



HAL
open science

Modifications mécaniques et biologiques induites dans des cellules en culture par application locale d'une force contrôlée

Delphine Icard Arcizet

► **To cite this version:**

Delphine Icard Arcizet. Modifications mécaniques et biologiques induites dans des cellules en culture par application locale d'une force contrôlée. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2007. Français. NNT : 2007PA077129 . tel-00188112

HAL Id: tel-00188112

<https://theses.hal.science/tel-00188112>

Submitted on 15 Nov 2007

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

DOCTORAT DE PHYSIQUE
Spécialité Physique des Liquides

**Modifications mécaniques et biologiques
induites dans des cellules en culture
par application locale d'une force contrôlée**

Thèse présentée par

Delphine Icard – Arcizet

dirigée par **Sylvie Hénon**

soutenue publiquement le **13 novembre 2007**

Composition du jury :

| | |
|----------------------------|----------------------------------|
| <i>Président</i> | Vincent Croquette |
| <i>Rapporteurs</i> | Daniel Navajas Jean-Paul Rieu |
| <i>Examineurs</i> | Cécile Sykes Jean-Pierre Aimé |
| <i>Membre invité</i> | Maité Coppey |
| <i>Directrice de thèse</i> | Sylvie Hénon |

Remerciements

Aaahh, les remerciements : impossible de faire original, mais difficile de prétexter cela pour ne pas en faire du tout!.. surtout quand on les veut sincères. Alors allons-y...

Tout d'abord, je tiens à remercier les chercheurs et enseignants-chercheurs qui ont accepté d'évaluer ce travail : Daniel Navajas et Jean-Paul Rieu, les rapporteurs, ont lu particulièrement en détail le manuscrit et ont fait part de leurs remarques et critiques constructives, et ce malgré, respectivement, la barrière de la langue et un départ à l'étranger imminent.

Cécile Sykes et Vincent Croquette, dont j'avais eu le plaisir d'écouter les enseignements de "Physique à l'échelle de la cellule" et "Interface Physique-Biologie" dans le cadre de l'école doctorale, ainsi que Jean-Pierre Aimé se sont aussi montrés très disponibles, et les discussions que nous avons pu avoir se sont avérées particulièrement intéressantes. Enfin, tout au long de la thèse, Maïté Coppey a suivi nos expériences de près grâce à la collaboration que nous entretenons avec son équipe de recherche. C'est donc un grand honneur et un non moins grand plaisir de les compter parmi les membres du jury.

Je remercie évidemment avec énormément de gratitude Sylvie Hénon, qui m'a proposé il y a presque 4 ans un stage de DEA (et accepté de me prendre en thèse dans la foulée avant-même que j'aie réellement commencé à travailler dans l'équipe...), et a encadré ce stage puis cette thèse pour mon plus grand plaisir. Je crois ne pas me tromper beaucoup en écrivant que peu de thèses se déroulent sans heurts entre thésard et directeur, mais ce fut le cas de la mienne, et ce très largement grâce à l'écoute, à la gentillesse, à la patience et aux encouragements de Sylvie. Elle m'a montré qu'il est possible d'être une femme enseignant-chercheur douée et efficace, tout en étant épanouie et ouverte... Que demander de plus ?

Je remercie dans la foulée tous les membres du laboratoire MSC, et plus particulièrement ceux de l'équipe "Physique du Vivant" : je me rends compte de la chance que j'ai eue de passer 3 ans et demi dans une telle ambiance, où écoute et partage (et délires occasionnels) sont des valeurs reines. Cela permet une telle qualité de travail et de vie... Et ce n'est qu'une fois que l'on s'éloigne que l'on réalise sa chance, comme d'habitude ! Je remercie en particulier François, qui, en plus de mener cette équipe avec brio, a encadré le début de ma thèse avec beaucoup d'attention et m'a donné des pistes tout au long de ce travail ; Jean-Marc, directeur de laboratoire toujours à l'écoute, avec qui les discussions sont si enrichissantes, et qui s'est décarcassé pour me mettre en lien avec Canberra (ce n'est que partie remise !) ; Alain, qui, bien au-delà de ses conseils et immenses capacités techniques, a toujours été là, oreille attentive et verbe plaisantin, indispensable aux moments de "coup de blues" où rien ne va plus ; Atef, dont la sincérité toute en douceur et en rires est si appréciable, et donc les conseils en matière de rétroaction ont été précieux ; Benoît, qui s'est rendu si souvent disponible, et dont la gentillesse et les encouragements, pour discrets qu'ils furent, n'en ont pas été moins efficaces, au contraire ; Olivier, café-man à l'humeur radieuse, dont les domaines de compétence sont innombrables : je ne citerai que son aide précieuse en matière d'acquisition et de traitement d'images, mais ce n'est que la partie immergée de l'iceberg ! Sans oublier les valeurs sûres de MSC : Jean-Louis, Manuel, Pierre, et Stéphane, qui ont tous contribué

à un pan de ce travail et bien plus encore. Et bien-sûr, le reste de l'ex-aile 33-43 et les piliers de bar du vendredi soir : Marc et toutes ses discussions physico-filmographiques passionnantes, Sandra et ses coups de gueule justifiés, Bérengère et ses ragots recherchés, etc. Et puis bien-sûr, les thésards, anciens et actuels, compagnons de route sans qui la thèse ne serait tout simplement pas envisageable : Martial, incroyable maître ès "pincés et blocs", qui m'a tant appris, et est devenu un ami indispensable (et dont je salue au passage les deux jolies femmes, Barbara et Sybille) ; les Nicolas (Dédé et Biais), deux prédécesseurs illustres et accueillants ; Alexandre, avec qui pas un matin ne se passa sans café (avec ou sans cigarette) ni sans discussions à bâtons rompus dans la mythique rotonde de la tour 33, et dont les conseils ont toujours été sages et bienveillants ; Pascal, alias Newton, notre sourire Ultra Brite et ses excuses bidons pour décliner une bière ; Nico l'écolo pas bobo, notre maître à tous en matière de sons, de balles, de bières et de lettres (mais aussi de lose il faut bien l'avouer !) sans parler de ses innénarrables aventures grimpesques ; François, le roi des prunes qui a toujours le sourire et un mot gentil ; Marion, qui a avant tout permis de doubler la proportion de filles au sein des thésards, et est si vite devenue une complice ; et les compagnons discrets du 756 A : Cyril, Du Sheng et les Axels. Voilà, j'espère n'oublier personne, et si c'est le cas, j'espère que l'oublié(e) me pardonnera, car c'est avec une émotion toute particulière que je dis au revoir à cette Dream Team inoubliable!!!

Je remercie aussi Maïté Coppey et l'équipe Complexes Macromoléculaires en Cellule Vivante de l'Institut Jacques Monod, en particulier Myriam Allieux, co-thésarde si agréable à fréquenter, grâce à la manip de qui j'ai effectué un certain nombre d'expériences au début de ma thèse.

De même, je remercie l'équipe de Michel Bornens, de l'UMR 144 à l'Institut Curie, et plus particulièrement Sébastien Schaub, qui m'a patiemment initiée à la technique de stamping.

Ma thèse a par ailleurs été l'occasion de me plonger dans le monde de l'enseignement : à ce titre, je veux donc remercier tous mes collègues de la préparation à l'agrégation de Montrouge. Claude Delalande et Christophe Voisin, puis Jean-Marc Berroir et Jean-François Allemand, les responsables, m'ont d'emblée accordé leur confiance : j'espère ne pas les avoir déçus... En tout cas, au cours de ces 4 ans, j'ai énormément appris au contact des étudiants, et bien-sûr des autres enseignants ! Merci à tous pour votre bonne humeur, votre ouverture et vos conseils : j'ai eu, là aussi, beaucoup de chance de cotoyer un tel staff et de tels étudiants.

Evidemment, le temps passé à enseigner ou à travailler au labo n'aurait pas pu être productif ni agréable si, en-dehors, les amis et la famille n'étaient pas là pour accompagner la thésarde dans sa difficile première expérience professionnelle... Et là aussi, je peux me vanter d'avoir la chance de posséder une sacrée bande d'amis incroyables ! Pour ne citer que les filles, histoire de rééquilibrer les paragraphes ci-dessus : Emilie, coloc' sans pareille avec qui j'ai partagé au 85 deux ans d'une complicité incroyable, notamment grâce aux "microsoirées" tisanes à se raconter nos vies en long, en large et en travers ; Danielle, compagne de footing et bien plus, dont la gentillesse toute en ténacité est pour moi un modèle ; Isa, embarquée dans la même galère depuis Montrouge : nos thèses s'achèvent en une Happy End commune ; LN et Laulau et les lundis soirs C2F qui nous ont menées sous les projecteurs (avec nos loulous au soutien logistique et aux manettes son & lumière) ; l'irremplaçable Ion-ion qui boucle d'ailleurs aussi sa thèse en même temps que celle-ci, coïncidence ! ; Marjo et son sourire apaisant, toujours présente ; Charlotte et Maylis, dont j'attends les soutenance pour m'initier à la philosophie de l'action par l'art ; etc. Merci les gens, merci pour tout : je ne peux pas tous vous nommer ici, mais je sais que vous vous reconnaîtrez ! Que chacun prenne ce merci pour lui, personnellement.

Et puis bien sûr, avant tout, il y a la famille : là aussi, je ne peux pas nommer tout le monde. Alors je vais me contenter de l'indispensable... Surtout surtout, je remercie mes petits frères, Julien et Etienne, sans qui je n'aurais pas affronté la vie (et donc la thèse...) avec tant de force ! Ce n'est pas un remerciement, mais infiniment plus, que j'adresse à mes parents : l'éducation

qu'ils nous ont fournie est pour moi un modèle, les valeurs qui les font vivre et l'affection qu'ils nous portent sont les cadeaux les plus précieux et les guides les plus beaux de ma vie.

Enfin et par-dessus tout, je remercie celui qui, depuis plusieurs années déjà, a transformé, éclairé, bouleversé ma vie. Sans Olivier, j'aurais certes abandonné cette thèse une bonne douzaine de fois, mais surtout, je ne connaîtrais pas cet équilibre qui me permet d'envisager la vie sereinement, en dépit de toutes les incertitudes qui planent et planeront encore un moment...

Last but not least, citons dans le désordre : les cafards tropicaux et leurs amies souris, qui ont égayé les séances de manip dans le noir du sous-sol ; l'antre de chez Martine et le Chabert, repères d'experts ; un certain Jean-Yves qui ne sait certainement pas que 10 minutes de discussion devant un poster à Salt Lake City m'ont permis de faire faire à la manip un bond phénoménal ; l'éléphant-cible, gage de souplesse ; Joël Collado de Météo France, qui nous a gratifiés d'un temps pourri pendant les mois de juillet et août 2007, sans lequel la rédaction de ce manuscrit n'aurait certainement pas avancé aussi vite ; etc.

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| Remerciements | 3 |
| Introduction | 11 |
| 1 Contexte biomécanique | 15 |
| 1.1 Organisation de la cellule | 15 |
| 1.1.1 La cellule eucaryote et ses compartiments | 15 |
| 1.1.2 La membrane plasmique : lien entre la cellule et son environnement | 16 |
| 1.1.3 Le cytosquelette : un réseau de polymères enchevêtrés et réticulés | 17 |
| 1.1.3.1 Les microtubules | 18 |
| 1.1.3.2 Les microfilaments d'actine | 19 |
| 1.1.3.3 Les filaments intermédiaires | 21 |
| 1.1.3.4 Un gel actif : rôle des moteurs moléculaires | 22 |
| 1.2 Adhérence cellulaire et mécanotransduction | 24 |
| 1.2.1 Aspects biologiques | 24 |
| 1.2.1.1 Les molécules de l'adhérence | 24 |
| 1.2.1.2 Les intégrines : base de l'adhérence cellule-matrice | 25 |
| 1.2.2 Pourquoi et comment étudier l'effet de l'environnement mécanique sur les cellules ? | 26 |
| 1.2.2.1 Les forces au niveau cellulaire | 26 |
| 1.2.2.2 Méthodes expérimentales | 26 |
| 1.2.2.3 Influence de la rigidité du substrat sur la physiologie globale des cellules adhérentes | 27 |
| 1.2.3 Aspects mécaniques et géométriques | 27 |
| 1.2.3.1 Confinement de cellules : effets géométriques et topologiques | 28 |
| 1.2.3.2 Mesures de forces d'adhérence cellule-substrat | 28 |
| 1.2.3.3 Application localisée de forces | 30 |
| 1.2.4 Mécanotransduction aux points de contact | 32 |
| 1.2.4.1 Structure des contacts | 32 |
| 1.2.4.2 Adhérence, mécanotransduction et signalisation | 33 |
| 1.2.4.3 Rôle des forces dans la régulation des adhésions focales | 34 |
| 1.2.4.4 Intégration des forces au niveau de l'ensemble de la cellule | 36 |
| 1.3 Viscoélasticité cellulaire | 37 |
| 1.3.1 Quelques notions de viscoélasticité | 37 |
| 1.3.2 Un modèle viscoélastique simple pour la cellule ? | 38 |
| 1.3.3 Mesures de la viscoélasticité cellulaire | 40 |
| 1.3.3.1 Mesures actives locales en régime sinusoïdal | 40 |
| 1.3.3.2 Mesures en régime de fluage | 44 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1.3.3.3 | Comparaison avec des mesures passives : microrhéologie 1 et 2 points | 45 |
| 1.3.4 | Influence de l'application d'une force sur les propriétés viscoélastiques des cellules | 46 |
| 1.4 | Objectifs de la thèse | 48 |
| 2 | Description du dispositif expérimental | 49 |
| 2.1 | Les pinces optiques | 50 |
| 2.1.1 | Principe du piégeage | 50 |
| 2.1.1.1 | Régime de Mie | 50 |
| 2.1.1.2 | Régime de Rayleigh | 51 |
| 2.1.1.3 | Régime intermédiaire | 52 |
| 2.1.1.4 | Choix de la longueur d'onde | 53 |
| 2.1.2 | Notre dispositif | 53 |
| 2.1.2.1 | Laser et chemin optique | 53 |
| 2.1.2.2 | Le microscope : objectif et cale piézoélectrique | 55 |
| 2.1.2.3 | Détecteur de position | 55 |
| 2.1.3 | Calibration du piège | 57 |
| 2.2 | Préparation des échantillons | 62 |
| 2.2.1 | Culture cellulaire | 62 |
| 2.2.2 | Préparation des billes | 62 |
| 2.2.3 | Préparation des chambres expérimentales | 63 |
| 2.2.3.1 | Ensemencement des lamelles | 63 |
| 2.2.3.2 | Adhésion des billes aux cellules | 63 |
| 2.3 | Manipulations à force imposée | 64 |
| 2.3.1 | Mobilité de l'échantillon par rapport au piège optique | 64 |
| 2.3.2 | La rétroaction | 64 |
| 2.3.2.1 | Principe | 64 |
| 2.3.2.2 | La partie numérique de la rétroaction | 65 |
| 2.3.3 | Pourquoi manipuler à force constante? | 66 |
| 2.4 | Fluorescence : mise en oeuvre, détection, et principe des mesures | 68 |
| 2.4.1 | Transfection des cellules | 68 |
| 2.4.2 | Prise d'image : contraintes en tous genres | 69 |
| 3 | Mécanique cellulaire | 73 |
| 3.1 | Mesure locale de la fonction de fluage d'une cellule | 73 |
| 3.1.1 | Relations contrainte/déformation dans les expériences de pinces optiques | 73 |
| 3.1.1.1 | Cas d'un matériau élastique, de module d'Young E | 75 |
| 3.1.1.2 | Cas d'un fluide visqueux, de viscosité η | 75 |
| 3.1.1.3 | Cas d'un milieu viscoélastique, de module viscoélastique $G(\omega)$ | 76 |
| 3.1.2 | Exemple de mesure d'une fonction de fluage | 76 |
| 3.1.3 | La cellule : une rhéologie en loi de puissance | 78 |
| 3.2 | Caractérisation mécanique des cellules | 81 |
| 3.2.1 | Statistiques sur différents types de cellules | 81 |
| 3.2.1.1 | Lignée A549 | 81 |
| 3.2.1.2 | Comparaison avec les lignées C2 et C2C12 | 83 |
| 3.2.2 | Influence de la densité de coating des billes | 84 |
| 3.2.3 | Récapitulatif des mesures en régime de fluage | 87 |
| 3.3 | Renforcement : réponse à l'application prolongée d'une force | 91 |
| 3.3.1 | Evolution de la rigidité cellulaire pendant l'application d'une force | 91 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.3.1.1 | Mise en évidence du phénomène de renforcement sous contrainte | 91 |
| 3.3.1.2 | Statistique du renforcement | 92 |
| 3.3.1.3 | Renforcement progressif sous contrainte prolongée ou rigidification non-linéaire? | 94 |
| 3.3.2 | Echelle de temps du renforcement | 95 |
| 3.3.2.1 | Exemple et notations | 95 |
| 3.3.2.2 | Résultats sur les C2C12 | 96 |
| 4 | Modifications biologiques dans la zone de contrainte | 99 |
| 4.1 | De l'actine autour du contact bille-cellule | 99 |
| 4.1.1 | Expériences préliminaires | 99 |
| 4.1.2 | Analyse quantitative des images | 99 |
| 4.1.2.1 | Définition des zones d'intérêt | 101 |
| 4.1.2.2 | Quantité d'actine contenue dans les contacts | 101 |
| 4.1.2.3 | Densité d'actine dans le réseau du cytosquelette | 102 |
| 4.1.3 | Caractérisation du phénomène de recrutement | 103 |
| 4.1.3.1 | Expériences de contrôle | 103 |
| 4.1.3.2 | Recrutement dans les contacts | 103 |
| 4.1.3.3 | Recrutement dans le réseau | 106 |
| 4.2 | Couplage entre renforcement et recrutement d'actine | 108 |
| 4.2.1 | Dynamiques comparées | 108 |
| 4.2.2 | Influence de divers paramètres | 109 |
| 4.2.2.1 | Effet de la transfection | 109 |
| 4.2.2.2 | Dépendance en force | 110 |
| 4.2.2.3 | Relaxation de la fluorescence? | 111 |
| 4.2.2.4 | Temps mesuré et temps effectif | 112 |
| 4.3 | Un modèle pour le couplage renforcement/recrutement? | 113 |
| 4.3.1 | Elasticité des gels d'actine <i>in vitro</i> | 113 |
| 4.3.1.1 | Solutions de polymères semi-flexibles | 113 |
| 4.3.1.2 | Effet des agents réticulants : gels de polymères | 114 |
| 4.3.1.3 | Effet des moteurs moléculaires | 114 |
| 4.3.1.4 | Effet de la précontrainte | 114 |
| 4.3.1.5 | Lien avec nos mesures | 114 |
| 4.3.2 | Actine intracellulaire : agrégation dans les contacts et densité du réseau | 115 |
| 4.3.2.1 | Modélisations de l'agrégation de molécules de contact | 115 |
| 4.3.2.2 | Lien avec nos expériences de recrutement | 116 |
| | Conclusion et perspectives | 119 |
| | Bibliographie | 121 |
| | A Agents diminuant la contractilité cellulaire | 129 |
| | B Agents augmentant la contractilité cellulaire | 131 |
| | C Expériences préliminaires | 133 |
| | D Articles publiés ou en cours de publication | 137 |

Introduction

Les cellules sont les constituants élémentaires de tous les êtres vivants. Au sein de chacune d'entre elles, on trouve notamment l'ADN, support du code génétique qui programme le développement de l'organisme et les fonctions de ses différents tissus. Mais on trouve aussi d'autres types de polymères, plus rigides, qui constituent le cytosquelette, l'architecture mécanique de la cellule. On sait désormais que les propriétés mécaniques des cellules ont une importance capitale pour l'ensemble de leurs fonctions : division, migration, différenciation, etc, ne pourraient avoir lieu correctement si la cellule était beaucoup trop ou trop peu rigide. D'ailleurs, les modifications anormales de rigidité cellulaire et tissulaire sont souvent associées à des pathologies. Les cellules tumorales par exemple sont plus rigides que les cellules saines du même tissu¹, ce qui est en lien avec leur prolifération excessive, même si les relations moléculaires précises entre rigidité et prolifération ne sont pas encore clairement établies [93]. On peut aussi évoquer le fait qu'une contractilité accrue des cellules musculaires lisses des voies aériennes est à la base de la pathologie asthmatique [111].

