\frac{\sigma}{<L>}$
0	1.70	0.60	0.35
0.1	2.30	0.81	0.35
1	2.96	0.96	0.32
5	4.09	1.45	0.35
10	4.48	1.53	0.34
20	4.97	1.87	0.38

Tab. 4.2: **(A)** Ajustement des courbes de la figure 4.5. L_{eq} et λ sont obtenus par l'ajustement, la force est calculée à partir de ces paramètres et la force obtenue dans des expériences de croissance en l'absence de nocodazole est retranchée pour obtenir $F_{contract}$. **(B)** Valeurs moyennes $< L_{110\,min} >$ et écarts-types σ des distributions de *doigts* de la figure 4.5 B, 110 minutes après ajout de nocodazole. Le rapport $\frac{\sigma}{<L>}$ reste constant quelle que soit la concentration en nocodazole.

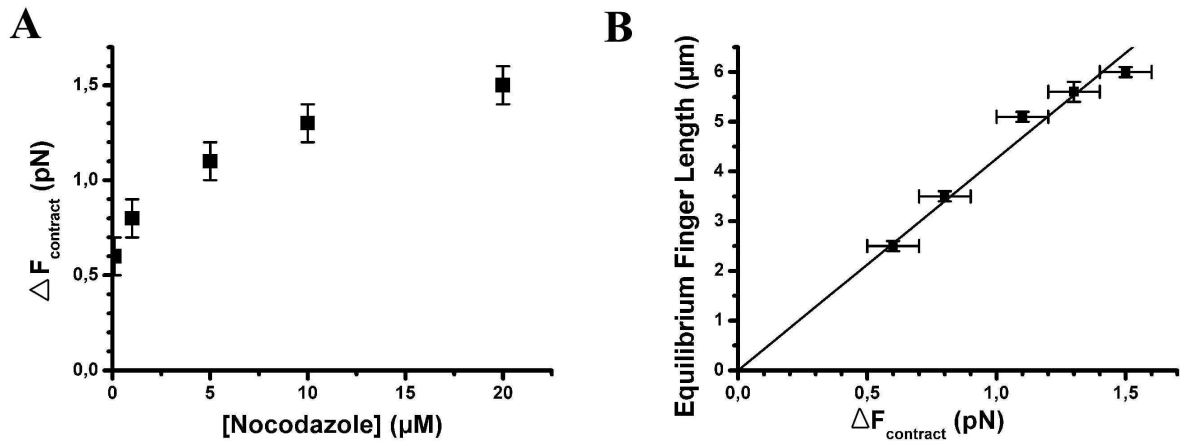


Fig. 4.6: **(A)** Évolution de la force de contractilité acto-myosine en fonction de la concentration en nocodazole. **(B)** Diagramme force-extension pour des *doigts*.

4.4 Conclusion

Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés à la croissance de jonctions adhérentes de type *doigts* lorsque la contractilité acto-myosine est activée par le nocodazole. Après ajout de nocodazole, les *doigts* croissent jusqu'à atteindre un plateau au bout de typiquement 3 heures. Nous nous sommes inspirés de la modélisation de la croissance de *doigts* proposée par Hélène Delanoë-Ayari *et al.* (Delanoe-Ayari *et al.*, 2004b) pour modéliser la croissance des *doigts* en présence de nocodazole.

Nous avons considéré non plus uniquement la polymérisation de filaments d'actine parallèles contre la membrane cellulaire de la cellule donneuse mais également la traction de la cellule receveuse par l'intermédiaire de fibres *de stress* se terminant au niveau des *doigts* (voir figure 3.1), ainsi que la déformation résistive du réseau d'actine de la cellule donneuse sous cette traction. La croissance des *doigts* en présence de nocodazole est alors vue comme une réponse cellulaire à un échelon de force contractile. D'après cette hypothèse, l'ajout de nocodazole entraîne une augmentation immédiate de la contractilité, induisant la croissance des *doigts* déjà existant. Cette croissance se poursuit jusqu'à ce qu'un autre équilibre de force soit atteint.

Un résultat remarquable est que la longueur des *doigts* à l'équilibre dépend de la concentration de nocodazole. En d'autres termes, la contractilité acto-myosine des cellules peut être changée continûment en variant la concentration de nocodazole. Ce résultat nous permet donc d'explorer les réponses cellulaires au niveau des *doigts* en fonction de la force contractile appliquée sur ces *doigts*. La courbe de croissance temporelle des *doigts* jusqu'au plateau peut être comparée à la modélisation de la croissance des *doigts*. Les paramètres de cette modélisation peuvent être ajustés sur les courbes de croissance expérimentales et la comparaison avec les paramètres obtenus lors de l'ajustement sur les courbes de croissance *de novo* des *doigts* mène à l'évaluation de la variation de force de contractilité acto-myosine appliquée par la cellule receveuse.

La fixation de monocouches cellulaires à des temps différents d'incubation en nocodazole permet d'obtenir en une fois une représentation statistique de la croissance de *doigts* au cours du temps. En faisant l'hypothèse ergodique, cette expérience donne la même représentation statistique que celle qu'on aurait obtenue en faisant suffisamment d'expériences de croissance sur des cellules vivantes, c'est-à-dire en suivant des *doigts* bien définis

sur la durée de croissance. De plus, les expériences en échantillons fixés évitent les artéfacts obtenus lorsque l'expérimentateur choisit des *doigts* à suivre.

L'ajustement des courbes de croissance expérimentales par la loi de croissance obtenue par la modélisation donne accès aux forces contractiles ressenties par chaque filament d'actine polymérisant dans les *doigts*. Le tracé de la longueur des doigts à l'équilibre en fonction des forces contractiles obtenues par l'ajustement des courbes de croissance donne une relation force-extension des jonctions adhérentes de type *doigt* apparemment linéaire de pente 4.0 ± 0.5 μm/pN.

Les *doigts* sont donc des mécanosenseurs capables de rendre compte de l'état de contractilité interne de la cellule. Connaissant le diagramme force-extension des *doigts*, la mesure de longueurs de *doigts* à l'équilibre constitue une mesure de forces contractiles non-invasive. On peut rapprocher ces résultats sur les jonctions adhérentes de résultats obtenus sur d'autres contacts adhésifs dont la taille est également reliée à la force appliquée par la contractilité acto-myosine : les contacts focaux. Le tracé du diagramme force-extension pour ces mécanosenseurs permet d'évaluer une contrainte d'environ 5nN/μm^2 ressentie par les contacts focaux (Balaban *et al.*, 2001). Dans notre cas, en considérant que les *doigts* ont une largeur constante de 100nm et sont constitués d'environ 100 filaments d'actine, nous obtenons une contrainte ressentie par les *doigts* d'environ 250pN/μm^2. Cela correspond à des forces appliquées par les fibres *de stress* sur un *doigt* de quelques centaines de pN contre plusieurs nN par contact focal selon Balaban *et al.* (Balaban *et al.*, 2001). Cependant, les types cellulaires utilisés sont très éloignés (cellules endothéliales dans notre cas et fibroblastes) et peuvent présenter des états de contractilité très différents. De plus, les deux mécanosenseurs font intervenir des protéines d'adhésion et de liaison au cytosquelette différentes. Même si le mécanisme de croissance pourrait être similaire, la sensibilté aux forces dans les deux cas peut différer uniquement à cause de la différence de composition. L'explication de la mécanosension des contacts focaux et la recherche d'un mécanisme de croissance des contacts focaux sous force font l'objet de travaux toujours en cours. Nous présenterons les méthodes utilisées pour répondre à ces questions ainsi que les résultats obtenus jusqu'à présent en Annexe (A) de ce document.

Conclusion

Durant cette thèse, nous avons étudié la croissance de contacts cellulaires à la symétrie brisée. Nous revenons sur les principaux résultats avant de conclure sur les perspectives ouvertes par ce travail.

Dans une première partie, nous nous sommes intéressés à la formation des jonctions adhérentes de type *doigt*. Les *doigts* sont allongés, perpendiculaires à l'interface entre les cellules en contact et situés d'un côté de cette interface. Nous avons utilisé cette asymétrie pour définir les notions de cellule *donneuse* et de cellule *receveuse*. La cellule donneuse initie le contact en projetant un lamellipode sur la cellule receveuse pour mettre en contact les membranes des deux cellules. La présence de faisceaux de filaments d'actine dans le lamellipode de la cellule donneuse est une condition indispensable à la formation des doigts. En effet, les expériences de surexpression de protéines liées à l'actine ont montré que tant que ces précurseurs d'actine existent, les *doigts* continuent à se former. En revanche, la surexpression de Rac constitutivement actif a pour conséquence la disparition des précurseurs et les *doigts* ne se forment plus au profit de structures adhérentes continues de composition très similaire qu'on a appelées *nappes*. Une fois le contact initié, la cellule receveuse peut assembler des fibres *de stress* se terminant au niveau des *doigts*. Des expériences d'inhibition et d'activation de contractilité acto-myosine ont montré respectivement une disparition et un allongement supplémentaire des *doigts*. De plus, l'application d'une force locale a permis la croissance locale de *doigts*. Ceci suggère que la cellule receveuse peut appliquer une force sur les contacts *doigts* pour les stabiliser et réguler ainsi leur longueur à l'équilibre. Nous proposons que la longueur des *doigts* dépend d'une part de la force de traction due à la contractilité acto-myosine de la cellule receveuse, et d'autre part de la force de polymérisation des filaments d'actine, de la résistance de la membrane plasmique et de la résistance à la déformation du réseau d'actine de la cellule donneuse.

Dans une seconde partie, nous avons utilisé la propriété de croissance des *doigts* lorsque la contractilité acto-myosine est activée pour mettre au point une expérience de mesure de force appliquée sur les jonctions adhérentes. Nous avons montré que la longueur sta-

tionnaire des *doigts* augmente avec la concentration de nocodazole utilisée pour activer la contractilité. La modélisation de croissance des *doigts* développée par Delanoë-Ayari *et al.* (Delanoe-Ayari *et al.*, 2004b) a été adaptée pour tenir compte de toutes les forces mises en jeu dans la croissance de *doigts* induite par le nocodazole. L'ajustement des courbes de croissance expérimentales par cette modélisation permet de déduire les forces supplémentaires dues à la contractilité acto-myosine en présence de nocodazole. Nous avons estimé des variations de force allant de 0.6 pN à 1.5 pN par filament pour des concentrations de nocodazole variant entre 100 nM à 20 μM, ce qui correspond à des forces supplémentaires de l'ordre d'une centaine de pN par *doigt*. Ces estimations, mises en relation avec les longueurs moyennes de *doigts* à l'équilibre, ont permis de tracer la diagramme force-extension des *doigts*. En première approximation, les points obtenus sont alignés suivant une droite passant par l'origine de pente 4.3 ± 0.3 μm/pN. Puisque nous avons supposé que les *doigts* ont un diamètre de 100 nm, les *doigts* ressentent une contrainte de l'ordre de 250 pN/μm^2.

Au-delà de la caractérisation force-extension des jonctions adhérentes en tant que mécanosenseur, nous pouvons proposer un mécanisme d'assemblage des jonctions adhérentes sous traction. Une fois que la cellule donneuse a provoqué la mise en contact des membranes des deux cellules voisines, des cadhérines des deux cellules interagissent. Ces cadhérines ont tendance à s'agréger au niveau des précurseurs denses en actine de la cellule donneuse. La cellule receveuse assemble alors des faisceaux d'actine contractiles se terminant au niveau des *doigts* en formation. L'application d'une force de traction par la cellule receveuse au niveau des *doigts* stabilise le lamellipode de la cellule donneuse. L'intensité de cette force détermine alors la longueur finale du *doigt* en croissance. Le mécanisme exact provoquant l'allongement des faisceaux d'actine formant le *doigt* n'est pas connu mais l'hypothèse que nous avons utilisée dans la modélisation est que l'application d'une force sur le *doigt* facilite l'insertion de monomères d'actine au bout polymérisant des faisceaux de filaments d'actine. Les expériences de croissance de comètes d'actine *in vitro* par Marcy *et al.* (Marcy *et al.*, 2004) vont dans le sens de cette hypothèse. Le cytosquelette d'actine, sous forme de réseau polymérisant et de fibres *de stress*, jouerait donc un rôle central dans la mécanosension des jonctions adhérentes.

Une partie des travaux de cette thèse concernait la croissance des contacts focaux induite par l'application d'une force. Nous sommes capables de visualiser de telles croissances à tous les « étages » des contacts focaux, c'est-à-dire de suivre, généralement individuellement, l'actine, les protéines de liaison au cytosquelette, les intégrines et un de leur ligands,

la fibronectine. L'existence d'inhomogénéités dans les contacts focaux permet de suivre l'évolution de points donnés à l'intérieur des contacts focaux en croissance. Les résultats obtenus semblent indiquer que le treadmilling de l'actine provoque un treadmilling, mais de vitesse plus faible, dans les agrégats d'intégrine ou de protéines de liaison comme la vinculine. Nous n'avons pas remarqué de tels phénomènes au niveau de la fibronectine mais nous avons été capables de mettre en évidence une incorporation de fibronectine dans les contacts focaux en croissance. Nous ne pouvons donc pas pour l'instant proposer de mécanisme d'assemblage des contacts focaux sous force.