Ces caractéristiques mécaniques se rajoutent d'ailleurs aux complexes signaux biochimiques que les cellules sont capables d'intégrer. Signaux biomécaniques et signaux biochimiques sont donc à la base des communications cellulaires, permettant le fonctionnement global des tissus et de l'ensemble de l'organisme.

On distingue deux types cellulaires très différents au point de vue mécanique et physiologique : les cellules circulantes (globules rouges, leucocytes) et les cellules adhérentes. Ce dernier type comporte toutes les cellules formant les tissus (muscles, épithélium, ...) : elles contiennent à leur surface des molécules capables de les lier à leurs voisines ou à un substrat. Ce sont ces cellules que nous étudions ici : nous exploitons leurs propriétés d'adhérence et tentons de comprendre comment les relier à leurs caractéristiques mécaniques. En effet, au niveau de ces molécules s'assemblent des complexes protéiques jouant un rôle de mécanotransducteurs : les signaux mécaniques peuvent y être transformés en signaux biochimiques et vice-versa. La mécanotransduction liée à l'adhésion, et ses effets physiologiques sur différents types cellulaires est un domaine de la biophysique en plein développement.

Il importe donc de pouvoir quantifier les propriétés mécaniques des cellules. Or il s'avère qu'elles n'ont pas un comportement mécanique simple : elles ne peuvent être décrites ni comme des solides élastiques ni comme des liquides visqueux. De tels matériaux, dits viscoélastiques, vont se déformer en réponse à une contrainte de façon non triviale. Les études de rhéologie cellulaire consistent à mesurer ces relations entre contrainte et déformation, et à les quantifier, par exemple en terme de module élastique équivalent (l'analogie du module d'Young E) et de viscosité équivalente (l'analogie de la viscosité η). Les premières mesures de rhéologie étaient réalisées sur des tissus placés dans un rhéomètre de taille macroscopique [43]. Pour passer à des mesures sur cellules, il a fallu développer des outils de micromanipulation très précisément contrôlés en force et en position : les cellules font quelques dizaines de μm de taille, et elles ne peuvent résister à des forces excédant quelques dizaines de nN.

¹C'est d'ailleurs une des méthodes de détection du cancer du sein.

On peut distinguer différents types d’approches pour caractériser la rhéologie à un niveau sub-cellulaire :

- l’utilisation de traceurs (petites particules ou vésicules endogènes) dont on enregistre les fluctuations de mouvements : c’est une expérience de microrhéologie passive ;
- l’application d’une contrainte constante et la mesure de la déformation associée : c’est une expérience de fluage. On peut aussi appliquer une déformation contrôlée et mesurer la contrainte développée par la cellule en réponse : c’est une expérience de relaxation ;
- l’application d’une contrainte oscillante à une fréquence donnée, avec mesure de la déformation à la même fréquence : c’est une mesure de rhéologie dynamique ;

En s’inspirant du dispositif de pinces optiques existant au laboratoire, et avec lequel des mesures de rhéologie dynamique ont été réalisées sur plusieurs types cellulaires et dans diverses conditions biochimiques [8, 10], nous avons choisi de mettre au point une expérience de fluage local par pinces optiques. La force est alors appliquée *via* des billes microniques liées aux cellules.

Il a fallu, afin de maintenir constante la force appliquée au cours du temps, développer un dispositif de rétroaction : la force est mesurée à tout instant et sa valeur est réajustée à la valeur de consigne dès qu’elle s’en écarte. On mesure la déformation cellulaire causée par l’application de la force, déformation d’autant plus faible que la cellule est rigide : on obtient ainsi une estimation locale du module viscoélastique cellulaire.

L’objectif de ce travail a aussi été de relier les résultats mécaniques ainsi obtenus à l’état du cytosquelette d’actine dans la cellule, pendant l’application de la force. L’actine est en effet le polymère du cytosquelette jouant un rôle prépondérant dans les propriétés mécaniques des cellules. Le cytosquelette d’actine étant visualisé en épifluorescence (après transfection des cellules à l’actine-GFP), on peut obtenir une mesure de la densité d’actine dans la cellule au cours du temps. On a observé que la dynamique d’évolution de la densité d’actine semble très étroitement liée à la dynamique de rigidification de la cellule en réponse à la force appliquée.

Ce manuscrit se décompose en quatre chapitres.

Le premier présente rapidement les constituants cellulaires, ainsi que leurs rôles dans le fonctionnement d’une cellule. L’état actuel des connaissances sur l’adhérence et la mécanotransduction est passé en revue, ainsi que les propriétés viscoélastiques des cellules obtenues par différents types de mesures. Ceci constitue le contexte biologique et biomécanique dans lequel s’inscrit notre étude.

Dans le deuxième chapitre nous présentons le dispositif expérimental que nous avons mis en œuvre pour cette étude : le principe des pinces optiques y est rappelé, et la façon dont fonctionne la rétroaction (destinée à maintenir constante la force exercée localement sur la cellule) est précisée. Nous détaillons aussi les protocoles biologiques utilisés sur les cellules, ainsi que la façon dont nous avons couplé la détection de fluorescence au dispositif de pinces optiques.

Dans le troisième chapitre, nous exposons les résultats de mécanique cellulaire que nous avons obtenus sur trois types cellulaires différents. Ces résultats sont cohérents avec ce qui avait été mesuré au laboratoire précédemment, par d’autres méthodes. Puis nous examinons la réponse des cellules à l’application prolongée de la force : nous verrons alors apparaître le phénomène de rigidification sous contrainte.

Enfin, dans le quatrième chapitre, nous présentons les résultats tirés de la détection de fluorescence, analysée de façon semi-quantitative. Ces mesures font apparaître un recrutement d’actine au cours du temps, en réponse à la force appliquée. On peut comparer ces résultats de recrutement d’actine avec la dynamique de rigidification, et on voit apparaître une forte corrélation entre les deux phénomènes. L’interprétation théorique de cette corrélation reste sous forme d’ébauche, mais constitue la principale piste à suivre afin d’exploiter au mieux nos résultats expérimentaux.

Quatre annexes viennent compléter ce manuscrit. Les annexes A et B résument l'action de divers agents biochimiques sur la contractilité du cytosquelette d'actine. Elles sont présentes ici à titre de références, et dans le but de pouvoir se servir d'un ou plusieurs de ces agents pour compléter notre étude sur la dynamique de renforcement du réseau d'actine en réponse à une force extérieure. L'annexe C présente les résultats obtenus lors d'expériences réalisées à l'Institut Jacques-Monod. Ces expériences ont constitué un préliminaire au travail réalisé durant le reste de la thèse. Enfin, l'annexe D présente les articles publiés en cours de thèse (dont le principal est inclus en fin de manuscrit) ou encore en cours de publication.

Chapitre 1

Contexte biomécanique : la cellule, ses constituants, et ses propriétés mécaniques

Ce chapitre résume le contexte dans lequel s'inscrit notre étude : comprendre les propriétés mécaniques des cellules adhérentes. En effet, un grand nombre de processus nécessaires à la vie des cellules et au développement des tissus dépend de leur capacité à se déformer, à transmettre des forces, ou à effectuer des mouvements coordonnés ou dirigés. Cela est rendu possible, d'une part grâce au réseau dynamique de protéines en constante réorganisation qui constitue l'architecture des cellules eucaryotes : le cytosquelette ; et d'autre part grâce aux molécules qui maintiennent les cellules en contact avec leur substrat : les protéines d'adhérence. Cytosquelette et protéines d'adhérence sont d'ailleurs en interaction permanente et complexe. La référence bibliographique principale, [1], sera citée exclusivement ici, mais pourrait l'être presque à chaque ligne de ce chapitre.

1.1 Organisation de la cellule

1.1.1 La cellule eucaryote et ses compartiments

Les cellules qui constituent les organismes animaux résultent de l'évolution des cellules primitives (procaryotes) en cellules plus complexes, les eucaryotes, dont un schéma général est présenté sur la figure 1.1. Elles sont entourées d'une membrane, et organisées en plusieurs compartiments, délimités chacun par leur propre membrane. Le compartiment central, le noyau (en bleu sur le cliché d'une cellule marquée et observée en épifluorescence de la figure 1.3) contient l'information génétique de la cellule, codée dans les filaments d'ADN, présents sous forme de chromosomes ou de chromatine. Contre le noyau se trouvent le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, où ont lieu la synthèse des protéines à partir de l'ARN messenger, ainsi que leur maturation. On trouve aussi les mitochondries, où s'effectuent la respiration cellulaire et la synthèse d'ATP.

L'ATP (adénosine triphosphate) est la molécule-carburant, consommée dans les réactions enzymatiques ayant lieu à tous les niveaux de la vie cellulaire. Ainsi la réaction de base ayant lieu pour fournir de l'énergie nécessaire à un processus biochimique est :



avec libération de 30,5 kJ/mol. Certaines réactions enzymatiques utilisent comme source d'énergie, de façon équivalente, l'hydrolyse des dérivés phosphatés d'autres nucléosides, comme le GTP

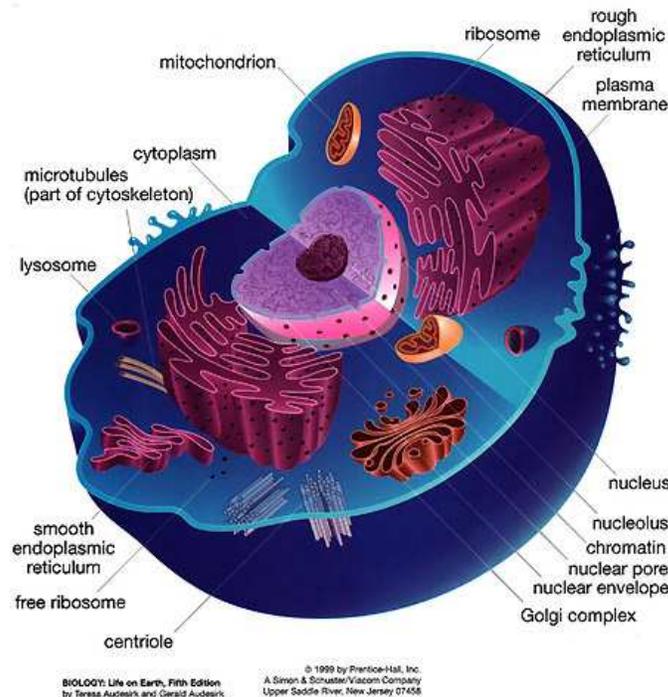


FIG. 1.1 – Schéma de cellule animale [D’après T. Audesirk, G. Audesirk, *Biology : Life on Earth, Fifth Edition*, Prentice Hall College Div (1998)].

(guanosine triphosphate).

1.1.2 La membrane plasmique : lien entre la cellule et son environnement

La membrane plasmique, bicouche lipidique qui délimite la cellule, est fondamentale pour son fonctionnement, et ce à plusieurs titres.

Elle est globalement imperméable, et permet donc de maintenir de forts gradients de concentration en différents types de molécules entre le liquide extracellulaire et le liquide intracellulaire, ou cytosol. La concentration intracellulaire en ions Ca^{2+} par exemple, est 10^{-4} fois moins élevée que celle du milieu extracellulaire.

Comme on le voit sur la figure 1.2, elle enchâsse des protéines qui assurent des fonctions de reconnaissance de signaux biochimiques, et d’activation d’autres molécules en réponse à ces signaux. Certaines d’entre elles, les protéines transmembranaires, traversent la membrane de part en part. Elles peuvent donc, sur leur domaine extracellulaire, lier certaines molécules spécifiques, ce qui active en général leur domaine cytosolique pour agir sur ses protéines intracellulaires cibles. Cette transduction de signal permet aux cellules de répondre aux sollicitations de tous types de leur environnement.

Et enfin, elle est une structure dynamique et fluide, dans laquelle ces protéines diffusent à deux dimensions. *In vivo*, la membrane plasmique fait en général apparaître différentes zones, au sein desquelles la diffusion des protéines est libre, mais entre lesquelles se trouvent des barrières étanches. Ces zones correspondent aux différentes fonctions que peut gérer la cellule. Par exemple, dans les cellules épithéliales de l’intestin, certaines enzymes ou protéines de transport sont limitées à la face apicale qui permet les échanges avec la lumière de l’intestin où passent les nutriments, alors que d’autres sont présentes uniquement en face basale, de façon à gérer les échanges avec les

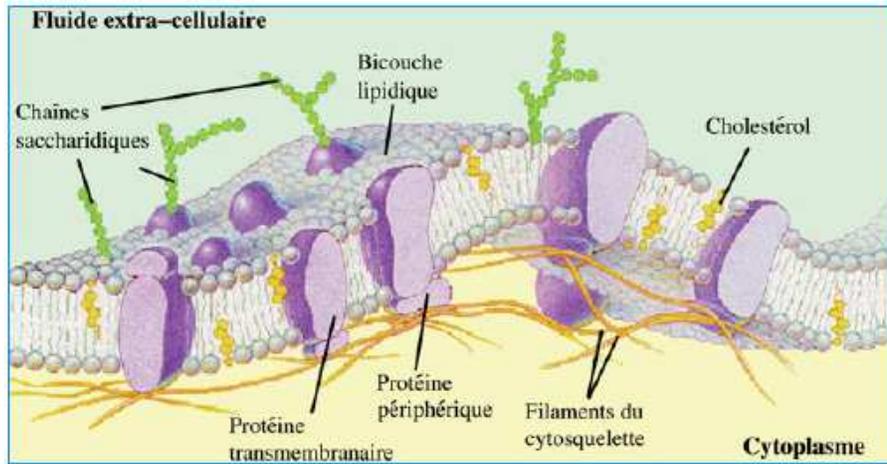


FIG. 1.2 – Schéma de membrane cellulaire, avec ses composants lipidiques et les protéines qui y sont enchâssées. La bicouche a une épaisseur de l'ordre de 5 nm. [D'après G. Geibel, <http://sun.menloschool.org/>].

capillaires sanguins sous-jacents. Des expériences de suivi de particules uniques (petites particules d'or liées à des protéines membranaires) ont permis de mesurer des coefficients de diffusion à deux dimensions de protéines dans la membrane plasmique : leur ordre de grandeur est de 10^{-12} à $10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, selon la composition lipidique de celle-ci [71, 24].

Les membranes biologiques sont à la base de systèmes modèles très versatiles : les liposomes. Ils sont formés d'une bicouche lipidique fermée en sac, dont on peut contrôler la composition en lipides, ainsi que la composition de la solution contenue à l'intérieur. Ils sont utilisés par exemple pour réaliser des systèmes minimaux mimétiques de la cellule, de façon à en comprendre les divers aspects de façon séquentielle : les divers domaines lipidiques observés dans les membranes et leurs propriétés visqueuses [105] ; les propriétés mécaniques du cortex d'actine sous-tendant la membrane [58] ; les forces développées par la croissance des microtubules [44]... Les potentielles applications biomédicales sont très prometteuses : en y encapsulant des molécules, et en adressant ces vésicules vers un organe cible, on évite la dissémination du traitement à travers le reste de l'organisme. Cet adressage peut être biochimique (par greffage de molécules à la surface externe de la bicouche) ou mécanique (par guidage magnétique [42]).

1.1.3 Le cytosquelette : un réseau de polymères enchevêtrés et réticulés

Mais ce n'est pas la membrane plasmique, complètement fluide, qui donne à la cellule sa forme et sa résistance mécanique : le cytoplasme intracellulaire abrite une véritable architecture de polymères réticulés, le cytosquelette. Ce réseau contient des filaments protéiques de trois grands types différents : l'actine (en rouge sur la figure 1.3), les microtubules (en vert), et les filaments intermédiaires.

Une caractérisation physique simple de ces polymères semi-rigides est leur longueur de persistance l_p . Elle désigne la longueur à partir de laquelle on perd les corrélations d'orientation entre deux points du filament (ce qui correspond à peu près à la longueur à partir de laquelle le filament acquiert une courbure apparente). On peut commencer par définir l'énergie de courbure E_{bend} :

$$E_{bend} = \frac{\kappa}{2L} \int_0^L \left(\frac{\partial \theta}{\partial s} \right)^2 ds \simeq \kappa \frac{L}{2R^2} \quad (1.2)$$

où $\kappa \sim Ea^4$ est le module de courbure, a le rayon du filament, E son module d'Young, R son rayon de courbure et L sa longueur. Et on définit l_p par rapport à l'énergie de courbure et l'énergie d'agitation thermique :

$$E_{bend}(L = l_p, R = l_p) = \kappa \frac{l_p}{2l_p^2} = \frac{k_B T}{2} \quad \text{soit} \quad l_p = \frac{Ea^4}{k_B T} = \frac{\kappa}{k_B T} \quad (1.3)$$

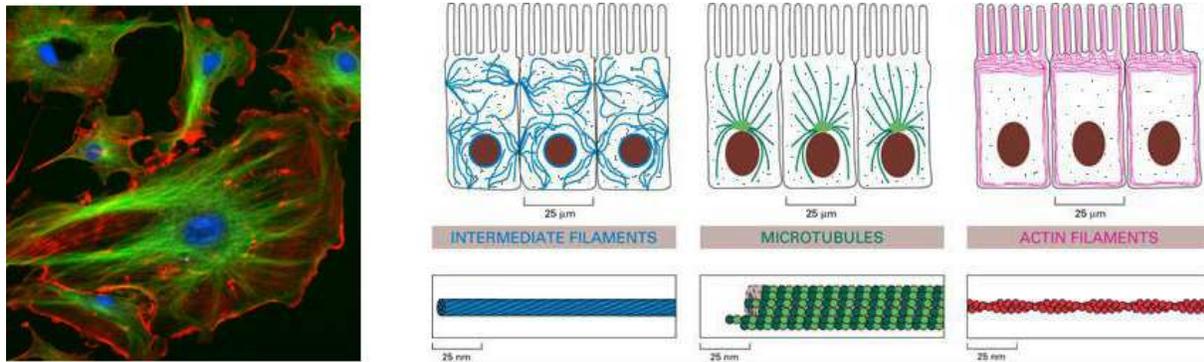


FIG. 1.3 – Gauche : Cliché en épifluorescence de cellule marquée pour l'ADN (au DAPI, en bleu), la F-actine (marquée à la X-Phalloïdine, en rouge) et les microtubules (marquées au Bodipy, en vert) [D'après le catalogue Invitrogen - Molecular Probes]. Droite : schéma de la répartition des 3 types de filaments du cytosquelette dans une cellule épithéliale [D'après [1]].

1.1.3.1 Les microtubules

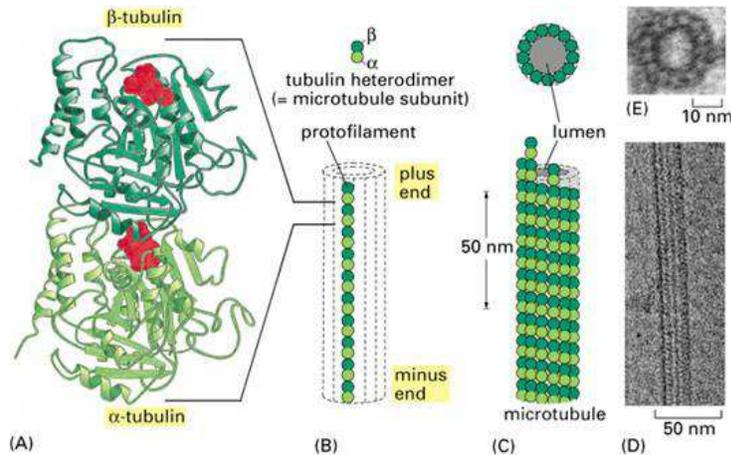


FIG. 1.4 – Schémas de polymérisation d'un microtubule : un dimère d' α et β tubuline (A) forme un protofilament (B), 13 protofilaments s'assemblent pour former un tube (C) ; micrographies électroniques d'un microtubule en vue "de profil" (D) ou "de face" (E) [D'après [1]].

Propriétés physico-chimiques Les microtubules sont les polymères les plus rigides du cytosquelette. Ils sont formés à partir d'un dimère d' α et de β tubuline, de poids moléculaire 100 kDa et de diamètre 8 nm environ. La concentration intracellulaire en tubuline est typiquement de

l'ordre de 20 μM . Les dimères s'associent sous forme de tube creux, comportant 13 protofilaments. Ces tubes, les microtubules, ont un diamètre de 25 nm. Leur longueur de persistance vaut $l_p \sim 1$ mm et leur module d'Young $E \sim 1$ GPa, grandeurs déterminées dans des expériences *in vitro* en observant les fluctuations de courbure des filaments [53].

Propriétés biochimiques et physiologiques Ce filament est polaire : les constantes d'association et de dissociation des dimères sont différentes aux deux extrémités du microtubule. On les désigne respectivement par extrémité "-" (celle à laquelle prédomine la dépolymérisation, et qui est stabilisée par son ancrage au centrosome, complexe protéique nucléateur du réseau de microtubules) et extrémité "+" (celle au bout de laquelle la croissance est la plus grande). Au bout "+", cependant, on observe un phénomène d'instabilité dynamique : les périodes de croissance lente peuvent être interrompues par des périodes de dépolymérisation rapide, nommées "catastrophes". Cette dépolymérisation est due à l'hydrolyse d'une molécule de GTP portée par la partie β du dimère, après son assemblage. Cette hydrolyse change la conformation de la sous-unité et déstabilise le microtubule. La longueur des microtubules *in vivo* peut atteindre plusieurs dizaines de μm voire 100 μm . A la membrane cellulaire, des protéines manchons peuvent se fixer au bout "+" et modifier leur stabilité.

Ainsi, le réseau de microtubules est une structure hautement dynamique. En constante réorganisation, il exerce des pressions aux extrémités de la cellule, et permet ainsi au centrosome de se positionner assez précisément au centre ¹ du corps cellulaire, près du noyau [59, 117]. Le réseau rayonne donc en aster autour du centrosome, tant que les cellules n'entrent pas en division (car alors il s'organise sous forme de fuseau mitotique de façon à positionner et séparer les chromosomes).

De nombreuses protéines peuvent se lier aux microtubules (les *Microtubule Associated Proteins* ou MAP) ou aux monomères de tubuline, et modifier la stabilité des filaments [29]. Certaines de ces molécules sont présentes dans les cellules et sont activées ou non, selon les signaux reçus par la cellule ou selon les moments du cycle cellulaire. D'autres sont utilisées comme drogues, afin de contrôler l'état du squelette de microtubules (cf. annexe B pour plus de détails) : par exemple, la colchicine a un effet globalement dépolymérisant, car en se liant aux monomères de tubuline, elle empêche leur incorporation aux microtubules ; le taxol au contraire stabilise les microtubules, dont la dépolymérisation est diminuée.

1.1.3.2 Les microfilaments d'actine

Propriétés physico-chimiques A l'opposé, les filaments d'actine sont les plus fins : ce sont des doubles hélices de diamètre 7 à 9 nm, formées à partir du monomère d'actine globulaire (G-actine, cf fig. 1.5). De poids moléculaire 24 kDa, la G-actine est présente à une concentration de 50 à 200 μM dans les cellules, et environ 50% de l'actine y est présente sous forme de monomère, le reste étant engagé dans les filaments (F-actine). La longueur de persistance des microfilaments vaut environ 10-15 μm [62], et leur module d'Young 0,5 GPa, du même ordre que celui des microtubules. Cependant, contrairement aux microtubules, l'actine n'est pas présente dans la cellule sous forme de filaments isolés, mais sous forme de réseaux. Le passage de la description d'un filament unique à celle d'un réseau de filaments enchevêtrés, réticulés et pouvant même coulisser les uns par rapport aux autres comme nous allons le décrire, n'est évidemment pas simple. Des modèles théoriques [80, 70] ainsi que des expériences d'assemblage de gels d'actine *in vitro* [76, 46, 47, 48, 115], visant à comprendre les propriétés mécaniques de tels gels sont en plein développement. Nous y reviendrons au 4.3.1, car ces systèmes modèles peuvent nous aider à mieux comprendre le rôle de l'actine dans les propriétés mécaniques des cellules [13].

¹la notion de "centre" n'étant pas ici purement géométrique, mais plutôt un barycentre intégrant des considérations mécaniques, biochimiques, etc de la cellule en question.

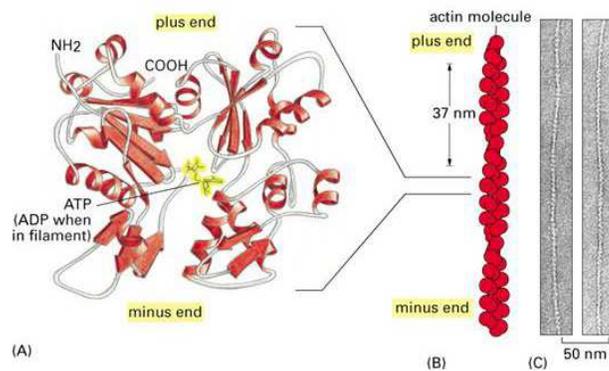


FIG. 1.5 – L'actine : schémas de structure du monomère avec son site de liaison à l'ATP (A) et du filament (B) ; et micrographies électroniques de filaments (C). [D'après [1]].

Propriétés biochimiques Le monomère d'actine fixe une molécule d'ATP, qui peut être hydrolysée en ADP après incorporation de l'unité au filament, ce qui favorise alors la dépolymérisation. La F-actine est donc aussi un filament polaire : les constantes de polymérisation k_{on} et dépolymérisation k_{off} ne sont pas les mêmes aux deux bouts ; et on désigne, de même, par "+" (ou barbée) l'extrémité à laquelle le taux de polymérisation est presque 10 fois plus grand qu'à l'autre (bout "-", ou pointu).

De nombreuses protéines de liaison à l'actine modifient les propriétés de l'actine G ou F, stabilisant ou déstabilisant les filaments [64, 126, 97]. La gelsoline et la cofiline, par exemple, sont des protéines de coiffe qui contrôlent la longueur des filaments en s'attachant à l'une des extrémités.

Le mécanisme de polymérisation/dépolymérisation de l'actine (illustré sur la fig. 1.6) permet ainsi un mouvement global du filament, appelé "treadmilling", utilisé notamment par certaines bactéries comme *Listeria Monocytogenes* pour se mouvoir à l'intérieur des cellules qu'elles infectent. La polymérisation d'une comète d'actine à l'arrière de la bactérie la propulse vers l'avant. Des expériences *in vitro* de polymérisation d'actine autour de billes [133, 83] ou de gouttes d'huile [16] ont permis de reproduire ce phénomène : les forces générées (de l'ordre de plusieurs nN) sont suffisantes pour déplacer ces objets à des vitesses reproduisant bien les vitesses des bactéries *in vivo* (quelques $\mu\text{m}/\text{min}$).

Propriétés physiologiques Ainsi le réseau d'actine est à la base des propriétés dynamiques des cellules. Selon les protéines qui se lient aux filaments (les *Actin Binding Proteins*, ABP, de très nombreux types différents), ils sont organisés en deux structures particulières, aux propriétés différentes [97, 125].

- les protéines de faisceau (fascine, fimbrine, villine, espine...) alignent les filaments en faisceau parallèle, contractile (comme dans les fibres de tension, ou les fibres musculaires, la contractilité étant assurée par les myosines : cf. 1.1.3.4) ou non contractile (comme dans les microspicules ou filopodes).
- les protéines de pontage (filamine, complexe Arp2/3...) connectent les filaments en imposant un certain angle entre eux, formant un gel densément réticulé. Un tel gel est souvent présent juste sous la membrane cellulaire, et détermine ses propriétés mécaniques. Il est appelé cortex. On trouve aussi à l'avant des cellules migrantes (kératocytes ou fibroblastes) une protrusion membranaire contenant un mince feuillet de gel d'actine hautement dynamique : le lamellipode [2, 123]. Des observations en microscopie électronique ou de fluorescence, ou simplement de contraste de phase, ont permis de mettre en évidence que c'est la polymé-

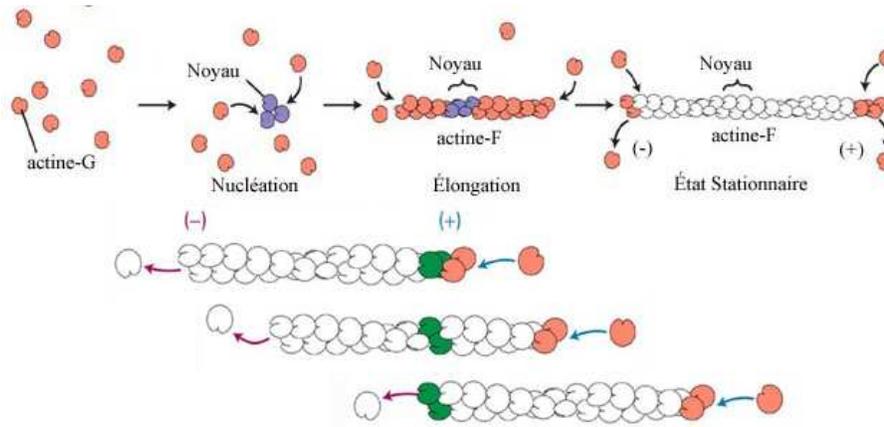


FIG. 1.6 – La nucléation et la polymérisation d'un filament d'actine, avec le principe du treadmilling : les monomères sont incorporés au bout "+", et sont libérés du bout "-", ce qui cause un déplacement global du filament (ici vers la droite) [D'après Lodish et al., *Molecular Cell Biology*, 5th Edition(2003)].

risation des filaments d'actine qui pousse la membrane du lamellipode vers l'avant (par le phénomène de treadmilling décrit précédemment).

De même que pour les microtubules, la cellule a donc développé de complexes stratégies moléculaires pour contrôler les assemblages d'actine qui lui permettent d'assurer des fonctions très diverses. Ainsi de nombreuses protéines kinases, enzymes agissant par phosphorylation de protéines cibles interagissant ensuite avec l'actine, peuvent en réponse à un signal externe, activer des processus tels que croissance, mouvement, différenciation ou même apoptose de la cellule.

De nombreuses autres substances peuvent être utilisées pour contrôler l'intégrité mécanique des cellules, en agissant sur l'actine directement ou indirectement (cf. tableaux en annexe A et B) : par exemple, les cytochalasines empêchent la polymérisation en se liant au bout "+" du microfilament, alors que la phalloïdine a au contraire un effet rigidificateur en stabilisant le filament par sa liaison sur l'ensemble de celui-ci.

1.1.3.3 Les filaments intermédiaires

La dernière grande classe de polymères du cytosquelette, les filaments intermédiaires, est plus hétérogène. Ils sont formés à partir de molécules allongées qui s'enroulent d'abord sous forme de dimères, qui eux-mêmes s'assemblent de façon anti-parallèle en tétramères, et finalement donnent des fibres de 8 à 12 nm de diamètre (cf fig 1.7). Ces fibres sont donc apolaires, contrairement aux filaments d'actine et aux microtubules. Elles sont aussi beaucoup plus stables, et une très faible fraction de molécules reste sous forme monomérique dans le cytoplasme.

On en distingue 4 types principaux. Les lamines sont présentes dans toutes les cellules eucaryotes, et forment la lamina nucléaire, un réseau serré soutenant la membrane nucléaire. Les kératines, de divers types, sont présentes dans les cellules épithéliales et leurs dérivés (ongles et cheveux par exemple). De nombreux types cellulaires expriment la vimentine au cours de leur développement, et synthétisent éventuellement des protéines apparentées à la vimentine selon leurs fonctions biologiques : desmine dans les muscles, filaments gliaux dans les astrocytes du système nerveux central ... Et enfin on trouve les neurofilaments dans les axones et le corps central des neurones.

Ces fibres sont très résistantes, ce qui leur donne un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité mécanique des cellules. Les réseaux de vimentine, par exemple, se déforment facilement sous

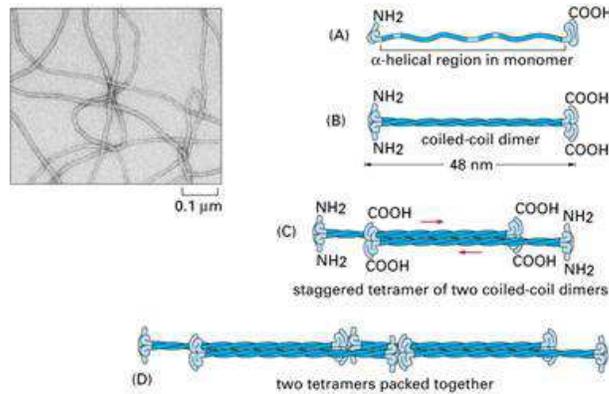


FIG. 1.7 – L'assemblage des filaments intermédiaires [D'après [1]].

l'effet d'une contrainte mécanique, mais sans se rompre contrairement aux réseaux d'actine et de microtubules [65]. Les filaments de kératine, eux, sont densément engagés dans des jonctions entre cellules épithéliales (desmosomes), et assurent donc la résistance globale du tissu.

1.1.3.4 Un gel actif : rôle des moteurs moléculaires

Des moteurs sur les microtubules pour gérer le trafic cellulaire Parmi leurs fonctions d'organisation de la vie cellulaire, les microtubules sont des rails qui permettent le transport et le positionnement de vésicules et d'organites. Parmi les grandes classes de moteurs moléculaires "marchant" sur les microtubules, les kinésines se dirigent vers le bout "+" tandis que les dynéines vont vers le bout "-". Pour avancer, ces molécules hydrolysent l'ATP, et utilisent l'énergie libérée avec une très grande efficacité pour se déplacer, grâce à des changements dans leur conformation. Ce n'est que récemment que l'on a réussi à élucider le mécanisme précis par lequel ces moteurs progressent [136], grâce à des techniques d'imagerie de fluorescence à très haute résolution spatiale et temporelle.

Des moteurs sur l'actine pour contracter les cellules Sur les filaments d'actine, en plus des protéines de "cross-link" qui assurent la réticulation des filaments entre eux, viennent se fixer des moteurs moléculaires processifs, les myosines. Il existe deux grandes classes de myosines : les myosines I, dont la fonction est de déplacer des vésicules le long des filaments, et les myosines II, qui peuvent faire glisser les filaments les uns par rapport aux autres. Ce sont donc les myosines II auxquelles nous nous intéresserons par la suite, pour leur rôle dans la contractilité cellulaire.

La myosine II est un dimère (cf fig. 1.8.A) : elle contient une queue en bâtonnets enroulés, et deux têtes identiques, possédant une fonction ATPase et une activité motrice. Les chaînes légères présentes au niveau des têtes (Myosin Light Chain, ou MLC) doivent d'abord être activées par phosphorylation, pour que chaque tête de myosine puisse se fixer à un filament d'actine. Une fois fixée, la tête de myosine peut se lier à une molécule d'ATP, ce qui l'éloigne temporairement du filament ; puis hydrolyser l'ATP, en changeant sa conformation ce qui provoque un déplacement vers l'avant ; puis relâcher la molécule de phosphate, ce qui lui permet de se refixer sur le filament ; et enfin générer une force, en expulsant l'ADP restant (cf figure 1.8.C). L'actine étant aussi un filament polaire, ces moteurs ont un sens privilégié de déplacement : de l'extrémité "-" vers l'extrémité "+". On comprend alors que si deux microfilaments d'actine sont disposés "tête-bêche", la progression des têtes de deux myosines attachées entre elles et sur chacun d'eux va les faire coulisser l'un par rapport à l'autre. C'est par ce mécanisme que les myosines II génèrent dans les cellules des forces contractiles.