Une dernière partie vise à comparer la croissance d'agrégats entre des systèmes actifs et passifs. Le système passif consiste en une assemblée de colloïdes superparamagnétiques à deux dimensions. L'application d'un champ magnétique externe induit des dipôles magnétiques dans les colloïdes. Les colloïdes se repoussent alors, formant des réseaux cristallins. La connaissance du champ magnétique externe permet de déduire une température équivalente du système lors de la cristallisation hors équilibre. Le contrôle de ce champ détermine la cinétique de croissance des zones cristallines. Les lois de croissance expérimentales sur ce système passif peuvent être *a priori* comparées aux lois de croissance d'agrégats de protéines d'adhésion dans les jonctions adhérentes ou les contacts focaux afin de déterminer les températures équivalentes de croissance de ces systèmes actifs.

Ces travaux ont été basés sur une caractérisation à l'échelle mésoscopique du comportement de mécanosenseurs. Sans connaître le détail moléculaire ni les interactions précises des protéines mises en jeu dans la croissance de contacts cellulaires, nous avons pu modéliser la croissance des jonctions adhérentes de type *doigt* à partir d'ingrédients mésoscopiques. Un certain nombre de questions sont néanmoins laissées sans réponse. Les travaux sur les contacts focaux pourraient être poursuivis pour déterminer comment se déroule l'assemblage des contacts focaux en croissance. Les techniques de suivi d'inhomogénéités de fluorescence pourraient être appliquées aux faisceaux de filaments d'actine des *doigts*. Cela permettrait de déterminer si notre hypothèse de croissance des filaments d'actine dans les *doigts* est valable. Plus généralement, puisque les contacts focaux et les jonctions adhérentes sont des mécanosenseurs faisant intervenir l'actine, la comparaison des comportements sous force de ces deux types de zones adhésives pourrait mettre en évidence un mécanisme général de renforcement de structures en réponse à une force appliquée. Dans le cas des jonctions adhérentes, une cellule se sert de la polymérisation d'actine alors que sa voisine utilise la contractilité acto-myosine pour assembler les contacts. Pour les

contacts focaux, il se pourrait que la cellule mette en oeuvre à la fois ces deux propriétés de l'actine pour assembler ses contacts avec un substrat, tout en conservant un mécanisme similaire aux jonctions adhérentes.

Croissance de contacts focaux

Cette partie est consacrée à la description des résultats obtenus dans l'étude de la croissance des contacts focaux. Ces travaux ne sont pas achevés et nous allons présenter leur état d'avancement ainsi que leur évolution prévue.

A.1 Introduction

De nombreux travaux ont été menés sur l'assemblage des contacts focaux (voir la section 1.3.2). Des résultats marquants ont montré que les contacts focaux croissent lorsqu'une force leur est appliquée (Riveline *et al.*, 2001). Cette force peut provenir de la traction des fibres *de stress* lorsque la contractilité acto-myosine est activée mais peut être remplacée par une contrainte de cisaillement externe, comme l'application d'un cisaillement avec une micropipette. Cette croissance n'est pas une simple déformation du contact focal, mais des protéines membranaires d'adhésion et des complexes protéiques de liaison au cytosquelette sont également recrutées. Ce renforcement de contacts sous force fait partie d'une classe de phénomènes cellulaires qu'on appelle « mécanosension ».

La mécanosension des contacts focaux n'est pas encore comprise même si plusieurs hypothèses ont été avancées pour l'expliquer. Les premières explications reposent sur les propriétés d'élongation de la fibronectine, un ligand de certaines classes d'intégrines : sous l'effet d'une force, les polymères de fibronectine peuvent s'étirer et révéler de nouveaux sites d'adhésion permettant le recrutement de nouvelles intégrines (Zhong *et al.*, 1998). D'autres modèles théoriques supposent que le mécanosenseur est partie intégrante du contact focal sans pour autant le nommer explicitement. Des considérations menées à partir de la thermodynamique du recrutement protéique ou de l'élasticité des contacts focaux et de leur substrat prédisent des mécanismes de croissance des contacts focaux (voir la section 1.3.4).

La question que nous nous sommes posés est de comprendre quelle partie du contact fo-

cal joue le rôle de mécanosenseur et de mettre en évidence le mécanisme d'auto-assemblage du contact focal sous force. Pour cela, nous avons observé la croissance de contacts focaux à l'aide de mutants fluorescents des protéines les composant. Nous avons ainsi observé successivement les différents « étages » des contacts focaux : l'actine, les protéines de liaison au cytosquelette d'actine (vinculine, zyxine), les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et la fibronectine.

A.2 Principe des expériences

Dans toute cette étude, nous avons utilisé des cellules SV80 qui forment en conditions standard des contacts focaux allongés d'environ 2 μm. La condition initiale de toutes les expériences est une condition sans sérum dans laquelle la contractilité acto-myosine est réduite et les contacts focaux apparaissent ponctuels. Selon les expériences, nous avons utilisé une activation de la contractilité acto-myosine par le nocodazole (Bershadsky *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1998), l'application d'une contrainte de cisaillement par une micropipette (Riveline *et al.*, 2001) ou simplement l'ajout de sérum dans le milieu de culture pour induire la croissance des contacts focaux (voir figure A.1).

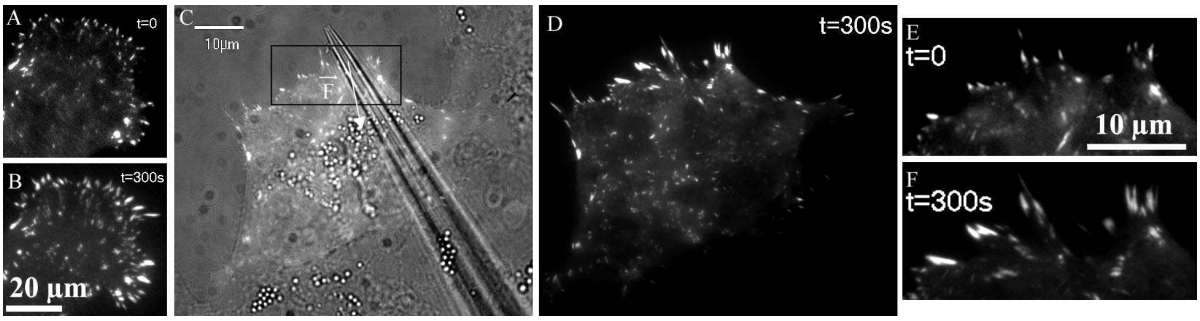


Fig. A.1: **Croissance induite de contacts focaux.** À partir de conditions initiales sans sérum pour lesquelles les contacts focaux sont ponctuels (A, C, E), la croissance peut être induite par l'ajout de nocodazole (B) ou l'application d'une contrainte de cisaillement par une micropipette (D, F). L'image en contraste de phase de la pipette est superposée avec le signal de fluorescence de vinculine-GFP en C et la flèche indique la direction d'application de la force. 300 s plus tard, les contacts initialement ponctuels se sont allongés (D, F). E et F sont des zooms respectivement de C et D, de la zone marquée par un cadre sur E.

L'observation de la croissance des contacts focaux était réalisée généralement à l'aide d'un montage en ondes évanescentes permettant de n'imager que les protéines fluorescentes situées au voisinage de la lamelle de verre. Cette technique permet de s'affranchir de tout le fond de fluorescence du aux protéines ne participant pas aux contacts et diffusant librement dans le cytoplasme ou la membrane plasmique. Les contacts focaux apparaissent alors avec un contraste bien meilleur qu'en épi-fluorescence (voir la figure 2.1).

A.2.1 Suivi d'inhomogénéités

Les contacts focaux sont généralement décrits par la localisation des protéines les composant, sans prêter attention à l'homogénéité des protéines sur la surface du contact. Or, un marquage de protéines des contacts focaux révèle des inhomogénéités observables également avec des mutants fluorescents de ces protéines. Ces inhomogénéités peuvent être constitutives dans le cas des intégrines ou des protéines de liaison au cytosquelette : le marquage des protéines ou l'utilisation de mutants fluorescents de ces protéines mettent en évidence des répartitions similaires (voir figure A.2). Dans le cas de l'actine, ce sont les inhomogénéités d'incorporation des monomères fluorescents et non-fluorescents que nous repérons ainsi.

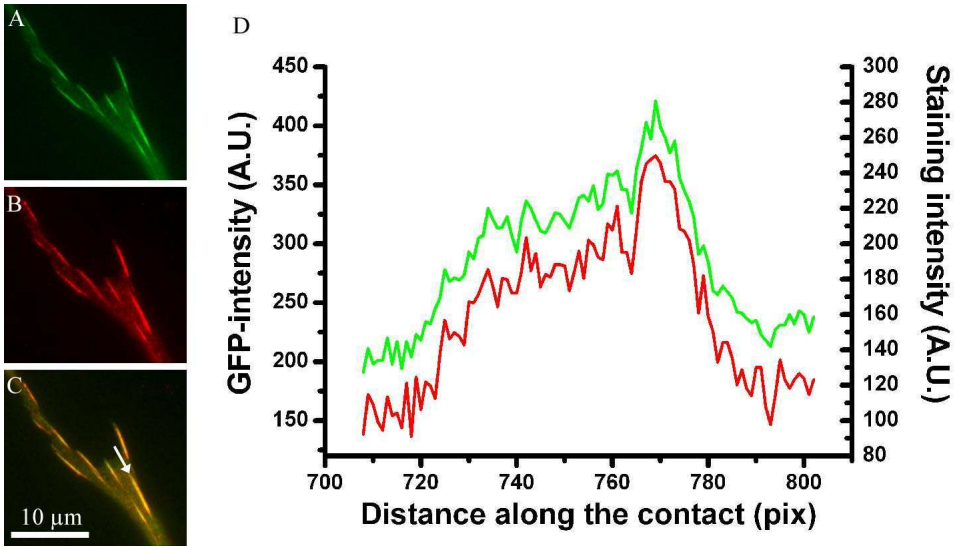


Fig. A.2: Comparaison des profils d'intensité de vinculine-GFP (A) et d'un marquage de la vinculine (B) le long d'un contact indiqué par une flèche sur l'image superposée C. Les inhomogénéités d'intensité sont semblables dans les 2 cas (D).

Dans tous les cas, le point important concernant ces inhomogénéités est qu'elles sont relativement stables dans le temps et qu'il est donc possible de les suivre durant un évènement de croissance de contact focal. Pour aligner les images d'une séquence d'observation, on ajoute des billes fluorescentes de 100 nm de diamètre à l'échantillon lors de l'observation. Ces billes s'adsorbent sur la lamelle de verre sans interagir avec les cellules et permettent d'aligner précisément une séquence d'images. L'alignement est une procédure obligatoire quand on veut être certain que les déplacements d'inhomogénéités observés ne sont pas un artefact dû à un mouvement d'ensemble parasite de l'échantillon.

Cette stabilité temporelle des inhomogénéités permet donc de suivre l'évolution de

points particuliers du contact focal au cours de la croissance comme le permettrait un photoblanchiment local du contact. Afin de faire la différence entre plusieurs comportements possibles des contacts focaux, nous allons tracer des diagrammes temps-espace qu'on nommera dans la suite *kymographes*. Le principe en est simple : pour chaque temps, on trace le profil d'intensité suivant le grand axe du contact en codant les intensités de fluorescence par des couleurs ou des niveaux de gris. À un temps donné correspond donc une ligne suivant la coordonnée d'espace. Les temps successifs correspondent aux lignes successives du *kymographe*. Nous utiliserons les *kymographes* pour présenter nos résultats dans la suite de cette partie. Les différents comportements des contacts focaux sont résumés sur la figure A.3 :

- le glissement : le contact se déplace en bloc. Il conserve une longueur constante et ses extrémités se déplacent de la même façon que les inhomogénéités (voir figure A.3 A).
- le *treadmilling* : le contact garde une longueur constante et ne se déplace apparemment pas. Ses extrémités restent immobiles mais les inhomogénéités se déplacent à l'intérieur du contact (voir figure A.3 B).
- la déformation : le contact croît en apparence. Une extrémité du contact reste fixe alors que l'autre se déplace. Les inhomogénéités se déplacent d'autant plus qu'elles sont proches de l'extrémité en déplacement (voir figure A.3 C).
- le recrutement : le contact croît. Une extrémité et les inhomogénéités restent fixes alors que l'autre extrémité se déplace et que d'autres inhomogénéités peuvent apparaître au niveau de l'extrémité croissante (voir figure A.3 D).

Nous avons préféré utiliser les inhomogénéités constitutives des contacts plutôt que des méthodes comme de photoblanchiment local de fluorophores pour suivre la dynamique interne des contacts focaux. Nous avons commencé par utiliser des techniques de FRAP mais le retour de fluorescence était trop rapide pour suivre un point blanchi dans le contact plus de quelques secondes. Ce temps est trop court par rapport au temps caractéristique de croissance des contacts focaux (de l'ordre de la dizaine de minutes). Un retour de fluorescence aussi rapide après photoblanchiment est signe que les protéines constituant le contact ne sont pas fixes mais constamment renouvelées.