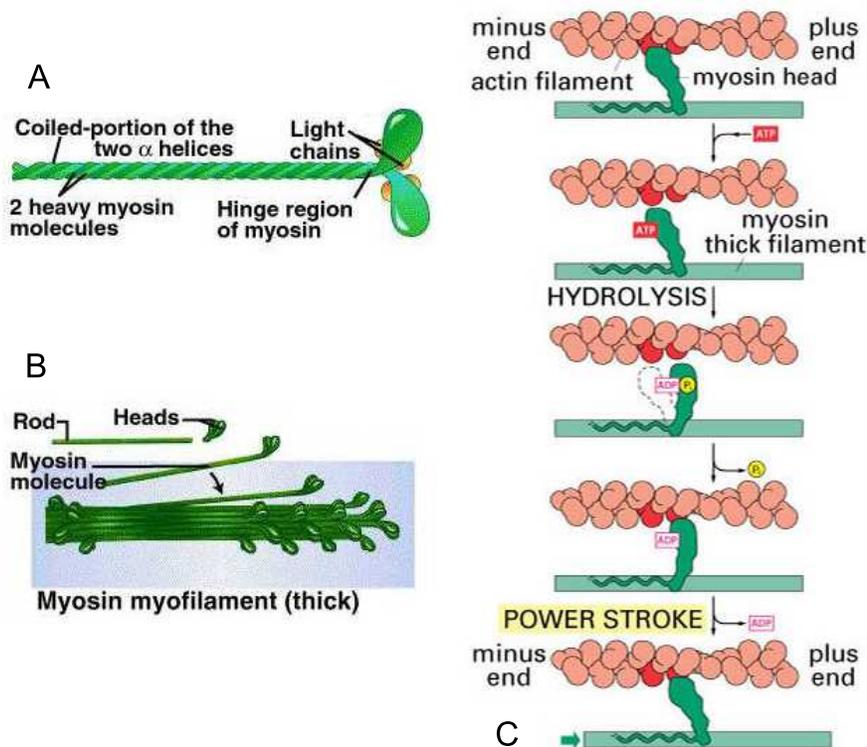


FIG. 1.8 – La myosine II et son interaction avec les microfilaments d'actine [D'après [1] et S. J. Hall, *Basic Biomechanics*, 4th Edition].

On les retrouve dans différents types de cellules : dans les cellules de muscles striés, elles s'assemblent sous forme de filaments de myosines, filaments dits "épais" (cf fig. 1.8.B), et peuvent ainsi exercer les forces nécessaires à la contraction musculaire. Dans les autres types de cellules, elles restent dans le cytoplasme, sous forme de dimères ou de structures multimériques bipolaires, liées à l'actine si elles sont activées. En l'absence d'ATP (ou en présence de la drogue blebbistatine qui inhibe l'activité ATP-asiqne des têtes de myosines (cf. annexe A)), les myosines jouent alors seulement le rôle d'agents réticulants ("cross-linkers") passifs [87].

Le caractère très dynamique du réseau d'actine, avec des filaments en constante réorganisation (via la polymérisation/dépolymérisation, via l'action des différentes protéines de "cross-link"...), en fait le candidat idéal pour expliquer la plupart des phénomènes dynamiques qu'exhibent les cellules. La présence des myosines, dont l'activité peut être régulée par de complexes voies de signalisation, joue aussi un rôle dans les propriétés mécaniques des cellules, comme nous le verrons au 1.3.3.1 (figure 1.27) et au 4.3.1.

1.2 Adhérence cellulaire et mécanotransduction

1.2.1 Aspects biologiques

In vivo, mis à part quelques catégories de cellules pouvant "vivre" en suspension (cellules circulantes du sang, macrophages), la plupart des cellules sont adhérentes. Elles adhèrent les unes aux autres ou à un substrat de filaments protéiques enchevêtrés : la matrice extracellulaire, via des protéines enchâssées dans leur membrane. Sur le schéma de la figure 1.9 sont représentés les quatre grands types de jonctions entre la cellule et son environnement, mais nous ne nous intéressons ici qu'au quatrième type : les jonctions d'ancrage, abondantes dans les tissus soumis à de fortes tensions.

Les molécules d'adhérence assurent le contact mécanique entre la cellule et son environnement, et jouent un rôle de mécanotransduction fondamental : la croissance, la différenciation et beaucoup de fonctions (motilité, expression de certains gènes...) dépendent en grande partie des propriétés mécaniques de l'environnement des cellules.

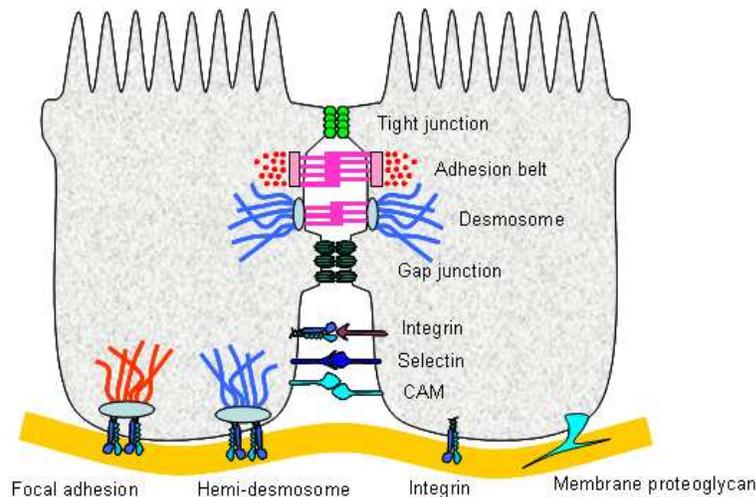


FIG. 1.9 – Les différentes classes de jonctions cellulaires : 1. jonctions étanches ou serrées ("tight junction"), établissant une barrière étanche au niveau du feuillet épithélial entre la lumière et les vaisseaux ; 2. ceinture d'adhérence assurant la cohésion entre cellules adjacentes (par le biais des cadhérines, en rose) ; 3. jonctions communicantes (Gap et synapses), permettant le passage de petites molécules-signal entre deux cellules ; 4. jonctions d'ancrage, maintenant la cellule en contact avec son substrat [D'après http://www.steve.gb.com/science/cell_communication.html].

1.2.1.1 Les molécules de l'adhérence

Au niveau de ces jonctions viennent s'attacher certains filaments du cytosquelette. On peut donc distinguer :

- ◆ les sites d'attachement entre cellules du même type, assurés par les protéines de la famille des cadhérines :
 - ◇ les desmosomes, sur lesquels s'ancrent les filaments intermédiaires
 - ◇ les jonctions d'adhérence qui sont entourées d'une ceinture de filaments d'actine
- ◆ les sites d'attachement entre cellules de type différent, assurés par les immunoglobulines de la famille CAM (pour "Cell Adhesion Molecule") : par exemple les ICAM-1, exprimés à la

surface des cellules épithéliales activées par la présence d'une inflammation, ce qui permet aux macrophages de s'y attacher et ainsi de migrer vers le site de l'inflammation.

- ◆ les sites d'attachement entre cellule et matrice extracellulaire, assurés par la grande famille de glycoprotéines que forment les intégrines :
 - ◇ les hemi-desmosomes, sur lesquels s'ancrent les filaments intermédiaires
 - ◇ les contacts focaux, qui sont en contact étroit avec les filaments d'actine, et auxquels notre étude s'intéresse plus particulièrement.

1.2.1.2 Les intégrines : base de l'adhérence cellule-matrice

Les intégrines sont des hétérodimères dont les 2 sous-unités α et β sont liées de façon non covalente. On a identifié à ce jour 18 types de sous-unités α et 8 types de sous-unités β [66]. Chaque sous-unité contient un grand domaine extracellulaire (qui se lie à certains sites spécifiques des filaments de la matrice), un domaine confiné dans la membrane, et un domaine cytoplasmique (*cf* figure 1.10.A.). Leur affinité pour leurs ligands est à la base relativement faible, et est régulée par un grand nombre de signaux extracellulaires (cations, facteurs de croissance [32, 104]) ou intracellulaires (cascades de signalisation multiples). Etant présentes en grande concentration à la surface des cellules, elles peuvent donc, selon les situations physiologiques, soit explorer rapidement et efficacement leur environnement si leur liaison au site d'ancrage de la matrice est faible, soit résister à des tensions mécaniques fortes exercées par le substrat si leur liaison se renforce et qu'elles se rassemblent sous forme d'agrégats (ou "clusters"). Les intégrines peuvent se lier à un grand nombre de ligands, notamment à des filaments protéiques de la matrice extracellulaire : fibronectine, collagène, laminine... et chaque ligand est reconnu par plusieurs types d'intégrines différents. Par exemple, le motif RGD de la fibronectine est reconnu par les intégrines $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_V\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, et $\alpha_{IIb}\beta_3$. La liaison aux ligands nécessite l'intervention des 2 sous-unités, et la présence de cations divalents Ca^{2+} ou Mg^{2+} (*cf* fig. 1.10.A).

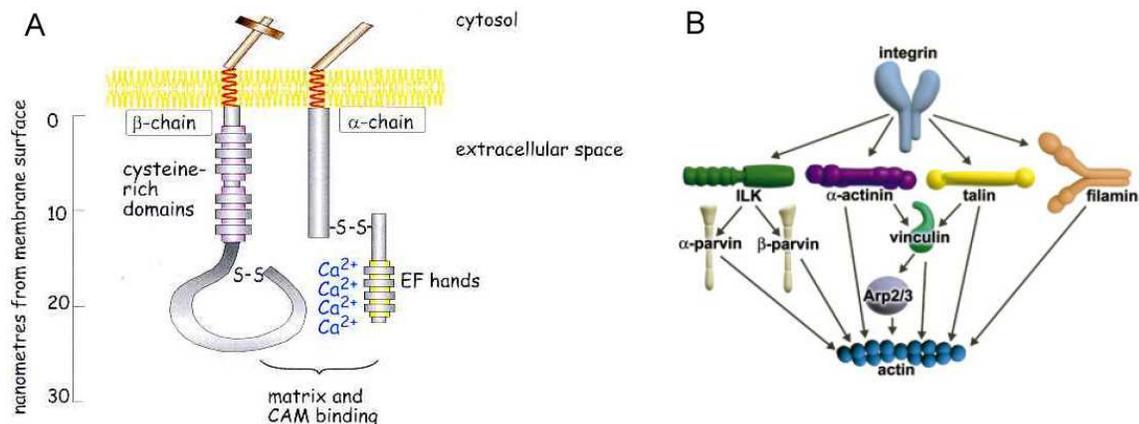


FIG. 1.10 – (A) Schéma d'un dimère d'intégrine : la chaîne α contient 4 sites extracellulaires de liaison à un cation divalent, la chaîne β contient le site cytoplasmique de liaison à l'actine [D'après <http://bioweb.wku.edu/courses/bio1566/L21AdhesionSigTransdctn.html>]. (B) Différentes protéines de lien entre les intégrines et le cytosquelette d'actine [D'après [17]]

Le domaine cytoplasmique de liaison à l'actine est la clef de l'activité des intégrines. Comme illustré sur la figure 1.10.B., cette liaison se fait *via* un grand nombre de petites protéines d'adaptation (tensine, vinculine, paxilline, α -actinine, taline...). Elle est de plus régulée par un très grand nombre de protéines de signalisation. Nous reviendrons plus en détail sur ces protéines

d'échaffaudage et de signalisation au 1.2.4, mais nous pouvons déjà examiner comment une cellule adhérente à un substrat *via* ses intégrines est sensible à la rigidité de ce dernier.

1.2.2 Pourquoi et comment étudier l'effet de l'environnement mécanique sur les cellules ?

Au niveau d'un organisme entier, ou d'un tissu, les effets d'une modification de l'environnement mécanique sont aisément visibles : par exemple, en l'absence de gravité la production de cellules osseuses diminue ; une hypertension provoque un épaississement des parois artérielles ; ou encore, l'épithélium intestinal régule sa perméabilité aux constituants provenant des vaisseaux sanguins en contrôlant sa contractibilité [21]. Au niveau cellulaire, le mécanisme par lequel les cellules sentent et intègrent ces informations mécaniques de façon à modifier leurs propriétés n'est pas encore complètement élucidé.

1.2.2.1 Les forces au niveau cellulaire

Il faut noter qu'en vertu de la loi d'action et de réaction, et de l'approximation inertielle dans laquelle on peut se placer pour un système aussi petit qu'une cellule ², les forces exercées par la cellule sur son substrat sont égales à celles exercées par le substrat en retour.

Pour donner un ordre de grandeur, *in vivo*, les cellules sont soumises à des modifications de pression allant de 0,01 à 0,1 atmosphère (soit 1 à 10 kPa), ce qui équivaut à des forces de quelques fractions à quelques dizaines de nN par point de contact. Cela fixe la gamme de forces ou de modules d'Young pertinentes pour les études réalisées *in vitro*.

Si nous nous restreignons à l'étude de la transduction mécanique ayant lieu aux points de contact, cela ne signifie pas pour autant qu'il n'existe pas d'autres formes de mécanotransduction. Par exemple, les contraintes exercées par un flux hydrodynamique sur les cellules endothéliales ont pour effet de les faire croître en s'alignant et en développant des fibres de stress dans la direction du flux [119]. Le cisaillement dû à un flux hydrodynamique a aussi un effet sur l'ouverture des canaux ioniques [49].

1.2.2.2 Méthodes expérimentales

Pour déterminer l'influence des propriétés mécaniques de l'environnement sur le comportement des cellules, on cherche à perturber l'état mécanique des cellules. Diverses approches sont possibles, et combinables entre elles :

- faire varier la dureté du substrat à l'aide de gels dont on peut contrôler le degré de réticulation et par là leur rigidité ; ou appliquer directement aux cellules des forces, locales ou globales ;
- modifier la capacité des cellules à exercer des forces intracellulaires à l'aide de drogues, qui auront, par exemple, un effet sur la polymérisation d'actine, ou sur l'activité des moteurs myosiques ;
- modifier le degré d'étalement des cellules, en contrôlant finement la densité ou la position des sites d'ancrage à la matrice.

On pourra ensuite observer les modifications induites à plusieurs niveaux : au niveau du comportement global des cellules (prolifération, migration, apoptose) comme décrit ci-dessous ; au niveau local de l'assemblage ou du désassemblage des contacts [69, 138, 45] comme décrit au 1.2.3 ; ou même au niveau de l'expression de gènes codant pour certaines protéines intervenant dans la signalisation liée à ces phénomènes (technique de lyse cellulaire suivie de Western blots, que nous ne développerons pas).

²Il faudrait une accélération a de l'ordre de $1 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$ pour que $m_{\text{cell}}\cdot a$ soit de l'ordre du pN...

1.2.2.3 Influence de la rigidité du substrat sur la physiologie globale des cellules adhérentes

Des modifications physiologiques profondes ont été observées assez tôt sur des cellules dont l'environnement mécanique était modifié. Au début des années 1950, l'observation d'une multiplication rapide des cellules mises en contact avec du verre (dans un tube à essai) a permis de développer la première lignée de cellules en culture, les cellules Hela. La prolifération cellulaire en réponse à une rigidité accrue du substrat, a ensuite été largement étudiée [50, 21].

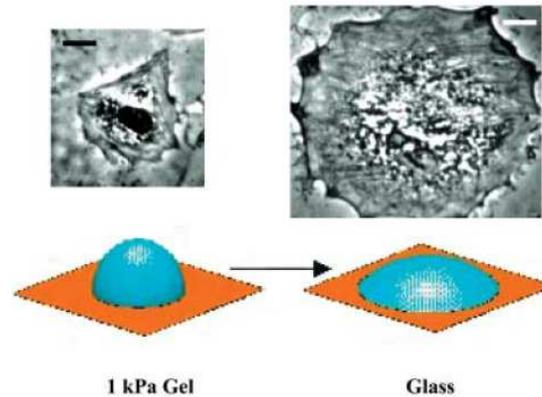


FIG. 1.11 – Etallement d'une cellule épithéliale en fonction de la rigidité du substrat : gauche, substrat mou (gel de 1 kPa) ; droite, substrat dur (verre) [D'après [34]].

Grâce à des gels de polyacrylamide dont on peut contrôler la rigidité ainsi que la densité de recouvrement par des ligands, les études sur l'influence des propriétés mécaniques (et biochimiques) de la matrice extracellulaire se sont multipliées depuis les années 1980. Il a ainsi été montré que le taux de croissance des cellules croît avec la rigidité du substrat et avec la densité de ligands [129, 20]. De même, il a été constaté que l'étalement des cellules augmente avec la rigidité du substrat [94, 34] (voir figure 1.11).

Le phénomène de "durotaxie" a aussi été mis en évidence : lorsqu'elles sont ensemencées sur un gel de rigidité non uniforme, les cellules ont tendance à migrer vers la zone la plus rigide [79]. La rigidité du substrat a même une influence sur la différenciation cellulaire : réussir à utiliser cet effet pour orienter la différenciation de cellules souches est d'ailleurs un des défis expliquant l'attrait des biomécaniciens pour ces cellules [35].

On évoquera plus loin d'autres effets, plus locaux : cultivées sur un substrat de rigidité anisotrope, elles s'orientent selon la direction de plus grande rigidité, et elles adaptent les forces qu'elles exercent en fonction de la rigidité ressentie (cf. figure 1.15).

1.2.3 Aspects mécaniques et géométriques

Pour déterminer précisément l'influence, sur le comportement des cellules, des propriétés mécaniques et géométriques de leur environnement, il faut disposer d'outils permettant de contrôler ces propriétés tout en faisant des observations fines, au niveau sub-cellulaire voire même avec une résolution inférieure à la taille d'un contact (typiquement $\sim 1 \mu\text{m}^2$).

On s'intéressera tout d'abord rapidement au contrôle de la géométrie de l'adhésion, par laquelle on peut contrôler certains phénomènes cellulaires.

On décrira ensuite comment quantifier les forces mises en jeu au niveau de la liaison entre une cellule et son substrat : une première approche, passive, consiste à obtenir les forces exercées

par la cellule sur son substrat par la mesure des déformations induites sur celui-ci. Une autre méthode, active, consiste à appliquer une force à la cellule, et à en observer les conséquences.