Par l'analyse des kymographes correspondant aux différents étages des contacts focaux (actine, protéines de liaison, intégrines et fibronectine), nous espérons pouvoir déduire

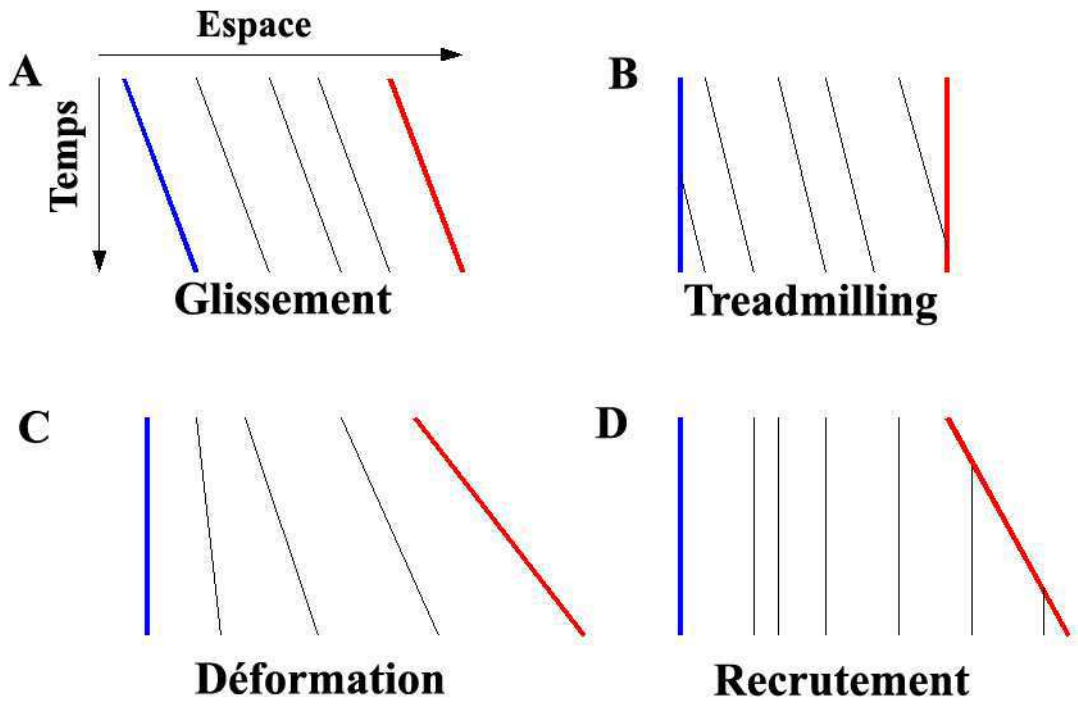


FIG. A.3: **Principe des kymographes**. Les profils d'intensité le long d'un contact sont tracés sur une ligne horizontal et répétés pour chaque temps verticalement. L'analyse du déplacement des extrémités du contact (pointant vers l'extérieur (en bleu) et vers l'intérieur (en rouge) de la cellule) et des inhomogénéités du contact (en noir) permet de définir 4 comportements distincts : glissement (A), *treadmilling* (B), déformation (C) et recrutement (D).

comment la croissance a lieu et quel est élément jouant le rôle de mécanosenseur dans le contact focal. Dans toute cette partie nous garderons la convention suivante : le temps est repéré sur l'axe des ordonnées, l'extérieur de la cellule à gauche et l'intérieur à droite sur la coordonnée d'espace.

A.3 Résultats

Nous allons détailler dans cette section quelques séquences particulièrement démonstratives de suivi d'inhomogénéités en les séparant par « étages » du contact focal.

A.3.1 Actine

L'utilisation des ondes évanescentes permet de repérer uniquement les filaments d'actines présents à la surface basale de la cellule. De plus, l'expression d'actine-RFP (voir

figure A.4 B) conjointement avec la vinculine-GFP (voir figure A.5 A) permet de s'assurer que les filaments observés sont associés à un contact focal. Le *treadmilling* des filaments d'actine peut ainsi être observé au niveau des contacts focaux (voir en particulier la figure A.4 3) et on peut estimer sa vitesse à 1.5 ± 0.5 μm/s.

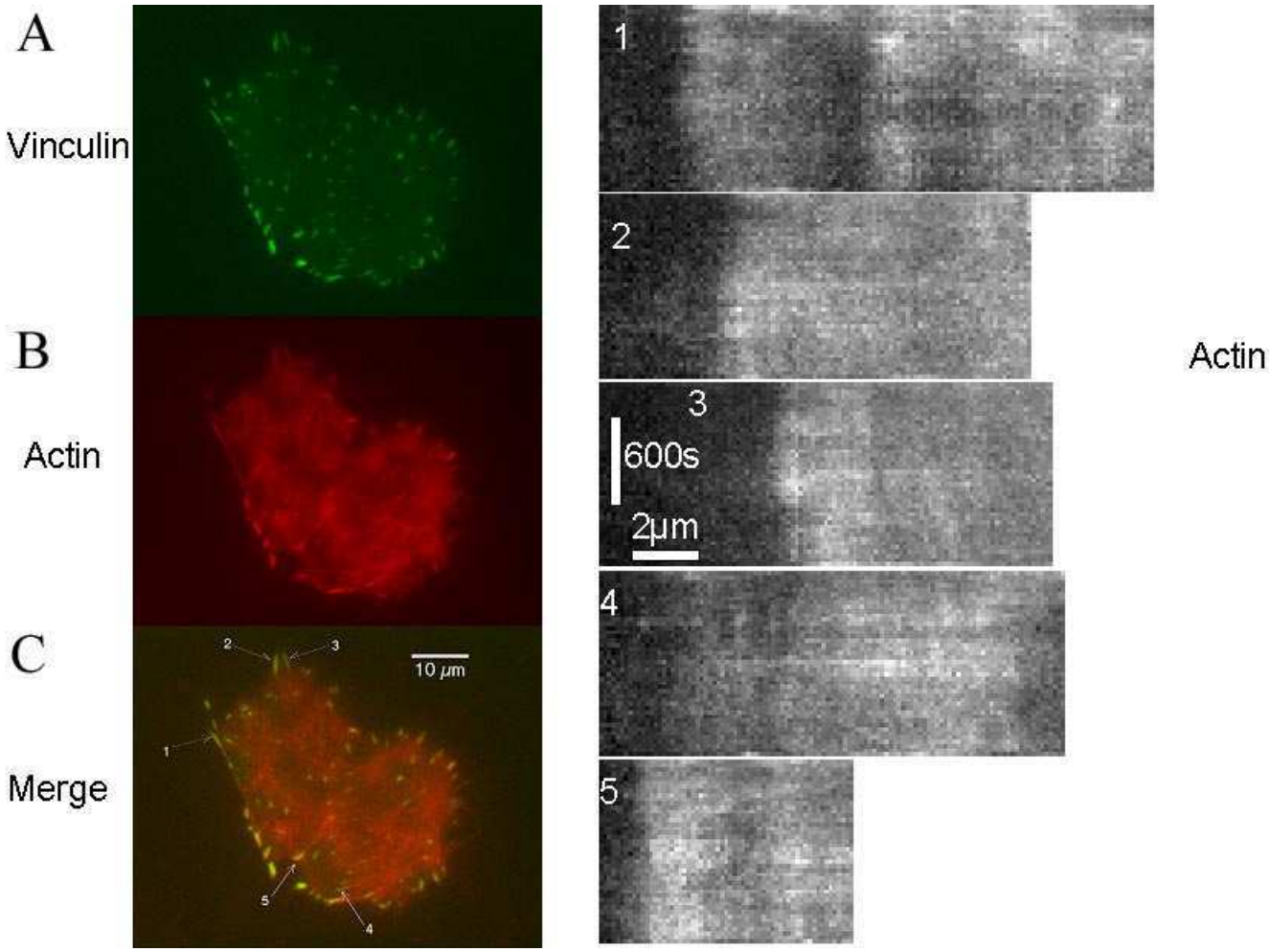


Fig. A.4: *Treadmilling* de l'actine au niveau de contacts focaux dans une cellule SV80 transfectée vinculine-GFP (A) et actine-RFP (B) après addition de 10 μM de nocodazole. La figure C est la superposition des signaux de fluorescence de l'actine et de la vinculine. Les figures 1 à 5 sont les kymographes d'actine-RFP des contacts repérés sur la figure C.

A.3.2 Vinculine

L'observation de croissance de contacts focaux repérés par la vinculine-GFP met en évidence la croissance des contacts vers l'intérieur de la cellule (voir figure A.5). Les inhomogénéités semblent adopter un mouvement de *treadmilling* semblable à celui de l'actine

mais avec une vitesse nettement plus faible (0.7 ± 0.3 nm/s).

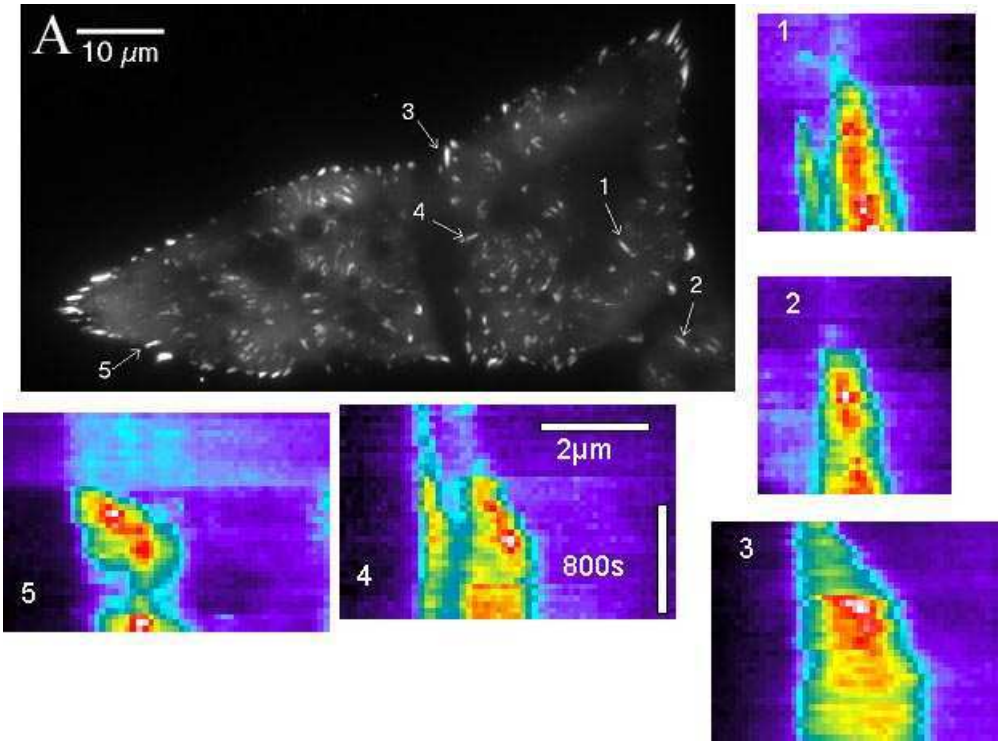


Fig. A.5: Croissance de contacts focaux observée sur une cellule SV80 transfectée vinculine-GFP après ajout de 10 μM de nocodazole (A). Les figures 1 à 5 sont les kymographes de vinculine-GFP des contacts repérés sur la figure A.

A.3.3 Intégrine

L'observation de croissances de contacts focaux dans des cellules SV80 exprimant la chaîne β_3-GFP de l'intégrine montre également un mouvement de *treadmilling* des inhomogénéités présentes au sein du contact avec une vitesse proche de celle de la vinculine (0.6 ± 0.3 nm/s, voir figure A.6).

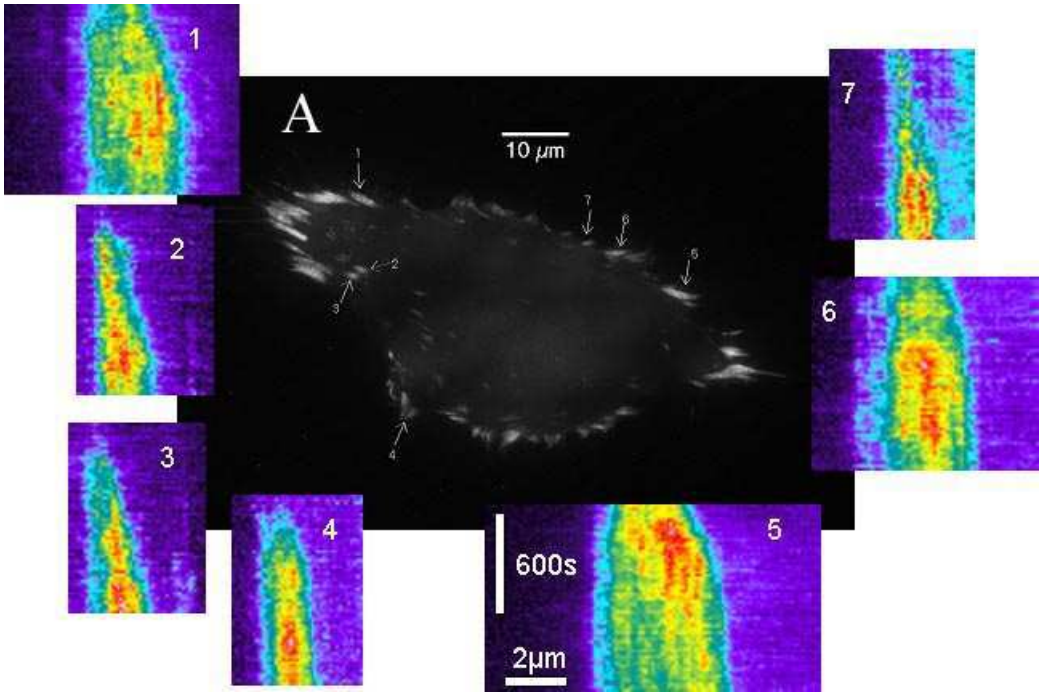


Fig. A.6: Croissance de contacts focaux observée sur une cellule SV80 transfectée intégrine-β_3-GFP après ajout de 10 μM de nocodazole (A). Les figures 1 à 7 sont les kymographes en intégrine-β_3-GFP des contacts repérés sur la figure A.