On peut aussi appliquer des forces de façon à mesurer la déformation cellulaire causée, et à déduire les paramètres mécaniques de la cellule sondée. Plusieurs techniques de ce type seront décrites au 1.3.1.

1.2.3.1 Confinement de cellules : effets géométriques et topologiques

Grâce à des techniques de microlithographie, on peut désormais créer, dans des wafers de silicium (ou d'autres matériaux), des structures dont la position et la forme sont résolues à mieux que 100 nm. Ces structures sont ensuite en général utilisées comme moules pour y couler des gels, qui adoptent alors la forme souhaitée.

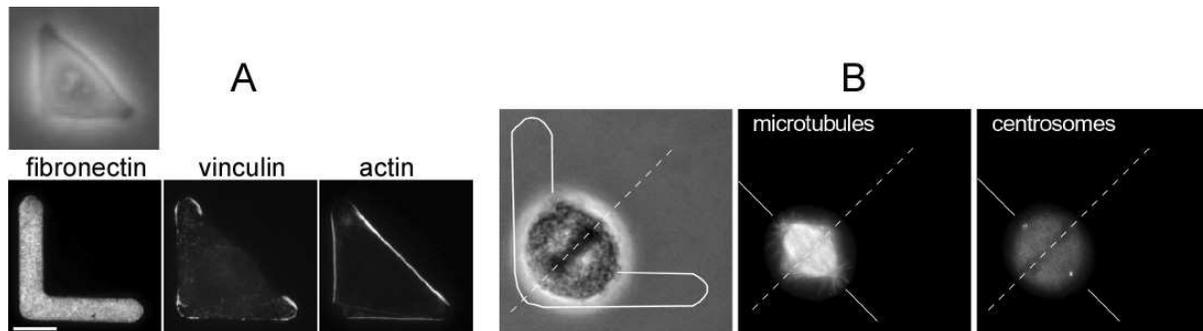


FIG. 1.12 – Confinement de cellules sur micropatrons adhésifs ; (A) une cellule adhérente sur un motif en L, pendant l'interphase : visualisation en transmission (haut), et en immunofluorescence du motif de fibronectine en L sous la cellule (bas gauche), de la répartition de vinculine (bas milieu) et d'actine (bas droite) dans la cellule ; (B) la même cellule pendant la mitose, en interphase : visualisation en transmission (gauche) et en immunofluorescence des microtubules (milieu) et des centrosomes (droite). [D'après [117]]

Pour étudier l'influence de la géométrie du substrat, on peut alors s'en servir comme tampon, pour aller déposer sur une lamelle de verre certaines protéines (par exemple de la fibronectine ou une autre protéine de la matrice) sur des zones dont on contrôle finement la position, et déposer entre ces zones des molécules empêchant l'adhérence des cellules. Des cellules ensemencées sur ce substrat vont alors rester confinées sur les zones adhésives, et adopter leur forme. Il a ainsi été observé que la géométrie dans laquelle les cellules adhèrent à leur substrat a un effet sur leur organisation interne [116, 117] : positionnement du centrosome, distribution des fibres de stress et de molécules intervenant dans la signalisation liée à l'adhérence, comme on peut le voir sur la figure 1.12.A. Ces effets géométriques gouvernent même, comme on le voit sur la figure 1.12.B, la direction dans laquelle se divise une cellule confinée [116].

Pour étudier l'influence de la topographie du substrat, on peut utiliser les mêmes techniques de lithographie et de moulage, afin de réaliser des surfaces microstructurées en 3 dimensions [21]. Il a alors été constaté que les cellules s'adaptent aux contraintes topographiques qu'elles ressentent : sur un substrat fait de lignes gravées, elles s'alignent dans la direction des sillons [31].

1.2.3.2 Mesures de forces d'adhérence cellule-substrat

Substrats continus Les premières observations des forces exercées par une cellule sur son substrat furent réalisées en déposant des cellules sur de fines feuilles de silicone [55]. Des rides

étaient observées aux endroits où les cellules exerçaient des forces suffisantes pour courber la feuille élastique ; mais cette méthode reste essentiellement qualitative.

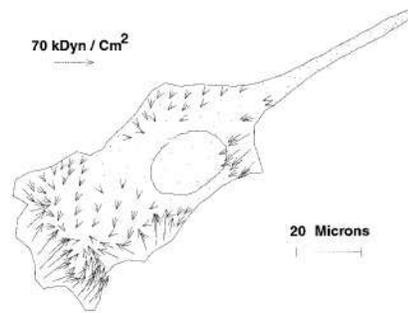


FIG. 1.13 – Cartographie du champ de contraintes sous un fibroblaste en migration, obtenue par "traction force microscopy" ($1 \text{ kDyn/cm}^2 = 100 \text{ Pa}$) [D'après [26]].

Pour mesurer le champ de force sous une cellule adhérente, Wang et coll. [26] ont développé une technique quantitative : la "traction force microscopy" (microscopie des forces de traction). Des billes fluorescentes submicroniques sont dispersées dans un substrat déformable transparent (gel de polyacrylamide, de module d'Young valant quelques dizaines de kPa). Quand une cellule est déposée sur ce substrat, elle génère un champ de forces qui déforme le matériau. En mesurant le déplacement des billes par rapport à leur position au repos, on a accès au champ de déformation du matériau. Il faut ensuite remonter au champ de contraintes, par des estimations numériques relativement fastidieuses. De plus, les billes sont détectées depuis la surface jusqu'à une profondeur égale à la profondeur de champ de l'objectif utilisé, et ne donnent donc pas rigoureusement le champ de déformation à 2 D à l'interface cellule-substrat. On obtient cependant une bonne estimation de l'allure et de la valeur du champ de forces sous la cellule, comme on le voit sur la figure 1.13.

En combinant cette technique avec celle des patrons adhésifs, il a d'ailleurs été observé que les forces d'adhérence ne sont pas du tout uniformément réparties sous la cellule : elle tire beaucoup plus fort sur le substrat au niveau de ses bords, et encore plus fort dans les coins [131], comme illustré sur la figure 1.14. Il semble donc y avoir un lien fort entre effets géométriques et effets mécaniques sur le comportement d'une cellule, et les approches couplant ces deux types d'influence sont particulièrement intéressantes.

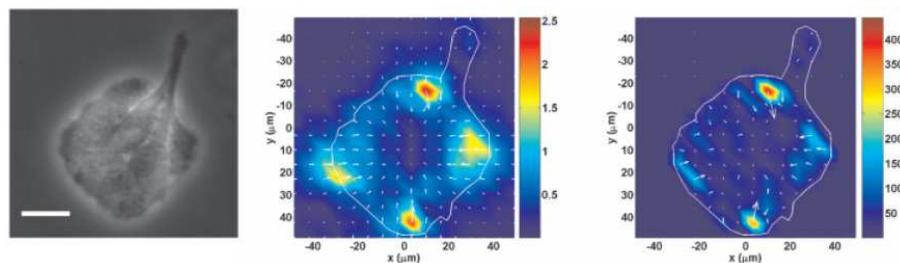


FIG. 1.14 – Cellule épithéliale adhérente sur un patron de fibronectine sur gel de polyacrylamide (carré plein, de taille $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$) : vue en transmission (gauche), et cartographie des champs de déplacement (en μm , milieu) et de contrainte (en Pa, droite) sous la cellule [D'après [131]].

Substrats discrets Afin de rendre plus simple l'obtention du champ de contraintes sous une cellule adhérente, une nouvelle technique a été développée par Tan et coll. [114] et mise en place au laboratoire [32]. Elle consiste en un réseau de micropiliers en gel de PDMS, de module d'Young E connu (réseau obtenu, là aussi, par moulage après gravure en microlithographie). Chaque pilier est un petit levier dont la rigidité est connue, et la relation entre la force de rappel F et le déplacement du sommet des piliers Δx est linéaire : $F = \frac{3}{4} \pi E \frac{r^4}{L^3} \Delta x = k \Delta x$, où r est le rayon d'un pilier et L sa longueur. Le facteur de proportionnalité k est la constante de raideur du pilier, et est choisie de l'ordre de quelques dizaines de $\text{nN}/\mu\text{m}$. Ainsi, l'observation des déflexions de l'ensemble des piliers donne directement accès au champ de forces. Les cellules cultivées sur ce type de substrat continuent à se comporter de façon physiologique, à se diviser, à migrer (cf figure 1.15.A)... On peut donc mesurer les forces exercées en différents points sous la cellule pendant ces phénomènes.

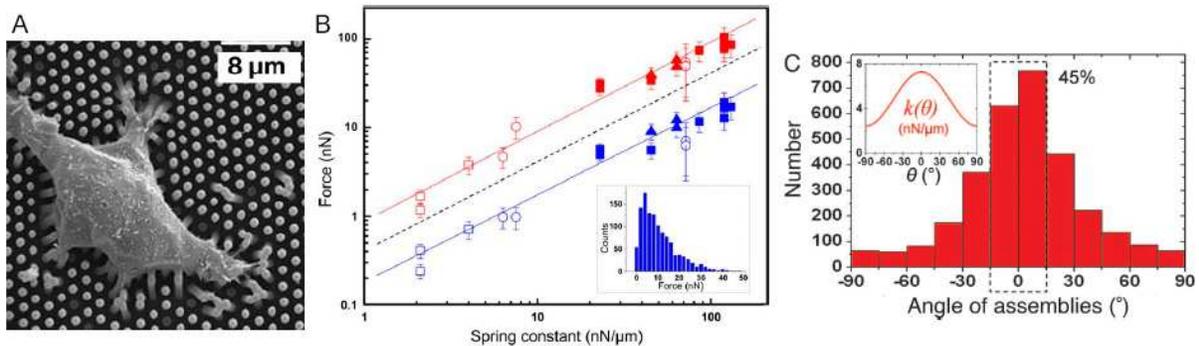


FIG. 1.15 – Utilisation de micropiliers pour mesurer les forces cellule-substrat : (A) image en microscopie électronique à balayage d'une cellule épithéliale adhérente sur les piliers circulaires [D'après [32]]; (B) courbes montrant la linéarité entre la force exercée par les cellules et la rigidité des piliers : en bleu, la force moyenne et en rouge, la force maximale [D'après [103]]; (C) histogramme de répartition de l'orientation des cellules sur piliers ovales, montrant la corrélation entre cette orientation et l'anisotropie de rigidité des piliers [D'après [104]].

La modification des paramètres géométriques des piliers permet de faire varier de façon relativement simple leur constante de raideur. Cela a permis de montrer que la force exercée par une cellule épithéliale sur son substrat croît linéairement avec la rigidité de ce dernier [103] (cf figure 1.15.B).

De plus, l'utilisation de piliers anisotropes (de section ovale : la rigidité dans la direction du grand axe est rendue trois fois plus grande que la rigidité dans la direction du petit axe) a permis de constater une certaine polarisation d'orientation induite sur les cellules par la rigidité du substrat : les cellules s'alignent et migrent selon l'axe de plus grande rigidité [104] (cf figure 1.15.C).

1.2.3.3 Application localisée de forces

Un grand nombre d'outils de micromanipulation existent désormais pour manipuler les cellules dans la gamme de forces pertinentes de quelques dizaines de pN à quelques nN. Nous décrivons ici deux techniques permettant d'appliquer une force sur une portion de la membrane cellulaire, et d'observer les effets induits localement.

La première méthode expérimentalement mise en œuvre a été l'utilisation d'une micropipette, par laquelle on peut aspirer une partie de cellule. L'aspiration est maintenue en assurant une dépression entre le milieu où baigne la cellule et l'autre extrémité de la pipette. A la base, cette

technique était utilisée pour caractériser les propriétés mécaniques de cellules en suspension (globules rouges par exemple [96]) mais elle a désormais été aussi utilisée pour des mesures mécaniques sur cellules adhérentes [86].

Une micropipette très fine peut aussi être utilisée comme petit levier : montée sur une platine contrôlant finement son déplacement, on peut la déplacer le long de la face apicale de la cellule. En tirant ainsi sur la membrane, on exerce un cisaillement sur la cellule. En visualisant certaines molécules d'intérêt en épifluorescence, on peut alors observer les effets de cette contrainte sur la cellule [102]. C'est cette expérience que montrent les images de la figure 1.19. Il est cependant difficile de remonter à une estimation précise de la force ainsi appliquée [21].

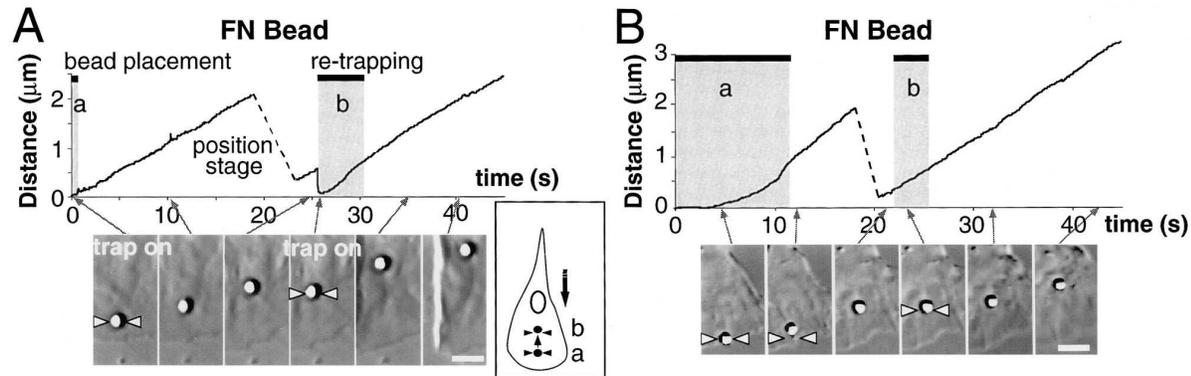


FIG. 1.16 – Mise en évidence du phénomène de renforcement de liens entre les intégrines et la matrice : (A) bas : vue de dessus de la cellule avec une bille liée aux intégrines ; haut : déplacement de la bille en fonction du temps, la partie grisée correspondant au temps où le laser est appliqué. Le temps initial de piégeage de la bille est court. (B) Même chose, avec un temps initial de piégeage plus long [D'après [22]].

Une autre technique classique consiste à utiliser des petites billes manipulées à l'aide d'un champ électromagnétique [127, 22, 45, 27], ce qui sera expliqué plus en détail au 1.3.3. L'estimation de la force est dans ce cas beaucoup plus précise, et on peut aussi visualiser ses effets sur la cellule manipulée. La figure 1.16 montre les premières observations du phénomène de renforcement de contacts cellule-matrice, réalisées par Choquet et coll. [22] à l'aide de billes micrométriques de latex piégées par pinces optiques. En posant au départ la bille (recouverte d'un fragment de fibronectine) sur la membrane, on lui permet de se lier aux intégrines ; puis en la piégeant pendant un certain temps, on l'empêche de se déplacer selon le flux d'actine existant naturellement dans le lamellipode des fibroblastes. On exerce donc une certaine force dessus. Puis le laser est coupé, et la bille est laissée libre de se déplacer, entraînée par le flux rétrograde d'actine. Après un certain temps, le laser est réappliqué près de la bille, et tente de la repiéger. On voit que quand la bille a été piégée peu de temps au départ, elle est rappelée facilement par le laser (fig 1.16.A.), alors que quand elle a été longtemps maintenue dans le piège au départ, la seconde application du laser n'a pas d'effet : elle est trop fortement liée au cytosquelette d'actine sous-jacent pour que la force exercée par le laser puisse agir. Cette expérience prouvait donc que l'application d'une force extérieure au niveau d'un contact modifie les propriétés d'ancrage de la cellule à la matrice extracellulaire. C'est le phénomène de renforcement des adhésions focales sous contrainte.

Nous présenterons les effets biologiques engendrés dans la cellule par ce type d'expériences au 1.2.4.

1.2.4 Mécanotransduction aux points de contact

1.2.4.1 Structure des contacts

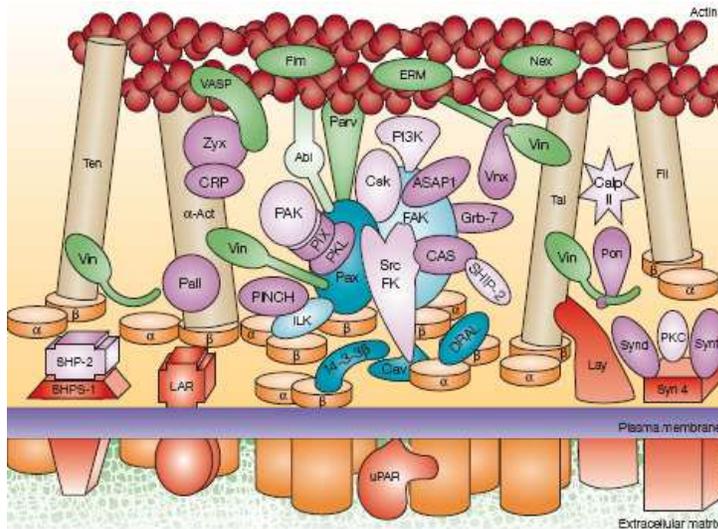


FIG. 1.17 – Schéma de la complexité des détails moléculaires au niveau des adhésions focales [D'après [50]].

Lorsque les intégrines sont activées par liaison à leur ligand et se rassemblent en "clusters", des protéines de structure et de signalisation sont recrutées pour former un dense complexe protéique, nommé adhésion focale [135]. Le schéma de la figure 1.17 donne une idée de la complexité des liaisons au sein d'une adhésion focale. Les protéines de structure, ou d'échaffaudage, comme la vinculine, la paxilline, la taline ou l' α -actinine renforcent l'adhésion en l'ancrant au cytosquelette d'actine [68, 138] (certaines de ces molécules se lient aux intégrines, certaines aux filaments d'actine ou à des protéines liant l'actine (Actin Binding Proteins) et d'autres enfin relient directement actine et intégrines). Parmi ces molécules de signalisation, on distingue entre autres [134] :

- des tyrosines kinases (Src, FAK...),
- des thréonine/sérine kinases (ILK, PAK...),
- des GTPases de la superfamille Ras (Rho, Rac et Cdc42) et leurs cibles (Rho-kinase (ou ROCK) et mDial pour Rho)

D'autres types d'adhésion existent pour lier la cellule à la matrice : adhésions 3D pour les cellules cultivées en milieu tridimensionnel [23], adhésions fibrillaires³ ou encore complexes focaux. Ces derniers sont structurellement relativement similaires aux adhésions focales, et les forces mécaniques jouent un rôle central dans leur différenciation.

Etant liées d'un côté à la matrice extracellulaire, et de l'autre, de façon indirecte, aux filaments d'actine, les intégrines permettent une transmission de forces dans les deux sens. A l'intérieur de la cellule, outre une certaine résistance "passive" à la déformation assurée par l'ensemble du cytosquelette, les filaments d'actine sont mis sous tension par l'action des myosines : chaque tête de myosine peut exercer une force de l'ordre de 1,5 à 2 pN. De l'extérieur, la cellule est soumise à la rigidité du substrat et éventuellement aux forces exercées par d'autres cellules. Les intégrines

³Lorsque les protéines de la matrice extracellulaire peuvent être déformées par les forces exercées par la cellule au niveau des adhésions focales, celles-ci évoluent en adhésions fibrillaires, riches en tensines [138], mais que nous ne développerons pas ici.

jouent donc le rôle de capteur et transmetteur de force.

1.2.4.2 Adhérence, mécanotransduction et signalisation

Dans les premières minutes suivant le contact entre la cellule et la matrice, se forme de façon transitoire un ensemble protéique, le complexe focal, en réponse à l'activation de Rac [101]. C'est une petite entité de moins d'1 μm^2 , dynamique et capable de résister à de grandes forces (1 à 3 $\text{nN}/\mu\text{m}^2$, [17, 139]), qui se forme notamment à l'avant des lamellipodes des cellules migrantes. En réponse à l'activation de Rho [98, 100], ces complexes focaux (FC) peuvent évoluer en adhésions focales (FA) ou contacts focaux, plus gros et de forme allongée (jusqu'à près de 5 μm de long par 1   2 μm de large), et contenant un plus grand nombre de protéines de liaison à l'actine [68, 138].

Mais la maturation des complexes focaux en adhésions focales ne nécessite pas seulement une activation biochimique. Car cette activation est couplée à l'augmentation de la contractilité cellulaire, se matérialisant au niveau du contact par l'existence d'une force de tension interne à la cellule. En effet, il a été prouvé qu'une altération de l'activité de Rho fait disparaître les fibres de tension de la cellule et diminue ainsi la contractilité cellulaire [100]. De même, une inhibition de l'activité actomyosique de la cellule contribue à la fois à relâcher la tension exercée par la cellule sur son substrat et à faire disparaître les adhésions focales [7].

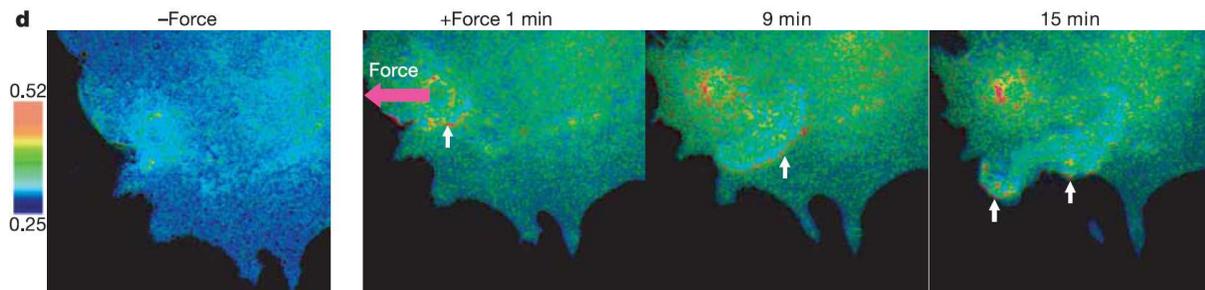


FIG. 1.18 – Activation de la protéine kinase Src en réponse à l'application d'une force, observée par FRET : avant l'application de la force (gauche) on voit un faible anneau autour de la bille, en réponse à l'adhésion de celle-ci ; après 1, 9 et 15 minutes d'application de la force (de gauche à droite), on voit une forte activation au niveau de l'anneau entourant la bille, et une vague de propagation dans la cellule, opposée à la direction de la force [D'après [132]].

Un autre exemple de ce couplage entre signalisation et tension porte sur l'activation de la kinase Src : c'est une des protéines de signalisation activée au niveau des adhésions focales [41]. En utilisant la technique de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer, permettant de voir des changements de conformation de protéines grâce à des marqueurs fluorescents), une étude récente a observé, dans toute une cellule, le degré d'activation de cette molécule en réponse à une force locale [132]. Il est surprenant de constater que Src est alors activée non seulement autour de la bille par laquelle est appliquée la force, mais aussi loin de la bille : une activation à distance presque instantanée apparaît, puis une vague d'activation part du point d'application de la force et se propage dans la direction opposée à celle-ci (cf figure 1.18). Cette activation à distance ne se produit plus si on dépolymérise le cytosquelette d'actine, ce qui signifie que la tension cellulaire est nécessaire à la propagation de ce signal biochimique.

On voit donc que le phénomène de réponse à une force ou à une rigidité sentie au niveau d'une adhésion ainsi que le maintien de la contractilité interne à la cellule sont étroitement couplés. Si les contacts initiaux (FC) peuvent se former en l'absence de force [45], leur maturation en FA et la persistance de ces contacts mûrs nécessitent une tension interne à la cellule [94].

1.2.4.3 Rôle des forces dans la régulation des adhésions focales

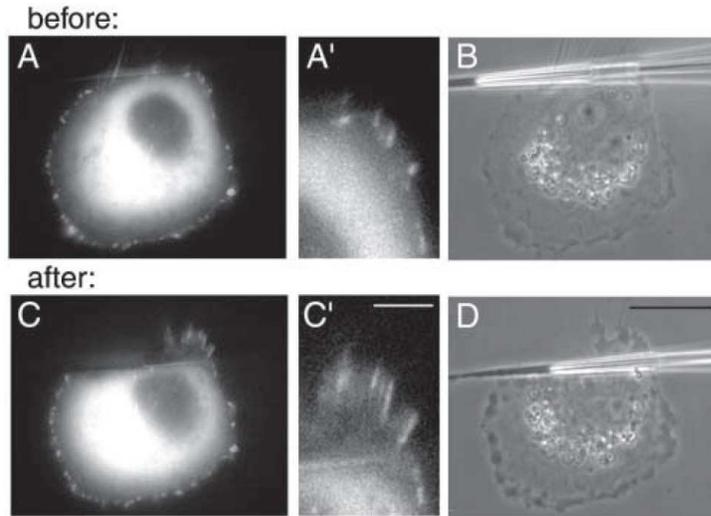


FIG. 1.19 – Croissance d’adhésions focales sous l’effet d’une force externe appliquée à l’aide d’une micropipette : images de la cellule avant (haut) et après (bas) l’application de la force. (A) et (C) : visualisation de la répartition de GFP-vinculine ((A’) et (B’) : grossissements de la zone sous contrainte); (B) et (D) : images de la cellule en transmission [D’après [102]].

La figure 1.19 est tirée d’une étude utilisant une micropipette pour appliquer un cisaillement, comme décrit plus haut (cf. 1.2.3.3). Les images A’ et C’ montrent bien la croissance des adhésions focales situées au niveau de la zone où la force est appliquée (FA visualisées par la présence de vinculine). Dans cette étude, Riveline et coll. [102] ont ensuite prouvé que l’application d’une force externe pouvait dans certaines conditions contourner l’absence de contractilité interne et permettre tout de même l’apparition d’adhésions focales.

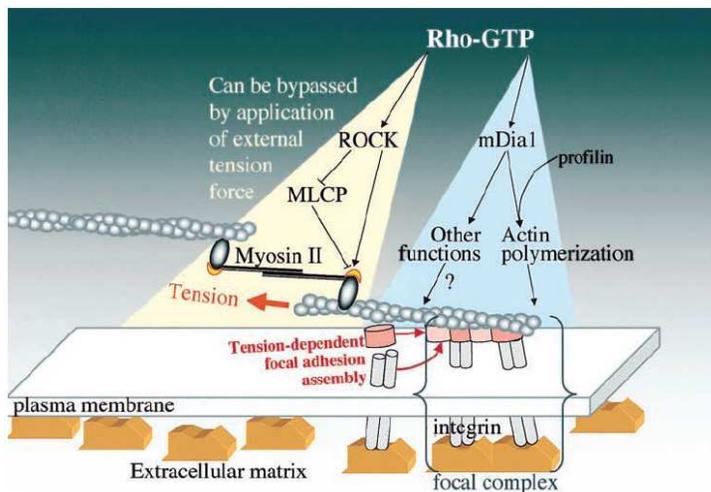


FIG. 1.20 – Schéma des voies de signalisation intervenant dans la croissance des adhésions focales [D’après [102]].

En effet, Rho a deux cibles majeures : la Rho-kinase (ROCK) qui augmente la contractilité

cellulaire en stimulant l'activité des myosines, et mDia1 qui régule entre autres la polymérisation d'actine. Tant que cette dernière est active, des FA peuvent croître en réponse à l'application d'une force externe, même en l'absence de tension interne (absence obtenue par inactivation de ROCK). Ceci est résumé sur le schéma de la figure 1.20.

La croissance des FA en réponse à une tension externe répond en outre à des lois intéressantes : les contacts croissent dans la direction de la force appliquée [7, 102], et il semble que l'aire de chaque contact augmente linéairement avec la force appliquée, comme on le voit sur les graphes de la figure 1.21.

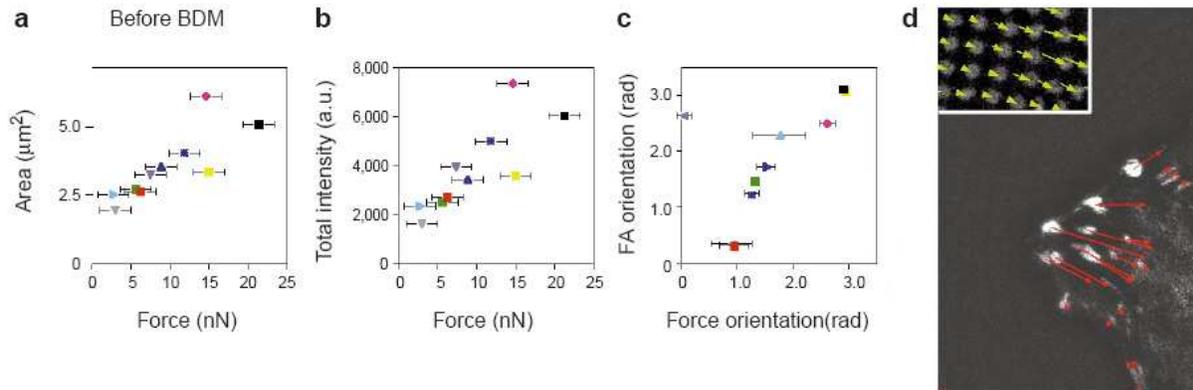


FIG. 1.21 – Propriétés des adhésions focales en réponse à une force : les cellules sont déposées sur un gel dont la déformation est mesurée par "traction force microscopy". Les adhésions focales sont repérées et quantifiées par observation de vinculine-GFP. (a) Aire et (b) intensité totale de fluorescence des FA individuelles en fonction de la force qu'elles exercent sur le substrat ; (c) orientation des FA en fonction de la direction de la force sur le substrat ; (d) visualisation des FA en épifluorescence, avec les forces exercées par chacune en rouge, calculée à partir du déplacement des marqueurs (flèches jaunes, dans l'insert) [D'après [7]].

Ces FA sont par ailleurs le point de départ de denses faisceaux de filaments d'actine, les fibres de tension, qui permettent d'exercer des forces très importantes au niveau de ces contacts. Les intégrines des contacts focaux permettent de transmettre des forces mécaniques de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (et vice-versa), et traduisent aussi ces signaux mécanique en signaux biochimiques (et vice-versa).

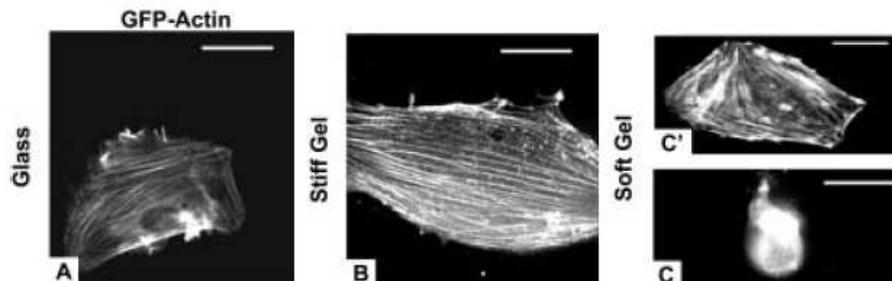


FIG. 1.22 – Images de filaments de GFP-actine dans des cellules cultivées sur (A) substrat rigide, en verre ; (B) gel dur, de module d'Young 8 kPa ; (C) gels mous, de module d'Young 1 kPa [D'après [34]].

Ainsi, l'apparition et la croissance d'adhésions focales est couplée à la croissance de fibres

de stress dans la cellule [34, 100, 27, 28]. Ces fibres de stress sont notamment beaucoup plus développées sur un substrat rigide que sur un substrat mou (cf figure 1.22), car on a vu que la cellule a besoin de développer des forces d'autant plus grandes que le substrat qu'elle ressent est dur.

En résumé, une certaine tension interne et/ou une force externe à la cellule est nécessaire pour que des adhésions naissantes mûrissent en FA et la présence de tension externe (force ou rigidité) fait croître la taille des FA et les stabilise par ancrage de plus en plus fort au cytosquelette sous-jacent.

1.2.4.4 Intégration des forces au niveau de l'ensemble de la cellule

La transmission des forces au niveau des contacts contrôle la maturation ou le désassemblage des adhésions et initie une cascade de signalisations intracellulaires qui peut modifier l'allure de la cellule et son comportement. Ce qui fait qu'en présence d'une force appliquée de l'extérieur, la cellule adapte activement ses structures d'adhésion, réarrange l'organisation de son cytosquelette et modifie l'activité contractile de ce dernier.

On comprend alors que la cellule soit capable d'adapter les forces qu'elle exerce à ce qu'elle ressent [103] : elle est constamment en train de palper son milieu, et se contracte ou se détend en fonction de la rigidité qu'elle rencontre. On comprend aussi les liens entre rigidité ressentie et prolifération des cellules : l'activation de Rho augmente la contractilité actomyosique, et favorise donc la division cellulaire (au moment de la cytokinèse, la cellule a besoin de cette activité myosique au niveau de l'anneau d'actine contractile, pour scinder la cellule mère en deux cellules filles) [21].

Cependant, de nombreuses questions restent ouvertes, concernant le rôle des FA dans la mécanotransduction :

- comment s'organisent, en trois dimensions, les ABP et les protéines d'échaffaudage les unes par rapport aux autres, au sein des FA ? Des expériences de FRET (Transfert d'Énergie de Fluorescence par Résonance) pourraient permettre de déterminer les configurations relatives de certaines de ces protéines.
- quelles sont les propriétés mécaniques de chacune de ces molécules de lien ? Sont-elles très rigides, et transmettent-elles la force directement aux filaments d'actine ? Ou au contraire sont-elles étirées lorsqu'une force leur est appliquée, auquel cas elles pourraient changer de conformation et ces changements pourraient être à la base des cascades de signalisation en aval ? Quelles sont leurs énergies de liaison entre elles ? En bref, quelle est la compliance de ce lien complexe entre actine et intégrines ?

Nous ne chercherons pas ici à répondre à ces questions, mais il peut être intéressant de noter que la connaissance actuelle du rôle de ces adhésions dans la réponse mécanique cellulaire est, pour l'instant, encore très partielle, et est l'objet de nombreuses études en cours.

1.3 Viscoélasticité cellulaire

On a vu que l'environnement mécanique d'une cellule modifie son comportement physiologique, mais aussi mécanique. On s'intéresse maintenant aux techniques permettant de quantifier les propriétés mécaniques des cellules afin d'en tirer, éventuellement, des caractérisations, des éléments de comparaison, des lois...

Ce type de mesures est relativement complexe à réaliser. Tout d'abord, une cellule n'est pas un matériau inerte. C'est un système hautement hors d'équilibre (il y a consommation d'énergie et transformation entre les différents types d'énergie), et donc pour lequel les considérations standard utilisées par exemple en thermodynamique, ne sont pas valables (par exemple, le théorème de fluctuation-dissipation n'est pas vérifié). Ensuite, c'est un matériau inhomogène, et dont les inhomogénéités sont présentes à des échelles très différentes : le noyau, de plusieurs μm , a des propriétés mécaniques très différentes du reste du corps cellulaire ; des organelles et des vésicules, de quelques fractions de μm "flottent" dans le cytoplasme ; les filaments du cytosquelette forment un réseau de polymères semi-flexibles, de quelques nm de large sur plusieurs μm de long, entourés du liquide cytosolique... Sonder une cellule donnée en différents endroits n'a donc aucune raison de donner des résultats identiques. De même, les variabilités (de forme, de moment dans le cycle cellulaire...) sont grandes de cellule à cellule, dans un échantillon du même type cellulaire. Enfin, c'est une entité vivante, capable de se mouvoir, même en plein milieu d'une expérience!...

Nous laisserons ici ces considérations de côté, et décrirons la cellule comme un matériau dont on considèrera qu'il est approximativement homogène et inerte pendant la durée des mesures mécaniques effectuées⁴, afin d'en définir les paramètres viscoélastiques comme on le ferait pour un gel synthétique.

1.3.1 Quelques notions de viscoélasticité

Pour un solide purement élastique, on définit le module d'Young E (Pa), comme le rapport entre la contrainte appliquée et la déformation résultante en géométrie de traction simple : $E = \sigma/\epsilon$, avec σ en Pa, et ϵ sans dimension ($\epsilon = \delta l/l_0$, où l_0 est la longueur initiale du matériau et $\delta l = l - l_0$ sa variation de longueur).

Pour un liquide purement visqueux, on définit la viscosité η , comme le rapport entre la contrainte et le taux de déformation associé : $\eta = \sigma/\dot{\epsilon}$.

En géométrie de cisaillement pure, on définit un coefficient de cisaillement μ par la relation entre le tenseur des contraintes et le tenseur des déformations : $\bar{\sigma} = 2\mu\bar{\epsilon}$. Pour un matériau incompressible⁵, on a simplement $E = 3\mu$.