A.3.4 Fibronectine

L'utilisation de fibronectine marquée par l'Alexa-546 permet d'observer sur des cellules vivantes l'incorporation de la fibronectine au niveau des contacts focaux repérés par la vinculine-GFP (voir figure A.7). Cette expérience est le résultat d'une collaboration avec le groupe de Viola Vogel à Zurich. Les expériences visant à suivre l'incorporation de la fibronectine dans les contacts focaux nécessitent un protocole particulier. En effet, l'incorporation n'a pu être observée que lorsque la fibronectine d'origine bovine présente dans le sérum a été remplacée par de la fibronectine d'origine humaine. La séquence de la figure A.7 va à l'encontre de l'hypothèse selon laquelle la croissance des contacts passe par la révélation de sites de la fibronectine permettant le recrutement de nouvelles intégrines.

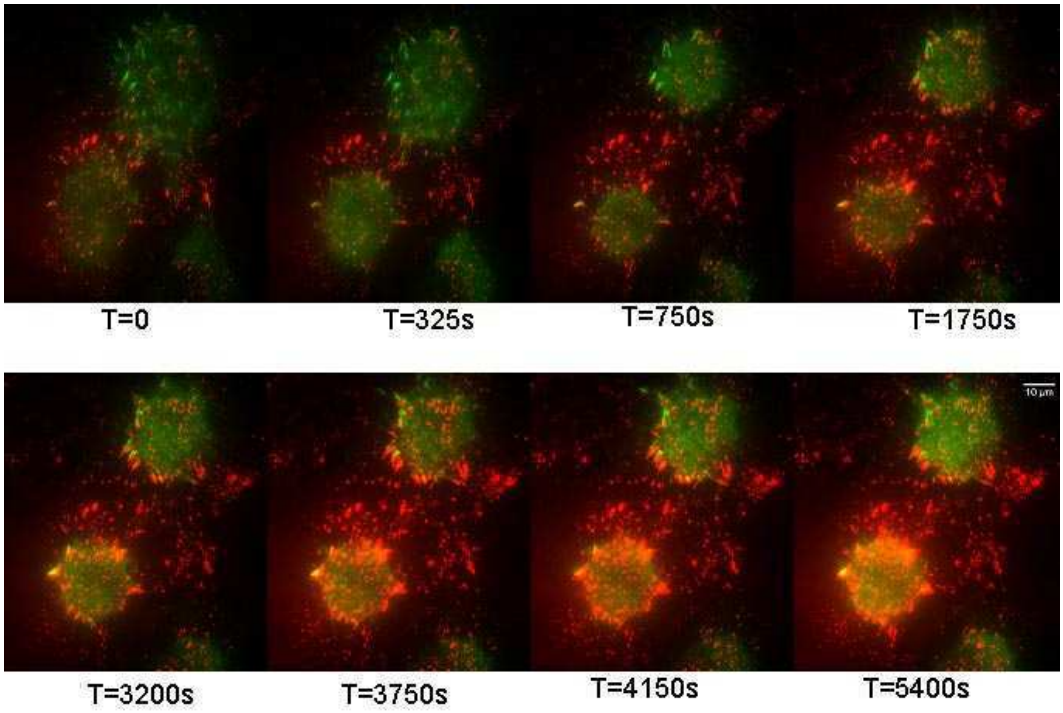


FIG. A.7: Croissance de contacts focaux observés sur des cellules SV80 transfectées vinculine-GFP (vert) après ajout de 10 μM de nocodazole. La fibronectine marquée rouge présente dans le milieu s'incorpore dans les contacts au fur et à mesure de la croissance.

A.4 Compréhension des résultats et poursuite du projet

Ces résultats semblent indiquer que le mécanosenseur permettant la croissance des contacts focaux n'est pas la fibronectine et il faut donc plutôt chercher à d'autres étages des contacts focaux (intégrines, protéines de liaison au cytosquelette, actine). La présence d'un mouvement de *treadmilling* des inhomogénéités repérées au sein des contacts focaux semble privilégier un mécanisme de croissance faisant intervenir l'actine. Ce *treadmilling* est plus lent pour les protéines membranaires d'adhésion et pour les protéines de liaison au cytosquelette d'actine que pour les filaments d'actine (voir tableau A.1). Ce résultat suggère que les filaments d'actine en *treadmilling* entraîne les protéines des autres étages du contact focal, à l'exclusion de la fibronectine qui reste fixe sur le substrat, expliquant ainsi les différences de vitesses de *treadmilling* observées.

Ces travaux font l'objet d'une collaboration avec le groupe de Sam Safran de l'Institut Weismann, Israël. Les données expérimentales de *kymographes* pourront être comparée avec leur modèle théorique décrivant la croissance des contacts focaux (Besser et Safran,

	vitesse de *treadmilling*	Nombre de contacts considérés
actine	1.7 ± 0.5 nm/s	8
vinculine	0.7 ± 0.3 nm/s	5
intégrine	0.6 ± 0.3 nm/s	6

Tab. A.1: Vitesse de *treadmilling* des inhomogénéités selon les différents étages du contact focal. La statistique de contacts considérés est également indiquée.

2006).

Nucléation et croissance de cristaux de colloïdes

Cette partie concerne les travaux effectués lors d'un séjour à l'Université de Konstanz (Allemagne) d'octobre à décembre 2003, dans le cadre du programme d'échange du Collège Franco-Allemand qui a financé cette thèse. Le séjour s'est déroulé dans l'équipe de physique de la matière molle dirigée par le professeur Georg Maret. Les travaux ont été réalisés en collaboration avec le docteur Urs Gasser.

Le but de ce projet est comparer les lois de croissance de contacts cellulaires (système actif) avec les lois de croissance de cristaux de colloïdes en deux dimensions (système passif).

B.1 Introduction et méthodes expérimentales

B.1.1 Cristaux de colloïdes à 2 dimensions

Les systèmes de colloïdes sont très utilisés pour étudier la nucléation et la croissance de cristaux. Des colloïdes de quelques μm de diamètres sont facilement observables en microscopie visible. De plus, les temps caractéristiques de la dynamique des colloïdes sont de l'ordre de la seconde et donc très accessibles par acquisition classique de microscopie. Diverses techniques peuvent être utilisées pour « mimer » les interactions entre atomes ou molécules conduisant à des processus de cristallisation (colloïdes chargés, interactions de sphères dures, interactions magnétiques). Tout ceci fait que les colloïdes constituent des systèmes de choix pour étudier les transitions de phase de cristallisation.

Dans les années 70, Kosterlitz et Thouless ont mis au point une théorie de fusion de cristaux à 2 dimensions dans laquelle la transition de phase est conduite par l'apparition de défauts (Kosterlitz et Thouless, 1973). Cette théorie a été développée par la suite par Halperin, Nelson et Young, qui ont montré que le passage d'une phase cristalline (voir figure B.1 B) à une phase fluide (voir figure B.1 D) se faisait par deux transitions de phase

du second ordre, faisant intervenir une phase intermédiaire dite *hexatique* (voir figure B.1 C ; (Nelson et Halperin, 1979; Young, 1979)). À cause des difficultés pour réaliser un système expérimental « propre » à deux dimensions, il a fallu attendre une dizaine d'années pour obtenir une confirmation expérimentale de ce scénario (Murray et van Winkle, 1987; Murray et Wenk, 1989; Kusner *et al.*, 1994). Des preuves expérimentales quantitatives ont été obtenues pour un système de particules colloïdales confinées à l'interface eau-air d'une goutte pendante (Zahn *et al.*, 1997; Zahn *et al.*, 1999).

Nous avons utilisé ce dernier système développé au laboratoire de physique de Konstanz. Des colloïdes super-paramagnétiques d'un diamètre d'environ 4.5 μm sont confinés par gravité à l'interface eau-air d'une goutte pendante (voir figure B.1 A). L'application d'un champ magnétique externe induit l'apparition d'un dipôle magnétique dans chaque colloïde. Si le champ magnétique est perpendiculaire à l'interface eau-air, tous les dipôles magnétiques sont parallèles et les colloïdes se repoussent. La densité des colloïdes est telle que les dipôles magnétiques induits sont suffisamment proches pour interagir mais que les colloïdes sont suffisamment éloignés les uns des autres pour ne jamais entrer en collision. La distance moyenne entre colloïdes est alors d'environ 10 μm. L'intensité du champ magnétique, permet de contrôler la force de l'interaction entre dipôles et donc la « température équivalente » du système de colloïdes. Plus le champ magnétique est fort, plus les colloïdes se repoussent et plus la température équivalente est donc basse. L'état de phase du système de colloïdes peut donc être ajusté avec précision par le champ magnétique. Pour des forts champs, les colloïdes vont se placer de manière à former un réseau cristallin de symétrie hexagonale (voir figure B.1 B). La diminution progressive du champ magnétique va provoquer tout d'abord l'apparition de dislocations (perte de l'ordre translationnel à courte portée, phase hexatique représentée sur la figure B.1 C) puis de disinclinaisons (perte de l'ordre rotationnel à courte portée, phase fluide représentée sur la figure B.1 D). Une régulation en temps réel des paramètres de la goutte (élimination des vibrations, stabilité du champ magnétique, de l'inclinaison de l'interface, compensation de l'évaporation) permet d'atteindre des durées de stabilité de l'ordre de 10^6s (plusieurs jours voire plusieurs semaines) d'un échantillon de colloïdes.

L'augmentation brutale du champ magnétique appliqué à un système de colloïdes en phase fluide, proche de la transition de phase, correspond à un refroidissement important du système. Cette mise hors-équilibre du système dans la phase cristalline va permettre la nucléation et la croissance de cristaux à l'intérieur de la phase fluide. Des temps carac-

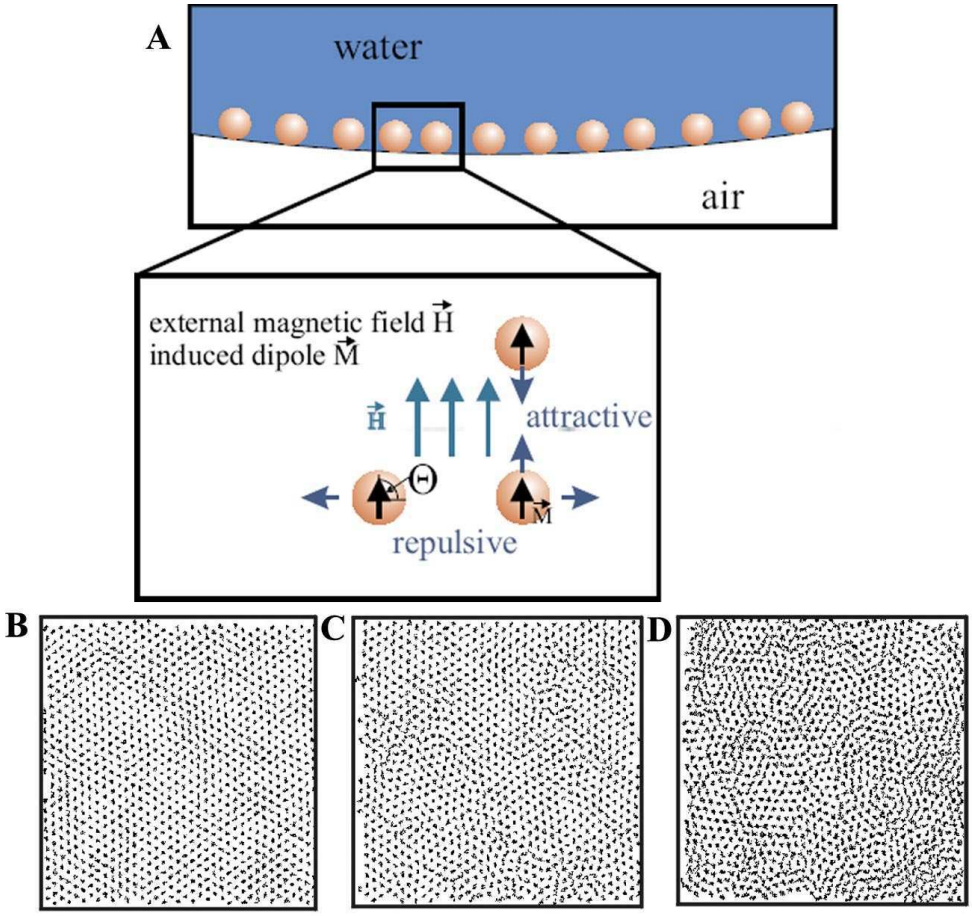


FIG. B.1: **(A)** Schéma de principe : des colloïdes super-paramagnétiques sont confinés par gravité à l'interface eau-air d'une goutte pendante. L'application d'un champ magnétique extérieur perpendiculaire à l'interface induit une répulsion entre colloïdes. La variation du champ magnétique contrôle les interactions entre colloïdes et permet de former des phases cristalline (B), hexatique (C) ou fluide (D).

téristiques de croissance de l'ordre de 10^3s permettront de caractériser la croissance des cristaux au cours du temps dans un système passif.

B.1.2 Agrégation de complexes adhésifs

Lors d'un phénomène de nucléation et croissance de contacts adhésifs cellulaires, on observe une agrégation de protéines membranaire d'adhésion au niveau des contacts. Il existe alors deux phases de protéines d'adhésion : une phase peu dense de protéines qui diffusent librement dans la membrane et une phase très dense de protéines agrégées formant le contact. On peut alors voir la formation de contact comme un processus de cristallisation à deux dimensions sous l'influence d'une température effective imposée par le cytosquelette d'actine qui guide cette formation. De Gennes *et al.* ont proposé des lois d'échelle concer-

nant la croissance de zones adhésives entre une vésicule recouverte de protéines d'adhésion et une surface recouverte de ligands (voir la section 1.2.1,(De Gennes *et al.*, 2003)).

L'utilisation de protéines membranaires d'adhésion liées à la GFP ou l'un de ses mutants permet de suivre en temps réel la croissance des zones adhésives entre une cellule et une surface ou entre deux cellules. L'idée de ce projet est de comparer les courbes expérimentales de croissance de zones adhésives cellulaires (système actif) avec les courbes de croissance de cristaux de colloïdes à deux dimensions (système passif) pour déterminer une température effective lors de l'agrégation de protéines membranaires et pour mettre en évidence les différences du processus de cristallisation entre un système actif et un système passif.

B.2 Résultats

Un système de colloïdes à deux dimensions en phase fluide est amené près de la transition de phase avec la phase hexatique. Une augmentation brutale du champ magnétique provoque la nucléation et la croissance de cristaux de colloïdes.

B.2.1 Acquisition des données

Une goutte pendante cylindrique est formée dans un anneau de diamètre 8 mm dont la partie supérieure est fermée. La régulation du volume de la goutte permet de former une interface eau-air dont la planéité est contrôlée à 1μm près. Les colloïdes sont confinés à cette interface par gravité et sont observés par microscopie optique. Le champ d'observation fait environ 300 μm de côté, ce qui permet d'observer environ 3000 colloïdes. Ce champ d'observation est situé dans la zone centrale de l'échantillon afin d'éviter tout effet de bord. La fréquence d'acquisition est de 3 images par seconde et les positions du centre des colloïdes sont extraites en temps réel et enregistrées. Ce sont ces données de position que nous utiliserons par la suite pour détecter et suivre la croissance des cristaux.

B.2.2 Détection des cristaux

Le principal problème est de trouver de bons critères pour définir quelles sont les particules formant des cristaux. On appellera ces particules, des *particules cristallines* dans la suite de cette partie. Puisque l'ordre cristallin est hexagonal en 2 dimensions, toutes les particules cristallines ont 6 voisines. Ce critère permet de faire un premier tri parmi les colloïdes de l'échantillon. Le calcul du paramètre d'ordre rotationnel $\sum_j \exp(6i\theta_j)$ où j repère les particules voisines de la particule considérée et θ_j l'angle modulo $\frac{\pi}{3}$ que forme le lien entre deux particules avec une direction arbitraire (mais identique pour toutes les particules), permet d'évaluer l'écart à la cristallinité de l'environnement d'une particule. La définition d'un écart limite à la cristallinité permet de déterminer quelles sont les particules cristallines.

Afin de distinguer deux cristaux voisins en contact, nous avons besoin d'un critère supplémentaire. Le calcul du paramètre d'ordre rotationnel permet aussi de définir une orientation cristalline des particules. Deux particules cristallines voisines vont alors faire partie du même cristal si et seulement si leurs orientations cristallines sont suffisamment proches. L'itération de ce critère sur toutes les particules cristallines va conduire à l'identification de cristallites dont on pourra suivre la croissance au cours du temps.

B.2.3 Analyse des résultats

La figure B.2 rend compte d'une séquence de nucléation et croissance. Dans cette expérience le champ magnétique a été conservé suffisamment proche de la transition de phase pour ne pas générer une nucléation et croissance trop rapide. La figure B.2 A représente les positions de toutes les particules cristallines du champ d'observation à intervalles réguliers de 60 s. On voit sur cette séquence que les cristaux isolés déjà apparus au bout de 60 s, croissent, se rencontrent et éventuellement fusionnent.

L'évolution temporelle du nombre de cristallites est tracée sur la figure B.2 B. Les premiers cristaux apparaissent au bout de quelques secondes et la période de nucléation continue pendant une quarantaine de secondes. Ensuite le nombre de cristallites reste constant, voire décroît au bout de 70 s environ. Cette décroissance s'explique par la fusion de cristallites entrés en contact. La croissance proprement dite est représentée sur la figure B.2 C où l'évolution temporelle du nombre moyen de particules par cristallites est

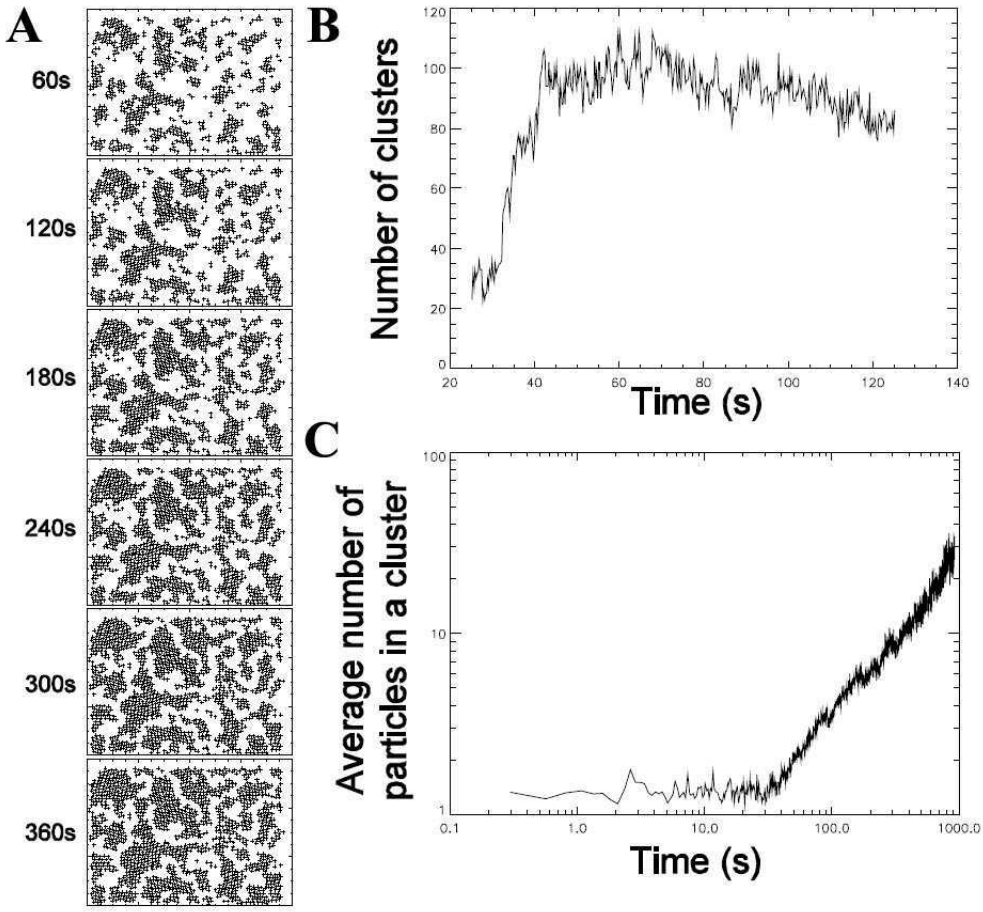


Fig. B.2: **Séquence de nucléation et croissance de cristallites. (A)** Position des particules cristallines à intervalles de 60 s. **(B)** Nombre de cristallites en fonction du temps dans la séquence représentée en A. **(C)** Nombre moyens de particules par cristallite en fonction du temps dans la séquence A.

tracée. Durant les trente premières secondes, on n'assiste qu'à la nucléation de cristallites avant qu'une phase de croissance franche ne débute. Il est intéressant de constater que les périodes de nucléation et de croissance se recouvrent. Notre interprétation de la séquence est la suivante : des cristallites apparaissent jusqu'à ce que la surface occupée par les cristallites soit suffisamment importante pour empêcher toute nucléation supplémentaire. Les cristallites continuent alors de croître tant qu'ils n'ont pas rencontré leurs voisins. La fusion de cristallites voisins s'effectue alors si leurs orientations cristallines respectives ne sont pas trop éloignées.

Le tracé du nombre moyen de cristallites en fonction du temps en échelle log-log permet de déterminer un exposant de croissance. Cette expérience a été réalisée pour des sauts de température équivalente de la phase fluide vers la phase cristalline de plus en plus importants. Le tracé de l'exposant de croissance en fonction de la température finale du saut (la température initiale est la même pour toutes les expériences) est représenté sur la figure B.3. On constate que plus la température finale est basse, c'est-à-dire plus le système est mis hors-équilibre dans la phase cristalline, plus la croissance de cristaux est rapide. Puisqu'on connaît la dépendance expérimentale de l'exposant de croissance avec la température, la mesure de la loi de croissance hors-équilibre de cristaux permet donc de remonter à une température équivalente du système.

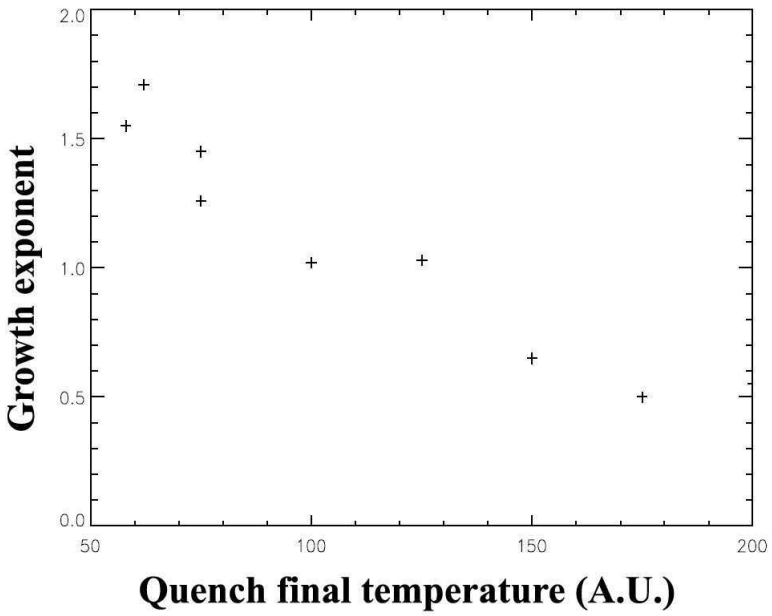


FIG. B.3: Exposant temporel de croissance des cristallites en fonction de la température équivalente finale de la mise hors-équilibre.

B.3 Conclusion

Dans cette étude, nous avons montré qu'il est possible d'induire la nucléation et croissance de cristaux dans un système de colloïdes à deux dimensions. La température équivalente de ce système est contrôlée par un champ magnétique externe, ce qui permet d'amener hors équilibre dans la phase cristalline un système initialement placé dans une phase fluide. La position des colloïdes est déterminée en temps réel par acquisition vidéo en microscopie optique. L'application de critères basés sur le calcul de l'ordre rotationnel local de chaque particule permet de déterminer quelles sont les particules cristallines ainsi que leur orientation. Le regroupement des particules cristallines adjacentes d'orientations proches définit des cristallites. L'analyse du nombre de cristallites et du nombre moyen de particules les composant permet de définir le scénario suivant de nucléation et croissance. La nucléation a lieu rapidement après la mise hors-équilibre et persiste tant que la surface occupée par les cristallites n'est pas trop grande. Un peu avant la fin de cette période de nucléation, les cristallites commencent à croître jusqu'à ce qu'ils rencontrent leurs voisins. Ils peuvent éventuellement fusionner moyennant un alignement de leurs orientations respectives. L'exposant de croissance dépend de la température équivalente finale à laquelle on a placé le système. Ce résultat permet de déduire la température équivalente finale d'un système à deux dimensions mis hors-équilibre dans une phase cristalline.

La méthode de détection des cristallites employée est assez rudimentaire mais simple à mettre en oeuvre. Une méthode basée sur la microscopie de Bragg donnerait des résultats plus fiables. Il s'agirait de calculer la transformée de Fourier à deux dimensions des positions des colloïdes de la zone d'observation. La transformée de Fourier inverse des pics de Bragg obtenus donnerait automatiquement la position des particules composant chaque cristallite. Cette méthode est en cours d'implémentation à Konstanz.