Pour un matériau viscoélastique, les propriétés d'élasticité et viscosité sont contenues dans le module viscoélastique G , défini en régime sinusoïdal [54]. La déformation complexe $\epsilon(\omega) = \epsilon_0 e^{i\omega t}$ et la contrainte complexe $\sigma(\omega) = \sigma_0 e^{i(\omega t + \phi)}$ sont alors reliées par :

$$G(\omega) = \frac{\sigma(\omega)}{\epsilon(\omega)} = G'(\omega) + iG''(\omega) \quad (1.4)$$

où G' est la partie réelle, ou module de stockage (ou encore module élastique), et G'' la partie imaginaire, ou module de perte. Pour un solide élastique, on retrouve $G' = E$ et $G'' = 0$; et pour un liquide visqueux $G' = 0$ et $G'' = \eta\omega$.

⁴L'approximation "cellule inerte" est justifiée, pour des cellules relativement peu motiles comme celles que l'on utilise, tant que les mesures durent moins de quelques minutes. L'approximation d'homogénéité est, elle, certainement plus éloignée de la réalité : il est probable que des mesures de viscoélasticité réalisées en deux endroits différents de la cellule donneraient des résultats différents [57].

⁵On considère en général la cellule comme un matériau incompressible aux temps courts.

Pour définir la relation entre contrainte appliquée et déformation d'un matériau, on peut aussi se placer dans le domaine temporel. Si on applique une contrainte $\sigma(t)$ à partir de l'instant $t = 0$, la relation donnant la déformation résultante au cours du temps $\epsilon(t)$ fait intervenir la fonction de fluage $J(t)$, et s'écrit :

$$\epsilon(t) = \int_0^t J(t-t') \frac{d\sigma}{dt'} dt' \quad (1.5)$$

ou encore, si on utilise la fonction mémoire $\mu(t)$:

$$\epsilon(t) = \int_0^t \mu(t-t') \sigma(t') dt' \quad \text{avec} \quad \mu(t) = \frac{dJ}{dt} \quad . \quad (1.6)$$

Ces relations sont à prendre au sens des distributions. Un cas particulier est l'expérience de fluage proprement dite : on exerce sur le matériau une contrainte constante à partir de $t = 0$, soit $\sigma(t) = \sigma_0 \Theta(t)$ où $\Theta(t)$ est la fonction de Heaviside, et $\frac{d\sigma}{dt} = \sigma_0 \delta(t)$. On obtient alors directement la fonction de fluage en mesurant la déformation :

$$J(t) = \frac{\epsilon(t)}{\sigma_0} \quad . \quad (1.7)$$

Par exemple, comme représenté sur la figure 1.23, la fonction de fluage d'un matériau élastique de module d'Young E vaut simplement $1/E$; celle d'un fluide visqueux de viscosité η vaut t/η .

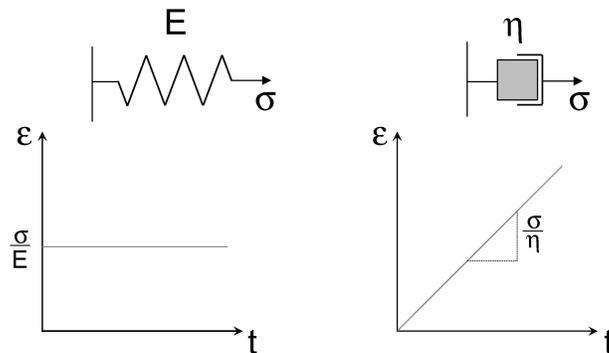


FIG. 1.23 – Allure de la déformation d'un solide élastique (gauche) et d'un fluide visqueux (droite) en réponse à une contrainte σ constante.

Il existe bien sûr un lien entre les définitions temporelle et fréquentielle, que l'on peut établir en utilisant la transformée de Fourier de la fonction de fluage [10] :

$$\tilde{J}(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} J(t) e^{i\omega t} dt \quad \text{et} \quad G(\omega) = \frac{1}{i\omega \tilde{J}(\omega)} \quad . \quad (1.8)$$

1.3.2 Un modèle viscoélastique simple pour la cellule ?

Jusqu'à récemment, la cellule a été décrite comme un matériau viscoélastique simple : certains de ses constituants, comme les filaments intermédiaires ou le cortex d'actine, contribuent à son caractère élastique, tandis que d'autres, comme le cytosol ou le fait que les filaments d'actine puissent coulisser les uns par rapport aux autres, lui confèrent une certaine viscosité. Pour tenter de caractériser ce matériau, on peut le schématiser par un ensemble de compartiments élastiques (ressorts) ou visqueux (amortisseurs), en série ou en parallèle. Un modèle typique est présenté

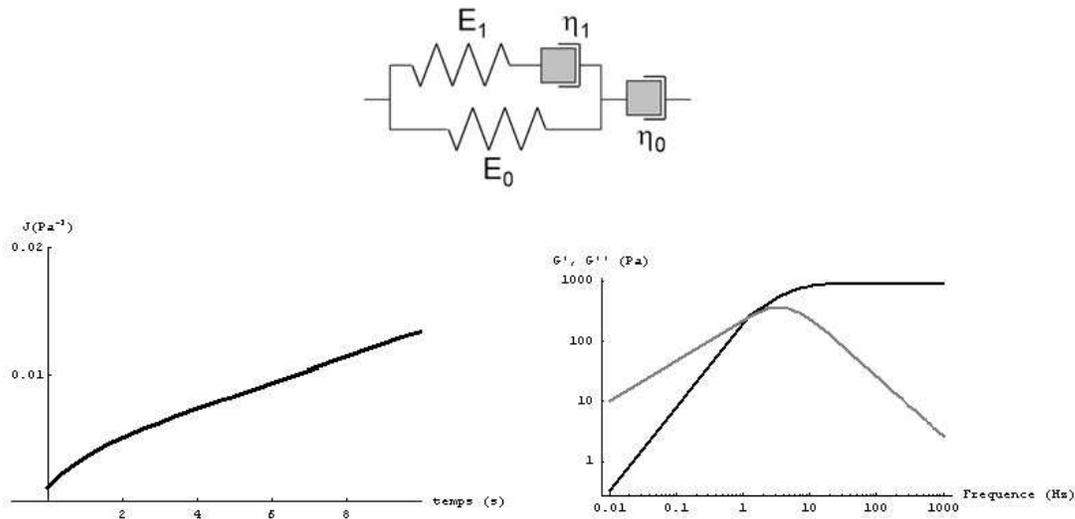


FIG. 1.24 – Haut : schéma d'un modèle viscoélastique à quatre compartiments : 2 solides élastiques de modules d'Young E_0 et E_1 (ressorts) et deux fluides visqueux de constantes de viscosité η_0 et η_1 (amortisseurs). Bas gauche : Graphe de la fonction de fluage correspondante, $J(t)$ (en Pa^{-1}) en fonction du temps (en s). Bas droite : Graphe des modules G' (en noir) et G'' (en gris) correspondants (en Pa) en fonction de la fréquence (en Hz).

sur la figure 1.24 : il contient un amortisseur de viscosité η_0 en série avec un ensemble de Kelvin-Voigt, qui comprend un ressort de module d'Young E_0 , en parallèle de l'ensemble série {ressort (E_1)–amortisseur(η_1)}. La fonction de fluage de l'ensemble vaut :

$$J(t) = \frac{1}{E_0} \left[1 - \frac{E_1}{E_0 + E_1} e^{-t/\tau} \right] + \frac{t}{\eta_0} \quad (1.9)$$

et est représentée sur la figure 1.24. Cette réponse est gouvernée, aux temps courts par l'association en parallèle de solides élastiques $\{E_0//E_1\}$, qui donne un déplacement instantané à $t = 0$, et aux temps longs par le fluide η_0 , qui s'écoule à vitesse constante. Le temps de relaxation permettant de passer d'un comportement à l'autre vaut $\tau = \frac{\eta_1(E_0+E_1)}{E_0E_1}$.

On peut alors éventuellement attribuer à divers compartiments cellulaires les propriétés de chaque élément [11] : η_0 représenterait la viscosité du cytoplasme, $E_0 + E_1$ serait relié au module élastique du cytosquelette.

Cependant, de plus en plus d'expériences, développées ci-après, tendent à montrer qu'il est impossible de réduire la cellule à un petit nombre de compartiments mécaniques. En effet, la cellule semble se déformer, sous l'effet d'une contrainte, qu'elle soit locale ou globale, de façon non triviale : les modules élastique et visqueux varient avec la fréquence selon une même loi de puissance. Ce comportement rhéologique complexe rejoint celui observé sur les gels, les mousses, les émulsions et les pâtes (milieux dits "vitreux mous"), qui ont en commun de posséder une grande complexité de structure. Cela s'accompagne de processus de dissipation ayant lieu à des échelles temporelles très diverses, et qui font intervenir une distribution très large et dense de temps de relaxation.

Une des raisons pour lesquelles la cellule n'est pas un pur matériau viscoélastique est l'existence de tensions internes, développées par les filaments d'actine qui ne sont pas assemblés sous forme de gel mais sous forme de fibres de tension. De plus, c'est une structure hautement hors d'équilibre : en permanence, les mécanismes de polymérisation/dépolymérisation, ou le mouve-

ment de moteurs moléculaires le long des filaments consomment l'énergie produite par hydrolyse des molécules d'ATP.

Nous décrirons au chapitre 3 les relations liant $G(\omega)$ et $J(t)$ pour ces matériaux ayant une rhéologie en loi de puissance, mais nous pouvons déjà préciser qu'un module viscoélastique variant en loi de puissance de la fréquence a comme équivalent une fonction de fluage variant en loi de puissance du temps, avec le même exposant. Les différents types de modèles développés pour prendre en compte ces propriétés complexes sont présentés dans la thèse de Martial Balland [9] et nous n'y reviendrons pas ici. Un petit modèle structural permettant de reproduire les lois de puissance observées pour $G(\omega)$ et $J(t)$ est présent dans l'article mis en annexe D [10].

1.3.3 Mesures de la viscoélasticité cellulaire

On présente ici quelques méthodes de mesure, locale ou globale, des propriétés viscoélastiques des cellules. Certaines de ces méthodes (pincés optiques, magnétocytométrie, étirement uniaxial) utilisent des sondes spécifiquement ancrées aux filaments d'actine de la cellule par l'intermédiaire de molécules d'adhérence et sondent donc les propriétés mécaniques du cytosquelette d'actine. Les autres (AFM, microrhéologie 2 points) utilisent des sondes non spécifiques, et mesurent une contribution de l'ensemble des constituants viscoélastiques de la cellule.

1.3.3.1 Mesures actives locales en régime sinusoïdal

Ces méthodes, dites "actives" car une contrainte est appliquée à la cellule que l'on souhaite sonder, présentent l'avantage d'obtenir directement une mesure de coefficient de cisaillement. Cependant, pour passer de cette mesure au calcul du module viscoélastique, il faut faire des hypothèses géométriques sur le lien entre la sonde et la cellule (degré d'enfoncement de la sonde dans la cellule) et la hauteur du milieu cellulaire sous la sonde. Nous ne détaillerons que les calculs effectués pour nos expériences de pincés optiques, et elles seront présentées au chapitre 3. On peut cependant d'ores et déjà noter que c'est là le désavantage majeur de ces méthodes : ce facteur géométrique est difficile à évaluer, et cause donc une erreur d'estimation de la valeur de G . Mais cette erreur étant indépendante de la fréquence, les lois de variation des différentes grandeurs sont, elles, obtenues précisément.

La différence majeure entre ces méthodes réside dans le lien entre la sonde et la cellule : dans les expériences avec billes (pincés optiques [22], magnétocytométrie [27]), il faut assurer leur ancrage à la cellule. Elles doivent donc être recouvertes d'un peptide permettant leur adhérence à certains récepteurs, intégrines par exemple. L'ancrage provoque une réorganisation du cytosquelette au niveau des contacts, ce qui modifie certainement les propriétés viscoélastiques mesurées par rapport au cas où la cellule est sondée sans avoir besoin de passer par un lien moléculaire comme c'est le cas pour l'AFM [84, 4].

Microscopie à force atomique (AFM) Le principe des mesures de forces avec un AFM, schématisé sur la figure 1.25, repose sur la connaissance de la constante de rappel d'un microlevier, qui permet d'obtenir la force appliquée par la pointe de celui-ci sur un objet si on connaît sa déflexion (mesurée sur un photodétecteur). L'intérêt de son utilisation pour réaliser des mesures de viscoélasticité cellulaire réside dans l'absence d'ancrage entre la pointe et la cellule ⁶.

La gamme de forces applicables par cette technique va de la dizaine de pN à quelques centaines de nN, mais pour la mesure des propriétés viscoélastiques des cellules en régime fréquentiel, les forces appliquées restent faibles (typiquement quelques centaines de pN). On mesure la force appliquée à la cellule ainsi que la déformation de celle-ci, et leur rapport est proportionnel au

⁶Attention, les expériences en AFM sont souvent réalisées à température ambiante, soit 20 à 25°C, et non pas à 37°C comme la plupart des expériences sur cellules en OMTC ou en OT.

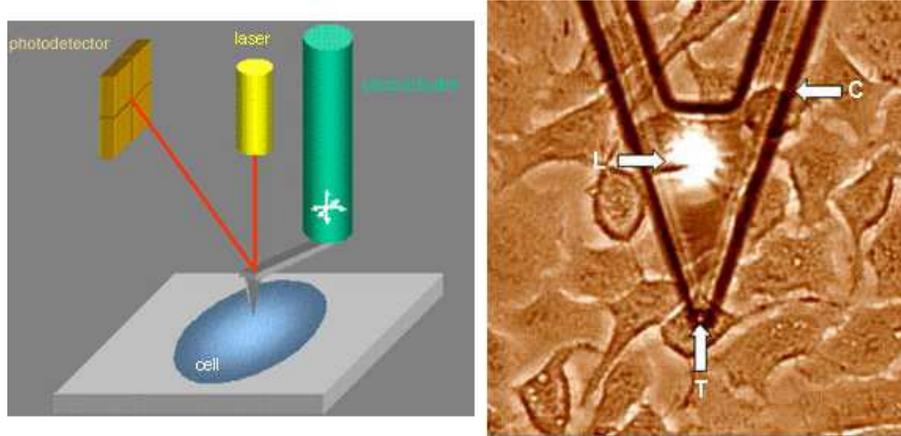


FIG. 1.25 – Schéma de principe d'un AFM (gauche) et vue de dessus d'un tapis de cellules épithéliales A549 et de la pointe du levier d'AFM [D'après <http://www.ub.edu/biofisica/cellular.htm>].

module viscoélastique [4]. La difficulté de ces mesures réside dans la prise en compte de certaines corrections, comme la force de traînée exercée sur le levier par le fluide environnant ou la forme exacte de la pointe [99].

Des mesures ont été réalisées sur plusieurs types cellulaires dont on a modifié les propriétés internes par différentes drogues, et les évolutions de G' et G'' obéissent à des lois de puissance de la fréquence qui semblent très robustes, avec une nette dépendance de l'exposant de la loi en fonction des propriétés contractiles du cytosquelette [121].

Magnétocytométrie optique (OMTC) Le principe des expériences de magnétocytométrie (MTC : Magnetic Twisting Cytometry) [127, 81, 38] est basé sur le couple exercé par un champ \vec{B} sur un dipôle magnétique \vec{M} :

$$\vec{T} = \vec{M} \times \vec{B} = B M \cos \alpha \quad (1.10)$$

où $\frac{\pi}{2} - \alpha$ est l'angle entre le moment et le champ, et M est le moment magnétique de la bille (qui dépend notamment de ses paramètres géométriques). Des billes ferri- ou ferro-magnétiques de diamètre typique 4 à 5 μm , adhérentes aux cellules, sont aimantées par un fort champ horizontal (dans le plan de la membrane), puis un champ oscillant à fréquence f est appliqué dans la direction perpendiculaire, causant une rotation de la bille le long de la membrane de la cellule, comme illustré sur la figure 1.26. La rotation résulte en un déplacement d de la bille, qui déforme la cellule : ce déplacement est mesuré en microscopie optique (Optical Magnetic Twisting Cytometry). On mesure alors le coefficient de cisaillement g à la fréquence f du champ :

$$\tilde{g}(f) = \frac{\tilde{T}(f)}{\tilde{d}(f)} = g'(f) + ig''(f) \quad (1.11)$$

et moyennant un facteur géométrique, il est possible de remonter au module viscoélastique $\tilde{G} \propto \tilde{g}$ de la cellule.

Les mesures effectuées à l'aide de cette technique semblent montrer que l'on reste dans un domaine de déformation linéaire⁷ pour la cellule même à grandes contraintes (de 1 à 300 Pa) et grandes déformations (déplacements de bille de 5 à 500 nm).

⁷Le terme "linéaire" désigne ici le fait que la contrainte est proportionnelle à la déformation, et que le coefficient de proportionnalité (le module viscoélastique) ne dépend pas de la contrainte appliquée.