Ce projet n'est pas achevé à l'heure actuelle. Des exposants de croissance ont été obtenus pour le système passif, ainsi que des courbes de croissance de contacts focaux (voir la figure B.4) et de jonctions adhérentes (voir la figure 4.5) dans les cellules. Cependant la comparaison quantitative des lois de croissance entre les systèmes actif et passif n'a pas été réalisée pour le moment mais permettrait de définir une température équivalente des contacts en croissance en fonction de la concentration de nocodazole utilisée pour induire la croissance.

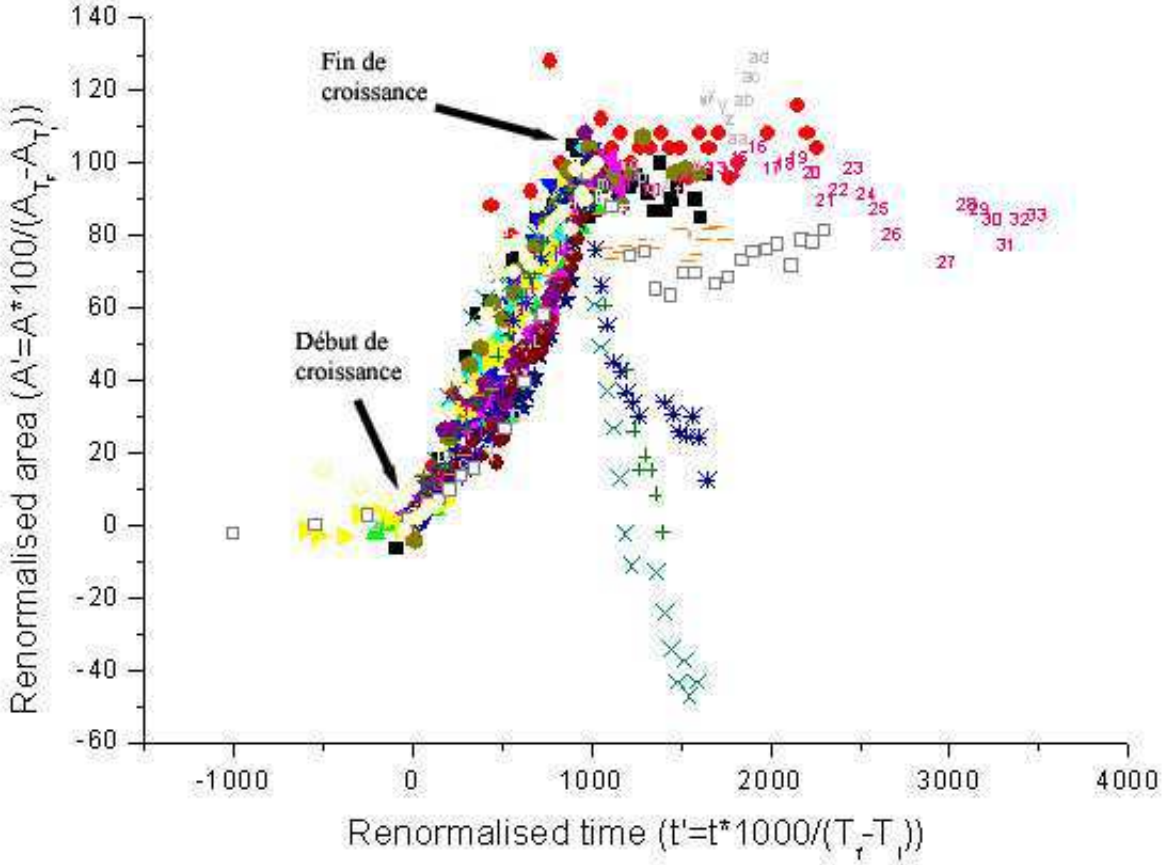


FIG. B.4: Lois de croissance expérimentales de contacts focaux. Tous les contacts semblent croître d'une manière similaire mais, une fois leur phase de croissance terminée, certains contacts saturent en taille alors que d'autres se désassemblent. Chaque symbole correspond à un contact focal. Le temps a été renormalisé par rapport aux instants de début et de fin de croissance. L'aire des contacts a été renormalisée par rapport aux aires de début et de fin de croissance.

Bibliographie

Abercrombie, M. et Dunn, G. A. (1975). Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy. *Exp Cell Res*, 92(1): 57–62.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. et Watson, J. (1994). *Molecular Biology of the Cell.* Garland Publishing Inc.

Amos, L. A. et Schlieper, D. (2005). Microtubules and maps. *Adv Protein Chem*, 71:257–98.

Angst, B. D., Marcozzi, C. et Magee, A. I. (2001). The cadherin superfamily : diversity in form and function. *J Cell Sci*, 114(Pt 4):629–41.

Arber, S., Barbayannis, F. A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C. A., Bernard, O. et Caroni, P. (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by lim-kinase. *Nature*, 393(6687):805–9.

Balaban, N. Q., Schwarz, U. S., Riveline, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L. et Geiger, B. (2001). Force and focal adhesion assembly : a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol*, 3(5):466–72.

Ballestrem, C., Hinz, B., Imhof, B. A. et Wehrle-Haller, B. (2001). Marching at the front and dragging behind : differential alphavbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J Cell Biol*, 155(7):1319–32.

Barker, T. H., Baneyx, G., Cardo-Vila, M., Workman, G. A., Weaver, M., Menon, P. M., Dedhar, S., Rempel, S. A., Arap, W., Pasqualini, R., Vogel, V. et Sage, E. H. (2005). Sparc regulates extracellular matrix organization through its modulation of integrin-linked kinase activity. *J Biol Chem*, 280(43):36483–93.

Bausch, A. R., Ziemann, F., Boulbitch, A. A., Jacobson, K. et Sackmann, E. (1998). Local measurements of viscoelastic parameters of adherent cell surfaces by magnetic bead microrheometry. *Biophys J*, 75(4):2038–49.

Beil, M., Micoulet, A., von Wichert, G., Paschke, S., Walther, P., Omary, M. B., Van Veldhoven, P. P., Gern, U., Wolff-Hieber, E., Eggermann, J., Walten-

BERGER, J., ADLER, G., SPATZ, J. et SEUFFERLEIN, T. (2003). Sphingosylphosphorylcholine regulates keratin network architecture and visco-elastic properties of human cancer cells. *Nat Cell Biol*, 5(9):803–11.

BELL, G. I. (1978). Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science*, 200(4342):618–27.

BELL, G. I., DEMBO, M. et BONGRAND, P. (1984). Cell adhesion. competition between nonspecific repulsion and specific bonding. *Biophys J*, 45(6):1051–64.

BERSHADSKY, A. (2004). Magic touch : how does cell-cell adhesion trigger actin assembly ? *Trends Cell Biol*, 14(11):589–93.

BERSHADSKY, A., CHAUSOVSKY, A., BECKER, E., LYUBIMOVA, A. et GEIGER, B. (1996). Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction. *Curr Biol*, 6(10):1279–89.

BERSHADSKY, A. et GEIGER, B. (1999). Introduction. *In* KREIS, T. et VALE, R., éditeurs : *Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins*, pages 3–11. Oxford University Press, Oxford.

BERTET, C., SULAK, L. et LECUIT, T. (2004). Myosin-dependent junction remodelling controls planar cell intercalation and axis elongation. *Nature*, 429(6992):667–71.

BESSER, A. et SAFRAN, S. A. (2006). Force-induced adsorption and anisotropic growth of focal adhesions. *Biophys J*, 90(10):3469–84.

BOHIN, J. et PELCE, P. (2001). Unstable membrane outgrowth induced by filament tip spreading. *C. R. Acad. Sci. Paris IV*, 2(6):879–84.

BONGRAND, P. (1999). Ligand-receptor interactions. *Reports on Progress in Physics*, 62(6):921–68.

BOS, J. L. (2005). Linking rap to cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol*, 17(2):123–8.

BOULBITCH, A., GUTTENBERG, Z. et SACKMANN, E. (2001). Kinetics of membrane adhesion mediated by ligand-receptor interaction studied with a biomimetic system. *Biophys J*, 81(5):2743–51.

BRAUN, J., ABNEY, J. R. et OWICKI, J. C. (1984). How a gap junction maintains its structure. *Nature*, 310(5975):316–8.

BROWN, M. J. et LOEW, L. M. (1994). Electric field-directed fibroblast locomotion involves cell surface molecular reorganization and is calcium independent. *J Cell Biol*, 127(1): 117–28.

Bruinsma, R., Behrisch, A. et Sackmann, E. (2000). Adhesive switching of membranes : experiment and theory. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics*, 61(4 Pt B):4253–67.

Bruinsma, R., Goulian, M. et Pincus, P. (1994). Self-assembly of membrane junctions. *Biophys J*, 67(2):746–50.

Capo, C., Garrouste, F., Benoliel, A. M., Bongrand, P., Ryter, A. et Bell, G. I. (1982). Concanavalin-a-mediated thymocyte agglutination : a model for a quantitative study of cell adhesion. *J Cell Sci*, 56:21–48.

Choidas, A., Jungbluth, A., Sechi, A., Murphy, J., Ullrich, A. et Marriott, G. (1998). The suitability and application of a gfp-actin fusion protein for long-term imaging of the organization and dynamics of the cytoskeleton in mammalian cells. *Eur J Cell Biol*, 77(2):81–90.

Choquet, D., Felsenfeld, D. P. et Sheetz, M. P. (1997). Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell*, 88(1):39–48.

Clark, E. A., King, W. G., Brugge, J. S., Symons, M. et Hynes, R. O. (1998). Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of gtpases. *J Cell Biol*, 142(2):573–86.

Coue, M., Brenner, S. L., Spector, I. et Korn, E. D. (1987). Inhibition of actin polymerization by latrunculin a. *FEBS Lett*, 213(2):316–8.

Curtis, A. (1960). Cell contacts : some physical considerations. *Am. Naturalist*, 94:37.

Curtis, A. (1962). Cell contact and adhesion. *Biol. Rev.*, 37:82.

Curtis, A. S. (1964). The mechanism of adhesion of cells to glass. a study by interference reflection microscopy. *J Cell Biol*, 20:199–215.

Cuvelier, D. et Nassoy, P. (2004). Hidden dynamics of vesicle adhesion induced by specific stickers. *Phys Rev Lett*, 93(22):228101.

Dahl, K. N., Kahn, S. M., Wilson, K. L. et Discher, D. E. (2004). The nuclear envelope lamina network has elasticity and a compressibility limit suggestive of a molecular shock absorber. *J Cell Sci*, 117(Pt 20):4779–86.

Dahlstrand, J., Zimmerman, L. B., McKay, R. D. et Lendahl, U. (1992). Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *J Cell Sci*, 103 (Pt 2):589–97.

Dan, N., Berman, A., Pincus, P. et Safran, S. (1993). Membrane-induced interactions between inclusions. *Langmuir*, 9:2767–71.

De Gennes, P., Puech, P.-H. et Brochard-Wyart, F. (2003). Adhesion induced by mobile stickers : A list of scenarios. *Langmuir*, 19:7112–9.

Decave, E., Garrivier, D., Brechet, Y., Bruckert, F. et Fourcade, B. (2002). Peeling process in living cell movement under shear flow. *Phys Rev Lett*, 89(10): 108101.

Delanoe-Ayari, H. (2003). *Nucléation et croissance de contacts entre cellules biologiques*. Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier.

Delanoe-Ayari, H., Al Kurdi, R., Vallade, M., Gulino-Debrac, D. et Riveline, D. (2004a). Membrane and acto-myosin tension promote clustering of adhesion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(8):2229–34.

Delanoe-Ayari, H., Lenz, P., Brevier, J., Weidenhaupt, M., Vallade, M., Gulino, D., Joanny, J. F. et Riveline, D. (2004b). Periodic adhesive fingers between contacting cells. *Phys Rev Lett*, 93(10):108102.

DeMali, K. A. et Burridge, K. (2003). Coupling membrane protrusion and cell adhesion. *J Cell Sci*, 116(Pt 12):2389–97.

Derenyi, I., Julicher, F. et Prost, J. (2002). Formation and interaction of membrane tubes. *Phys Rev Lett*, 88(23):238101.

D.J., W., Ottewill, R. et Bangham, A. (1962). On the flocculation of sheep leucocytes. *J. Theoret. Biol.*, 2:169–76.

Edelman, G. M. (1983). Cell adhesion molecules. *Science*, 219(4584):450–7.

Edwards, D. C., Sanders, L. C., Bokoch, G. M. et Gill, G. N. (1999). Activation of lim-kinase by pak1 couples rac/cdc42 gtpase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol*, 1(5):253–9.

Etienne-Manneville, S. et Hall, A. (2002). Rho gtpases in cell biology. *Nature*, 420(6916):629–35.

Evans, E. et Needham, D. (1987). *J. Phys. Chem.*, 91:4219.

Fukata, M., Kuroda, S., Nakagawa, M., Kawajiri, A., Itoh, N., Shoji, I., Matsuura, Y., Yonehara, S., Fujisawa, H., Kikuchi, A. et Kaibuchi, K. (1999). Cdc42 and rac1 regulate the interaction of iqgap1 with beta-catenin. *J Biol Chem*, 274(37):26044–50.

Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R. et Yamada, K. M. (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix–cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(11):793–805.

Giannone, G., Dubin-Thaler, B. J., Dobereiner, H. G., Kieffer, N., Bresnick, A. R. et Sheetz, M. P. (2004). Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves. *Cell*, 116(3):431–43.

Gillespie, P. G. et Walker, R. G. (2001). Molecular basis of mechanosensory transduction. *Nature*, 413(6852):194–202.

Gloushankova, N. A., Krendel, M. F., Alieva, N. O., Bonder, E. M., Feder, H. H., Vasiliev, J. M. et Gelfand, I. M. (1998). Dynamics of contacts between lamellae of fibroblasts : essential role of the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(8):4362–7.

Guttenberg, Z., Lorz, B., Sackmann, E. et Boulbitch, A. A. (2001). First-order transition between adhesion states in a system mimicking cell-tissue interaction. *Europhysics Letters*, 54(6):826–32.

Harris, A. (1973). Behavior of cultured cells on substrata of variable adhesiveness. *Exp Cell Res*, 77(1):285–97.

Helfman, D. M., Levy, E. T., Berthier, C., Shtutman, M., Riveline, D., Grosheva, I., Lachish-Zalait, A., Elbaum, M. et Bershadsky, A. D. (1999). Caldesmon inhibits nonmuscle cell contractility and interferes with the formation of focal adhesions. *Mol Biol Cell*, 10(10):3097–112.

Helfrich, W. (1973). Elastic properties of lipid bilayers : theory and possible experiments. *Z Naturforsch [C]*, 28(11):693–703.

Higgs, H. N. et Peterson, K. J. (2005). Phylogenetic analysis of the formin homology 2 domain. *Mol Biol Cell*, 16(1):1–13.

Hill, T. (1987). Linear aggregation theory in cell biology. New York.

Hogan, C., Serpente, N., Cogram, P., Hosking, C. R., Bialucha, C. U., Feller, S. M., Braga, V. M., Birchmeier, W. et Fujita, Y. (2004). Rap1 regulates the formation of e-cadherin-based cell-cell contacts. *Mol Cell Biol*, 24(15):6690–700.

Holstein, T. W., Mala, C., Kurz, E., Bauer, K., Greber, M. et David, C. N. (1992). The primitive metazoan hydra expresses antistasin, a serine protease inhibitor of vertebrate blood coagulation : cdna cloning, cellular localisation and developmental regulation. *FEBS Lett*, 309(3):288–92.

Holtfreter, J. (1944). *Rev. Can. Biol.*, 3:220.

Horwitz, A. R. et Parsons, J. T. (1999). Cell migration–movin' on. *Science*, 286(5442): 1102–3.

Huang, H. W. (1986). Deformation free energy of bilayer membrane and its effect on gramicidin channel lifetime. *Biophys J*, 50(6):1061–70.

Huttelmaier, S., Harbeck, B., Steffens, O., Messerschmidt, T., Illenberger, S. et Jockusch, B. M. (1999). Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein vasp. *FEBS Lett*, 451(1):68–74.

Huxley, H. E. (1963). Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. *J Mol Biol*, 77:281–308.

Hynes, R. O. (1992). Integrins : versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69(1):11–25.

Israelachvili, J. N. (1985). *Intermolecular and Surface Forces*. Academic Press, London.

Izzard, C. S. et Lochner, L. R. (1976). Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts : an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *J Cell Sci*, 21(1): 129–59.

Jakus, M. et Hall, C. (1947). *J. Biol. Chem.*, 167:705.

Jou, T. S., Stewart, D. B., Stappert, J., Nelson, W. J. et Marrs, J. A. (1995). Genetic and biochemical dissection of protein linkages in the cadherin-catenin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(11):5067–71.

Katoh, K., Kano, Y., Amano, M., Onishi, H., Kaibuchi, K. et Fujiwara, K. (2001). Rho-kinase–mediated contraction of isolated stress fibers. *J Cell Biol*, 153(3):569–84.

Katz, B. Z., Zamir, E., Bershadsky, A., Kam, Z., Yamada, K. M. et Geiger, B. (2000). Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell*, 11(3):1047–60.

Kawano, Y., Fukata, Y., Oshiro, N., Amano, M., Nakamura, T., Ito, M., Matsumura, F., Inagaki, M. et Kaibuchi, K. (1999). Phosphorylation of myosin-binding subunit (mbs) of myosin phosphatase by rho-kinase in vivo. *J Cell Biol*, 147(5):1023–38.

Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A. et Kaibuchi, K. (1996). Regulation of myosin phosphatase by rho and rho-associated kinase (rho-kinase). *Science*, 273(5272):245–8.

Knudsen, K. A., Soler, A. P., Johnson, K. R. et Wheelock, M. J. (1995). Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J Cell Biol*, 130(1):67–77.

Kobielak, A., Pasolli, H. A. et Fuchs, E. (2004). Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nat Cell Biol*, 6(1):21–30.

Kodama, A., Karakesisoglou, I., Wong, E., Vaezi, A. et Fuchs, E. (2003). Acf7 : an essential integrator of microtubule dynamics. *Cell*, 115(3):343–54.

Koltover, I., Radler, J. et Safinya, C. (1999). Membrane mediated attraction and ordered aggregation of colloÃ¯dal particules bound to giant phospholipid vesicles. *Physical Review Letters*, 82(9):1991–4.

Kosterlitz, J. et Thouless, D. (1973). *J. Phys. C*, 6:1181.

Kraynov, V. S., Chamberlain, C., Bokoch, G. M., Schwartz, M. A., Slabaugh, S. et Hahn, K. M. (2000). Localized rac activation dynamics visualized in living cells. *Science*, 290(5490):333–7.

Krendel, M., Gloushankova, N. A., Bonder, E. M., Feder, H. H., Vasiliev, J. M. et Gelfand, I. M. (1999). Myosin-dependent contractile activity of the actin cytoskeleton modulates the spatial organization of cell-cell contacts in cultured epitheliocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(17):9666–70.

Kuroda, S., Fukata, M., Nakagawa, M., Fujii, K., Nakamura, T., Ookubo, T., Izawa, I., Nagase, T., Nomura, N., Tani, H., Shoji, I., Matsuura, Y., Yonehara, S. et Kaibuchi, K. (1998). Role of iqgap1, a target of the small gtpases cdc42 and rac1, in regulation of e-cadherin- mediated cell-cell adhesion. *Science*, 281(5378):832–5.

Kusner, R., Mann, J., Kerins, J. et Dahm, A. (1994). Two-stage melting of a two-dimensional collodial lattice with dipole interactions. *Phys. Rev. Lett.*, 73(23):3113.

Le Page, Y., Demay, F. et Salbert, G. (2004). A neural-specific splicing event generates an active form of the wiskott-aldrich syndrome protein. *EMBO Rep*, 5(9):895–900.

Leckband, D. et Prakasam, A. (2006). Mechanism and dynamics of cadherin adhesion. *Annu Rev Biomed Eng.*

Lecuit, H. (2005). Société française de physique, daniel dautreppe http ://www.canalc2.fr/video.asp ?idvideo=3910&voir=oui.

Liu, B. P., Chrzanowska-Wodnicka, M. et Burridge, K. (1998). Microtubule depolymerization induces stress fibers, focal adhesions, and dna synthesis via the gtp-binding protein rho. *Cell Adhes Commun*, 5(4):249–55.

Lo, C. M., Wang, H. B., Dembo, M. et Wang, Y. L. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J*, 79(1):144–52.

Loisel, T. P., Boujemaa, R., Pantaloni, D. et Carlier, M. F. (1999). Reconstitution of actin-based motility of listeria and shigella using pure proteins. *Nature*, 401(6753): 613–6.

Lowe, B. (1997). The role of ca2+ in deflection-induced excitation of motile, mechanoresponsive balancer cilia in the ctenophore statocyst. *J Exp Biol*, 200(Pt 11):1593–606.

Mao, Y. et Schwarzbauer, J. E. (2005). Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol*, 24(6):389–99.

Marcy, Y., Prost, J., Carlier, M. F. et Sykes, C. (2004). Forces generated during actin-based propulsion : a direct measurement by micromanipulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(16):5992–7.

McMahon, H. T. et Gallop, J. L. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*, 438(7068):590–6.

Medalia, O., Weber, I., Frangakis, A. S., Nicastro, D., Gerisch, G. et Baumeister, W. (2002). Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. *Science*, 298(5596):1209–13.

Menes, R. et Safran, S. (1997). Nonlinear response of membrane pinning sites. *Physical Review E*, 56(2):1891–9.

Miki, H., Miura, K. et Takenawa, T. (1996). N-wasp, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a pip2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *Embo J*, 15(19):5326–35.

Miki, H., Sasaki, T., Takai, Y. et Takenawa, T. (1998). Induction of filopodium formation by a wasp-related actin-depolymerizing protein n-wasp. *Nature*, 391(6662): 93–6.

Mitchison, T. et Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, 312(5991):237–42.

Miyamoto, S., Akiyama, S. K. et Yamada, K. M. (1995). Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science*, 267(5199): 883–5.

Mogilner, A. (2006). On the edge : modeling protrusion. *Curr Opin Cell Biol*, 18(1):32–9.

Mogilner, A. et Oster, G. (1996). Cell motility driven by actin polymerization. *Biophys J*, 71(6):3030–45.

Mogilner, A. et Oster, G. (2003). Force generation by actin polymerization ii : the elastic ratchet and tethered filaments. *Biophys J*, 84(3):1591–605.

Mukherjee, S. et Maxfield, F. R. (2004). Membrane domains. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20:839–66.

Murray, C. et van Winkle, D. (1987). Experimental observation of two-stage melting in a classical two-dimensional screened coulomb system. *Phys. Rev. Lett.*, 58(12):1200.

Murray, C. et Wenk, R. (1989). Microscopic particle motions and topological defects in two-dimensional hexatics and dense fluids. *Phys. Rev. Lett.*, 62(14):1643.

Nagafuchi, A. et Takeichi, M. (1988). Cell binding function of e-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *Embo J*, 7(12):3679–84.

Nagar, B., Overduin, M., Ikura, M. et Rini, J. M. (1996). Structural basis of calcium-induced e-cadherin rigidification and dimerization. *Nature*, 380(6572):360–4.

Nelson, D. R. et Halperin, B. (1979). Dislocation-mediated melting in two dimensions. *Phys. Rev. B*, 19(5):2457.

Nicolas, A., Geiger, B. et Safran, S. A. (2004). Cell mechanosensitivity controls the anisotropy of focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(34):12520–5.

Nicolas, A. et Safran, S. A. (2004). Elastic deformations of grafted layers with surface stress. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 69(5 Pt 1):051902.

Nobes, C. D. et Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 gtpases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81(1):53–62.

Noritake, J., Fukata, M., Sato, K., Nakagawa, M., Watanabe, T., Izumi, N., Wang, S., Fukata, Y. et Kaibuchi, K. (2004). Positive role of iqgap1, an effector of rac1, in actin-meshwork formation at sites of cell-cell contact. *Mol Biol Cell*, 15(3):1065–76.

Nose, A. et Takeichi, M. (1986). A novel cadherin cell adhesion molecule : its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. *J Cell Biol*, 103(6 Pt 2):2649–58.

Nusrat, A., Parkos, C. A., Verkade, P., Foley, C. S., Liang, T. W., Innis-Whitehouse, W., Eastburn, K. K. et Madara, J. L. (2000). Tight junctions are membrane microdomains. *J Cell Sci*, 113 (Pt 10):1771–81.

Ohashi, T., Kiehart, D. P. et Erickson, H. P. (1999). Dynamics and elasticity of the fibronectin matrix in living cell culture visualized by fibronectin-green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(5):2153–8.

Ott, A., Magnasco, M., Simon, A. et Libchaber, A. (1993). Measurement of the persistence length of polymerized actin using fluorescence microscopy. *Physical Review. E.*, 48(3):R1642–R1645.

Palecek, S. P., Huttenlocher, A., Horwitz, A. F. et Lauffenburger, D. A. (1998). Physical and biochemical regulation of integrin release during rear detachment of migrating cells. *J Cell Sci*, 111 (Pt 7):929–40.

Pantaloni, D., Le Clainche, C. et Carlier, M. F. (2001). Mechanism of actin-based motility. *Science*, 292(5521):1502–6.

Parsons, J. T. (2003). Focal adhesion kinase : the first ten years. *J Cell Sci*, 116(Pt 8):1409–16.

Pelham, R. J., J. et Wang, Y. (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(25):13661–5.

Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J. C. et Nigg, E. A. (1990). In vitro disassembly of the nuclear lamina and m phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell*, 61(4):591–602.

Pethica, B. (1961). The physical chemistry of cell adhesion. *Exp. Cell Research*, suppl. 8:123.

Pettit, E. J. et Fay, F. S. (1998). Cytosolic free calcium and the cytoskeleton in the control of leukocyte chemotaxis. *Physiol Rev*, 78(4):949–67.

Peyrieras, N., Hyafil, F., Louvard, D., Ploegh, H. L. et Jacob, F. (1983). Uvomorulin : a nonintegral membrane protein of early mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(20):6274–7.

Playford, M. P. et Schaller, M. D. (2004). The interplay between src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene*, 23(48):7928–46.

Pollard, T. D. (1986). Rate constants for the reactions of atp- and adp-actin with the ends of actin filaments. *J Cell Biol*, 103(6 Pt 2):2747–54.

Pollard, T. D. et Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112(4):453–65.

Protassov, K. (2002). *Analyse statistique de données expérimentales.* EDP Sciences.

Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A. et Boone, C. (2002). Role of formins in actin assembly : nucleation and barbed-end association. *Science*, 297(5581):612–5.

Raucher, D. et Sheetz, M. P. (1999). Membrane expansion increases endocytosis rate during mitosis. *J Cell Biol*, 144(3):497–506.

Raucher, D. et Sheetz, M. P. (2000). Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. *J Cell Biol*, 148(1):127–36.

Reichardt, L. (1999). Introduction. *In Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins*, pages 335–41. Oxford University Press, Oxford.

Reinhard, M., Halbrugge, M., Scheer, U., Wiegand, C., Jockusch, B. M. et Walter, U. (1992). The 46/50 kda phosphoprotein vasp purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. *Embo J*, 11(6):2063–70.

Ridley, A. J. et Hall, A. (1992). The small gtp-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, 70(3):389–99.

Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D. et Hall, A. (1992). The small gtp-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, 70(3):401–10.

Rieu, J.-P. et Sawada, Y. (2002). Hydrodynamics ans cell motionduring the rounding of two dimensionalhydra cell aggregates. *European Physics Journal B*, 27:167–72.

Rimm, D. L., Koslov, E. R., Kebriaei, P., Cianci, C. D. et Morrow, J. S. (1995). Alpha 1(e)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of f-actin to the membrane adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(19):8813–7.

Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N. Q., Schwarz, U. S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B. et Bershadsky, A. D. (2001). Focal contacts as mechanosensors : externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mdia1-dependent and rock-independent mechanism. *J Cell Biol*, 153(6):1175–86.

Robertson, J. D. (1958). Structural alterations in nerve fibers produced by hypotonic and hypertonic solutions. *J Biophys Biochem Cytol*, 4(4):349–64.

Romero, S., Le Clainche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D. et Carlier, M. F. (2004). Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated atp hydrolysis. *Cell*, 119(3):419–29.

Rottner, K., Hall, A. et Small, J. V. (1999). Interplay between rac and rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol*, 9(12):640–8.

Safran, S. (1994). *Thermodynamics of surfaces, interfaces and membranes.*

Saranak, J. et Foster, K. W. (1997). Rhodopsin guides fungal phototaxis. *Nature*, 387(6632):465–6.

Sastry, S. K. et Burridge, K. (2000). Focal adhesions : a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics. *Exp Cell Res*, 261(1):25–36.

Sato, M., Levesque, M. J. et Nerem, R. M. (1987). Micropipette aspiration of cultured bovine aortic endothelial cells exposed to shear stress. *Arteriosclerosis*, 7(3):276–86.

Schwamborn, J. C. et Puschel, A. W. (2004). The sequential activity of the gtpases rap1b and cdc42 determines neuronal polarity. *Nat Neurosci*, 7(9):923–9.

Seveau, S., Bierne, H., Giroux, S., Prevost, M. C. et Cossart, P. (2004). Role of lipid rafts in e-cadherin– and hgf-r/met–mediated entry of listeria monocytogenes into host cells. *J Cell Biol*, 166(5):743–53.

Sharp, D. J., Rogers, G. C. et Scholey, J. M. (2000). Cytoplasmic dynein is required for poleward chromosome movement during mitosis in drosophila embryos. *Nat Cell Biol*, 2(12):922–30.

Shemesh, T., Geiger, B., Bershadsky, A. D. et Kozlov, M. M. (2005). Focal adhesions as mechanosensors : a physical mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(35):12383–8.

Shewan, A. M., Maddugoda, M., Kraemer, A., Stehbens, S. J., Verma, S., Kovacs, E. M. et Yap, A. S. (2005). Myosin 2 is a key rho kinase target necessary for the local concentration of e-cadherin at cell-cell contacts. *Mol Biol Cell*, 16(10):4531–42.

Simson, R., Wallraff, E., Faix, J., Niewohner, J., Gerisch, G. et Sackmann, E. (1998). Membrane bending modulus and adhesion energy of wild-type and mutant cells of dictyostelium lacking talin or cortexillins. *Biophys J*, 74(1):514–22.

Singer, S. J. et Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(23):720–31.

Steinberg, M. S. (1963). Reconstruction of tissues by dissociated cells. some morphogenetic tissue movements and the sorting out of embryonic cells may have a common explanation. *Science*, 141:401–8.

Steinberg, M. S. et McNutt, P. M. (1999). Cadherins and their connections : adhesion junctions have broader functions. *Curr Opin Cell Biol*, 11(5):554–60.

Stradal, T. E. et Scita, G. (2006). Protein complexes regulating arp2/3-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol*, 18(1):4–10.

Straight, A. F., Cheung, A., Limouze, J., Chen, I., Westwood, N. J., Sellers, J. R. et Mitchison, T. J. (2003). Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin ii inhibitor. *Science*, 299(5613):1743–7.

Straub, F. (1943). *Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 3:23.

Svitkina, T. M. et Borisy, G. G. (1999). Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol*, 145(5):1009–26.

Svitkina, T. M., Bulanova, E. A., Chaga, O. Y., Vignjevic, D. M., Kojima, S., Vasiliev, J. M. et Borisy, G. G. (2003). Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol*, 160(3):409–21.

Svitkina, T. M., Verkhovsky, A. B. et Borisy, G. G. (1995). Improved procedures for electron microscopic visualization of the cytoskeleton of cultured cells. *J Struct Biol*, 115(3):290–303.

Takeichi, M. (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, 251(5000):1451–5.

Takeichi, M. (1993). Cadherins in cancer : implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol*, 5(5):806–11.

Tepass, U. (1999). Genetic analysis of cadherin function in animal morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 11(5):540–8.

Theriot, J. A., Mitchison, T. J., Tilney, L. G. et Portnoy, D. A. (1992). The rate of actin-based motility of intracellular listeria monocytogenes equals the rate of actin polymerization. *Nature*, 357(6375):257–60.

Thoumine, O., Ott, A., Cardoso, O. et Meister, J. J. (1999). Microplates : a new tool for manipulation and mechanical perturbation of individual cells. *J Biochem Biophys Methods*, 39(1-2):47–62.

Tokunaga, M., Kitamura, K., Saito, K., Iwane, A. H. et Yanagida, T. (1997). Single molecule imaging of fluorophores and enzymatic reactions achieved by objective-type total internal reflection fluorescence microscopy. *Biochem Biophys Res Commun*, 235(1):47–53.

Turner, C. E., Brown, M. C., Perrotta, J. A., Riedy, M. C., Nikolopoulos, S. N., McDonald, A. R., Bagrodia, S., Thomas, S. et Leventhal, P. S. (1999). Paxillin ld4 motif binds pak and pix through a novel 95-kd ankyrin repeat, arf-gap protein : A role in cytoskeletal remodeling. *J Cell Biol*, 145(4):851–63.

Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M. et Narumiya, S. (1997). Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*, 389(6654):990–4.

Vale, R. D., Schnapp, B. J., Reese, T. S. et Sheetz, M. P. (1985). Organelle, bead, and microtubule translocations promoted by soluble factors from the squid giant axon. *Cell*, 40(3):559–69.

Van Aelst, L. et D'Souza-Schorey, C. (1997). Rho gtpases and signaling networks. *Genes Dev*, 11(18):2295–322.

Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M. et Fuchs, E. (2000). Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell*, 100(2):209–19.

Vleminckx, K. et Kemler, R. (1999). Cadherins and tissue formation : integrating adhesion and signaling. *Bioessays*, 21(3):211–20.

Wang, N., Butler, J. P. et Ingber, D. E. (1993). Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, 260(5111):1124–7.

Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., Ishizaki, T. et Narumiya, S. (1999). Cooperation between mdia1 and rock in rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol*, 1(3):136–43.

Wegner, A. (1976). Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol*, 108(1):139–50.

Weikl, T. R., Andelman, D., Komura, S. et Lipowsky, R. (2002). Adhesion of membranes with competing specific and generic interactions. *Eur Phys J E Soft Matter*, 8(1):59–66.

Wu, H. et Parsons, J. T. (1993). Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex. *J Cell Biol*, 120(6):1417–26.

YOUNG, A. (1979). Melting and the vector coulomb gas in two dimensions. *Phys. Rev. B*, 19(4):1855.

ZAHN, K., LENKE, R. et MARET, G. (1999). Two-stage melting of paramagnetic colloidal crystals in two dimensions. *Phys. Rev. Lett.*, 82:2721.

ZAHN, K., MÉNDEZ-ALCARAZ, J. et MARET, G. (1997). Hydrodynamic interactions may enhance the self-diffusion of colloidal particles. *Phys. Rev. Lett.*, 79:175–8.

ZAMIR, E. et GEIGER, B. (2001). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*, 114(Pt 20):3583–90.

ZAMIR, E., KATZ, B. Z., AOTA, S., YAMADA, K. M., GEIGER, B. et KAM, Z. (1999). Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*, 112 (Pt 11):1655–69.

ZAMIR, E., KATZ, M., POSEN, Y., EREZ, N., YAMADA, K. M., KATZ, B. Z., LIN, S., LIN, D. C., BERSHADSKY, A., KAM, Z. et GEIGER, B. (2000). Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat Cell Biol*, 2(4):191–6.

ZHANG, D., WANG, Z., JIN, N., LI, L., RHOADES, R. A., YANCEY, K. W. et SWARTZ, D. R. (2001). Microtubule disruption modulates the rho-kinase pathway in vascular smooth muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 22(2):193–200.

ZHONG, C., CHRZANOWSKA-WODNICKA, M., BROWN, J., SHAUB, A., BELKIN, A. M. et BURRIDGE, K. (1998). Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly. *J Cell Biol*, 141(2):539–51.

ZHU, C., BAO, G. et WANG, N. (2000). Cell mechanics : mechanical response, cell adhesion, and molecular deformation. *Annu Rev Biomed Eng*, 2:189–226.

ZUCKERMAN, D. M. et BRUINSMA, R. (1998). Vesicle-vesicle adhesion by mobile lock-and-key molecules : Debye-huckel theory and monte carlo simulation. *Physical Review E*, 57(1):964–77.

Résumé : "Symétrie brisée et renforcement de contacts cellulaires."

Nous avons étudié la croissance de contacts cellulaires asymétriques : les jonctions adhérentes et les contacts focaux. Nous avons montré par des expériences d'imageries, de micromanipulation, et d'altération des assemblages cellulaires, que la brisure de symétrie des jonctions adhérentes entre des cellules apparemment identiques s'explique par des rôles différents du cytosquelette d'actine des deux cellules formant le contact. Une cellule "donneuse" polymérise de l'actine, ce qui amène les membranes cellulaires en contact. La cellule "receveuse" assemble des faisceaux contractiles d'acto-myosine qui exercent localement des forces sur les jonctions et régulent leur longueur. Des courbes de croissance de ces jonctions adhérentes ont par ailleurs été mesurées pour des cellules soumises à des augmentations contrôlées de force contractile par incubation dans le nocodazole. L'ajustement des courbes de croissance expérimentales par des lois théoriques a permis de déterminer les forces contractiles mises en jeu par la cellule "receveuse". Le tracé du diagramme force-extension des jonctions adhérentes a pu donc être réalisé pour la première fois et par une méthode non-invasive. Les approches biologiques pour l'identification des assemblages en jeu et physiques pour l'ajustement des lois de croissance ont l'une et l'autre montré que les contacts entre cellules se renforcent localement à la manière des contacts focaux. Nous avons enfin observé la dynamique interne des contacts focaux en croissance par TIRFM pour différentes protéines participant au contact (fibronectine, intégrine, vinculine, actine) afin de proposer un mécanisme de mécanosension.

Mots clefs : adhésion, brisure de symétrie, cadhérine, actine, contractilité, diagramme force-extension.

Abstract : "Broken symmetry and reinforcement of cellular contacts."

We studied the growth of asymmetric cellular contacts : adherens junctions and focal contacts. We showed, by imaging, micromanipulation and cellular assembly modification experiments, that adherens junctions between two apparently identical cells exhibit a symmetry breaking due to different roles of actin cytoskeleton for both cells in contact : the "donor" cell polymerizes actin which leads to cell membranes contact ; as a response, the "receiving" cell assembles acto-myosin bundles which promotes local force application on the junctions and a consequent increase of their length. Growth curves of adherens junctions when cell contractility is increased using controlled nocodazole concentrations have been measured. Fits of experimental growth curves allowed a determination of the contractile forces applied by the "receiving" cell. We were thus able to obtain for the first time the force-extension diagram for adherens junctions by a non-invasive method. The biological approaches used to name the key cytoskeletal players and the physical approaches used to fit growth laws have both shown that intercellular contacts exhibits local reinforcement in a manner similar to focal contact reinforcement. We have finally observed by TIRFM internal dynamics of growing focal contacts using different labelled proteins (fibronectin, integrin, vinculin, actin) in order to propose a mechanosensing mechanism.

Key words : adhesion, symmetry breaking, cadherin, actin, contractility, force-extension diagram.