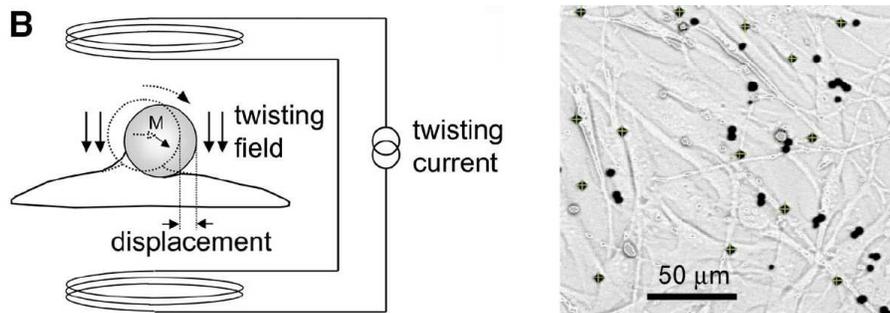


FIG. 1.26 – Principe des expériences de magnétocytométrie optique : schéma de l'application du couple magnétique qui déplace les billes et cause ainsi une déformation cellulaire (gauche) ; et vue d'un échantillon de cellules en culture ayant lié des billes ferrimagnétiques (droite).[D'après [38]]

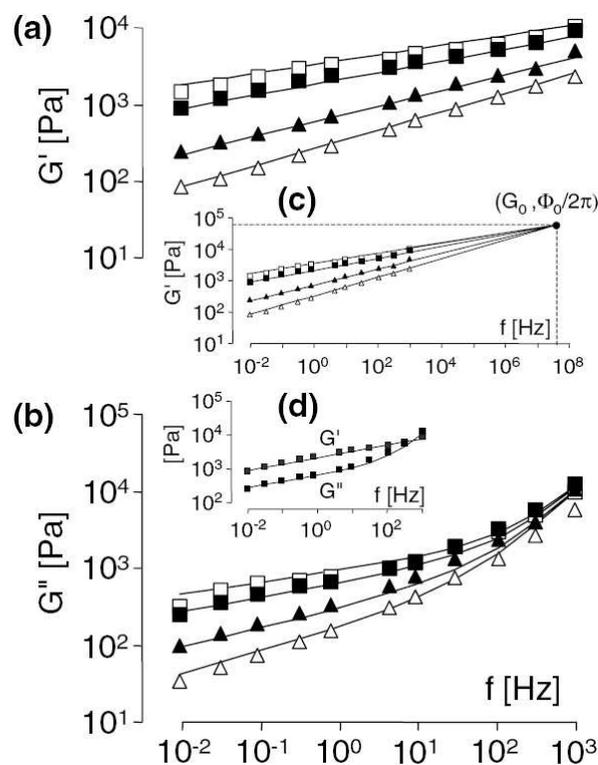


FIG. 1.27 – Exemples de courbes obtenues, sur des cellules de trachée humaine (HASM), pour les variations de G' (a) et G'' (b) avec la fréquence : dans les conditions contrôles (carrés noirs), et après action d'agents augmentant (histamine, carrés blancs), ou diminuant (DMcAMP, triangles noirs) la contractilité cellulaire ou dépolymérisant l'actine (cytochalasine D, triangles blancs) ; extrapolation des courbes et des ajustements jusqu'à la valeur du paramètre Φ_0 (c), et comparaison de G' et G'' dans les conditions standard (d). [D'après [37]]

Comme illustré sur la figure 1.27, cette méthode a à aussi été utilisée sur plusieurs types cellulaires, en présence de nombreux facteurs biochimiques modifiant la dynamique du cytosquelette (degré de polymérisation de l'actine, action des myosines, concentration en ATP...), ou

l'ancrage de la bille à la cellule (ligands différents). Dans tous les cas, on obtient pour G' et G'' des lois de puissance de la fréquence, et ce sur plusieurs décades (5 décades pour G' , et au moins 3 pour G''). Les auteurs de ces études ajustent alors ces courbes en utilisant une unique loi de puissance empirique :

$$\tilde{G} = G_0(1 + i\eta) \left(\frac{\omega}{\Phi_0} \right)^\alpha + i\omega\mu \quad \text{avec} \quad \eta = \tan\left(\frac{\alpha\pi}{2}\right) \quad (1.12)$$

dans laquelle Φ_0 , G_0 (la valeur du module d'élasticité à la pulsation Φ_0)⁸, α (le coefficient de la loi de puissance, relié, *via* η , à l'importance de la dissipation dans le matériau) et μ (la viscosité du cytosol, intervenant à haute fréquence) sont les seuls paramètres. G' et G'' varient donc ensemble avec la fréquence, sur la gamme 10 mHz–10 Hz. L'exposant α ainsi obtenu varie entre 0,1 et 0,4 selon les types cellulaires et les traitements imposés.

Les courbes de la figure 1.27.c montrent que les différents agents biochimiques modifiant la dynamique du cytosquelette n'auraient finalement qu'un effet sur cette valeur de α , c'est à dire qu'ils n'influeraient que sur les mécanismes de dissipation d'énergie dans la cellule [37].

Pinces optiques (OT) Le principe de l'application d'une force par pinces optiques étant largement décrit au chapitre suivant, nous ne décrivons ici que les résultats obtenus par cette méthode en régime sinusoïdal, ce qui correspond au travail de thèse de Martial Balland au laboratoire [9].

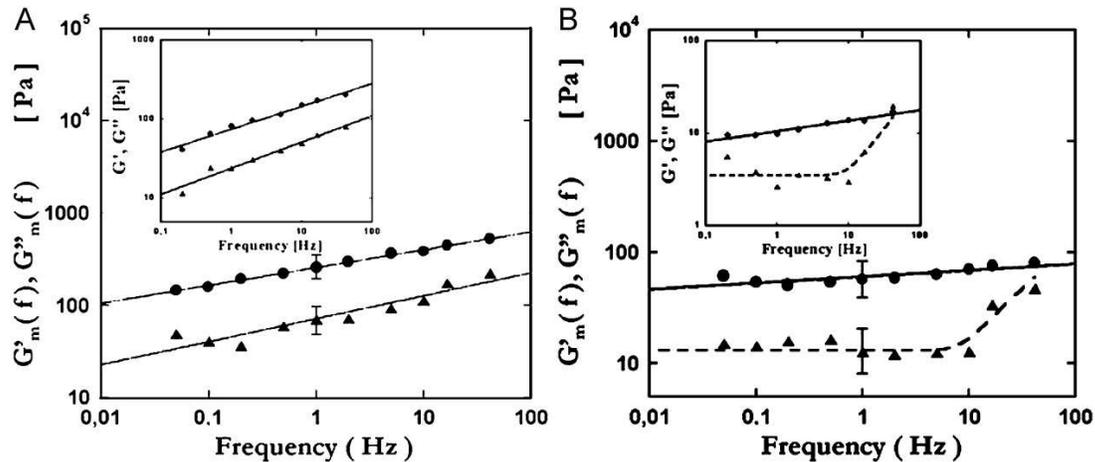


FIG. 1.28 – Modules élastique et de perte en fonction de la fréquence pour des myoblastes de souris de type C2 : (A) dans les conditions contrôle (courbe principale : moyenne sur une vingtaine de cellules, insert : mesure sur une seule cellule) ; (B) après addition de blebbistatine (idem) [D'après [8]].

Là encore, le principe des mesures est globalement le même : la position de la bille est mesurée en microscopie optique à l'aide d'une caméra, la force est étalonnée en fonction de la position de la bille par rapport à la pince optique, et la déformation induite sur la cellule sondée est tirée du déplacement de la bille par rapport à la cellule. Par application d'une force oscillante à différentes fréquences successives, on en déduit le module viscoélastique $\tilde{G}(f)$, dont les parties réelles et imaginaires varient ensemble en loi de puissance de la fréquence (figure 1.28.A). L'addition d'un

⁸Attention : le G_0 défini ici n'est pas le même que celui que nous utiliserons dans les parties 3 et 4. Fabry, Fredberg et coll. désignent par G_0 le module viscoélastique à la pulsation Φ_0 , où Φ_0 vaut de l'ordre de 10^8 rad.s^{-1} , alors que nous définissons G_0 comme le module à 1 Hz.

facteur inhibant l'activité ATP-asiue des myosines II, la blebbistatine, provoque une très forte diminution des exposants mesurés : de $\alpha = 0,19$ à $0,06$, signifiant que la cellule se rapproche alors beaucoup du comportement d'un solide élastique. Cela montre, une fois de plus, que la dissipation intracellulaire, notamment celle due au glissement des filaments d'actine les uns par rapport aux autres grâce à l'action des myosines, est essentielle à l'explication des propriétés viscoélastiques des cellules.

1.3.3.2 Mesures en régime de fluage

Une autre approche consiste à mesurer la réponse mécanique d'une cellule en fonction du temps, et non plus en fonction de la fréquence. Si on maintient la force imposée constante, il s'agit d'une expérience de fluage, dont le principe a été décrit au 1.3.1.

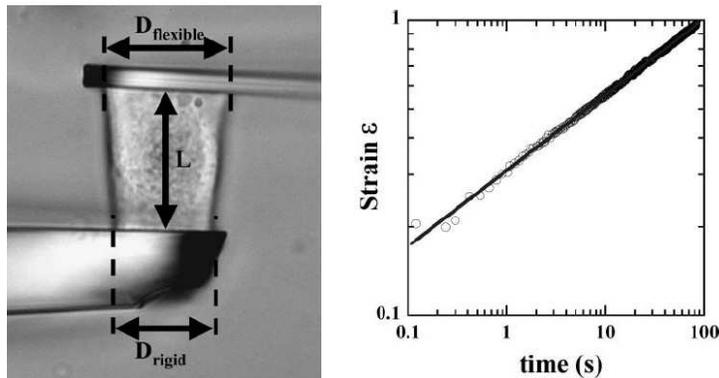


FIG. 1.29 – Expériences d'étirement de cellule entière : image d'une cellule entre les deux lamelles (gauche), et déformation mesurée à force constante (droite). [D'après [30]].

Fluage global par étirement uniaxial Cette technique a été mise en place au laboratoire [120, 30], dans le but de déformer globalement une cellule attachée entre deux microplaques de verre (cf. figure 1.29). Une des lamelles est infiniment rigide par rapport à la cellule, et l'autre relativement souple. Elle a une constante de raideur k , calibrée au préalable. La mesure de la déflexion δ de la lamelle souple donne donc accès directement à la force, donc à la contrainte σ_0 exercée sur la cellule. La distance L séparant les deux lamelles donne une mesure de la déformation ϵ au cours du temps :

$$F = k\delta = S\sigma_0 \quad \text{et} \quad \epsilon(t) = \frac{L(t) - L_0}{L_0} \quad (1.13)$$

où S est la surface d'attache de la cellule sur les microplaques. Une rétroaction sur la position de la lamelle rigide permet de maintenir la force F constante.

Les forces appliquées par ce dispositif sont plus grandes que dans les expériences locales : de 1 à 10 nN environ, car il faut déformer l'ensemble de la cellule. Les mesures ainsi obtenues donnent, pour la fonction de fluage $J(t) = \epsilon(t)/\sigma_0$, des lois de puissance du temps entre 0,1 s et 100 s (figure 1.29), et avec un exposant du même ordre de grandeur que ceux mesurés localement en régime sinusoïdal (0,2 environ). Ceci est une preuve que les mécanismes de dissipation au sein des cellules ont lieu à des échelles de temps et de taille répartis de façon très dense, puisqu'on les observe aussi bien localement que globalement, aux temps courts comme aux temps longs.

Fluage local Des mesures de fluage locales ont été développées à l'aide de techniques magnétiques : soit en appliquant une force constante par une pince magnétique [11], soit en appliquant un couple comme en magnétocytométrie [77], couple dont on considère qu'il est constant sur la durée de l'expérience (mais ces méthodes n'utilisent pas de rétroaction pour maintenir la force réellement constante : la force évolue un peu au cours du temps, dans une limite jugée négligeable par rapport à la résolution de l'expérience). Là encore, on retrouve le même type de lois de puissance, et la même sensibilité aux modifications biochimiques du cytosquelette.

1.3.3.3 Comparaison avec des mesures passives : microrhéologie 1 et 2 points

Le principe des mesures de microrhéologie passive consiste à détecter le mouvement aléatoire de particules traceurs, en réponse aux sollicitations du milieu sans force appliquée. On mesure le mouvement quadratique moyen d'un traceur $\text{MSD} = \langle \Delta r^2(t) \rangle$. Dans un liquide isotrope et homogène à l'équilibre thermodynamique, la transformée de Fourier du MSD est reliée à la partie dissipative de la fonction de réponse du milieu⁹ $\chi(\omega)$ par le théorème de fluctuation-dissipation : $\text{TF}(\text{MSD}) \propto k_B T \frac{\text{Im}(\chi(\omega))}{\omega}$. Cette relation peut être étendue à un milieu viscoélastique [78].

On peut donc en théorie remonter à la fonction de réponse du milieu, qui est elle-même inversement proportionnelle au module viscoélastique [73, 60]. Si on considère la cellule comme un milieu viscoélastique parfait, l'intérêt de cette méthode est que l'on peut accéder à ses propriétés rhéologiques en suivant les déplacements aléatoires de petites vésicules naturellement contenues dans le cytoplasme, sans avoir besoin de rajouter une sonde non endogène, que l'on doit attacher à la cellule (avec les problèmes liés à la géométrie de l'ancrage discutés précédemment) ou l'y faire rentrer.

Cependant, la cellule n'étant pas un milieu isotrope, ni infini par rapport à la taille des traceurs, ni à l'équilibre (il y a consommation d'énergie, restituée sous forme de forces actives), la mesure des fluctuations de position d'un seul traceur ne permet pas de remonter à la fonction de réponse du milieu. D'une part les résultats dépendent de la taille du traceur, *a priori* inconnue quand on utilise une petite vésicule intracytoplasmique. D'autre part, ses mouvements ne sont pas guidés uniquement par des fluctuations d'origine thermique et dépendent de sa position dans la cellule (par exemple les vésicules sont souvent emmenées par des moteurs moléculaires le long des microtubules et ont alors un mouvement guidé) [78, 73].

On peut s'affranchir de ces effets en utilisant une fonction de corrélation entre deux particules contenues dans le milieu cellulaire : en effet, les mouvements corrélés de ces deux particules sont dus à l'intervention du milieu les séparant, qui transmet les déformations et les contraintes. En mesurant les corrélations de position entre ces deux particules, on peut alors remonter au spectre de fluctuations des contraintes dans le milieu, et, partant, à son module viscoélastique [73]. Il faut pour cela utiliser une généralisation non triviale du théorème de fluctuation-dissipation, tenant compte des fluctuations actives de force. Les mesures obtenues par cette technique confirment les lois de puissance obtenues par les mesures de rhéologie active décrites précédemment.

La combinaison de méthodes de microrhéologie active et passive, avec des traceurs contenus dans le cytoplasme ou attachés à la membrane permet de sonder les différents compartiments du cytosquelette cellulaire : cortex d'actine sous la membrane et cytosquelette profond [124]. Les lois de puissance mesurées pour ces 2 contributions ne semblent pas rigoureusement identiques : il est reporté un exposant cortical de $\alpha_{cort} = 0,16$ plus faible que l'exposant lié au cytosquelette profond $\alpha_{int} = 0,26$.

⁹ $\chi(\omega)$ décrit le déplacement du milieu \mathbf{u} en réponse à une force extérieure \mathbf{f} : $\mathbf{u}(\omega) = \chi(\omega)\mathbf{f}(\omega)$

1.3.4 Influence de l'application d'une force sur les propriétés viscoélastiques des cellules

L'application d'une contrainte au niveau des contacts entre la cellule et la matrice a, nous l'avons vu, des effets sur leur composition [45], leur taille [102], leur ancrage au cytosquelette [22], bref, leur capacité à résister à cette force. Cette propriété permet aux cellules de résister à ces forces (sans risquer, par exemple, un déchirement de la membrane). On peut donc supposer que ce mécanisme entraîne aussi, de façon plus globale dans le cytosquelette, une modification de la viscoélasticité permettant finalement à la cellule d'adapter l'ensemble de sa réponse mécanique à son environnement, pour que ses capacités de migration, d'étalement [41] ou de maintien soient toujours assurées même en présence d'un changement mécanique externe.

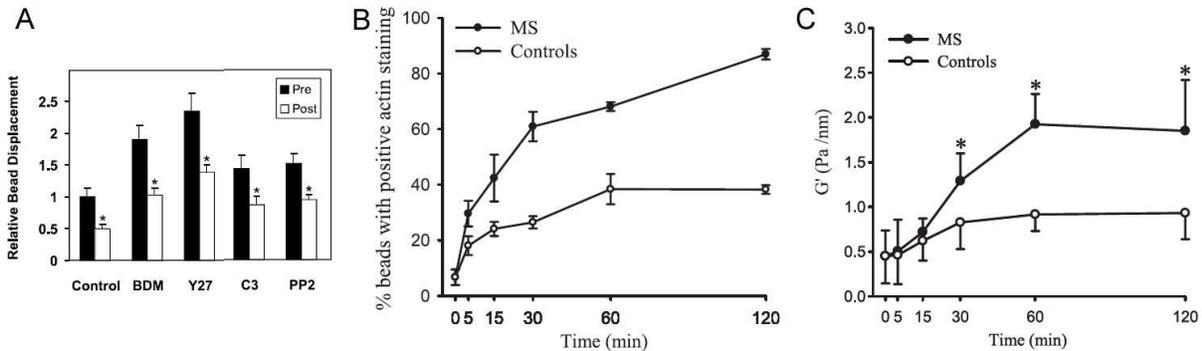


FIG. 1.30 – Phénomène de renforcement d'une cellule sous contrainte prolongée. (A) Diminution de la déformabilité cellulaire : déformation en réponse à une force avant contrainte (barres noires), et après 2 minutes d'application (barres blanches), même en présence d'agents inhibiteurs de l'ATPase (BDM), de ROCK (Y27), de Rho (C3) et de Src (PP2) [D'après [85]]; mesures de l'apparition de structures denses d'actine (B) et de l'augmentation de la rigidité cellulaire (C) en fonction du temps d'application de la contrainte mécanique (MS : "mechanical stress") [D'après [27]].

Et il a en effet été observé que la rigidité interne des cellules est modifiée par l'application prolongée de contraintes : par exemple, les contraintes exercées par un flux sur les cellules endothéliales provoquent une augmentation de leur viscosité [75]. Il a été observé aussi que le niveau de précontrainte dans la cellule détermine sa rigidité [130]. Plusieurs travaux commencent à s'intéresser à la réponse de la cellule à l'application de contraintes prolongées : Matthews et al. [85] ont montré que la cellule se rigidifie au fur et à mesure que des paliers de force lui sont appliqués, et que cette rigidification dépend de la présence d'ATP et de l'action de diverses molécules de signalisation (GTPase Rho, kinases ROCK et Src) mais aussi du temps d'application de la force : si une force est appliquée suffisamment longtemps, la cellule est, même en l'absence d'activité de ces molécules, capable de développer un certain renforcement (cf. figure 1.30.A). Cette augmentation de rigidité est très certainement liée à une modification du cytosquelette d'actine, et en effet, Deng et al. [27] ont montré que l'application d'une contrainte mécanique prolongée engendrait l'apparition de structures denses d'actine autour des points d'application de la contrainte, et ce de façon croissante avec le temps d'application (cf. figure 1.30.B et C).

Les phénomènes de renforcement du contact et de la rigidité cellulaire semblent commencer à se produire entre quelques dizaines de secondes et quelques minutes après l'application de la contrainte, mais ce temps de "mise en route" dépend des cascades de signalisation qui ont lieu à l'intérieur de la cellule [85].

A l'inverse, des expériences récentes s'intéressent au phénomène de "rajeunissement", bien

connu pour la rhéologie des mousses et émulsions : l'application d'un fort taux de cisaillement fluidifie ces matériaux, qui reviennent ensuite lentement vers leurs propriétés viscoélastiques précédentes. Le modèle de milieux vitreux mous, appliqué aux cellules en vertu des comportements fréquentiels de G' et G'' , prévoit donc un tel effet sur les cellules. Et effectivement, l'application transitoire d'une forte contrainte, semble provoquer une fluidification de la cellule, ainsi qu'un retour lent vers ses propriétés viscoélastiques de base [18, 122].

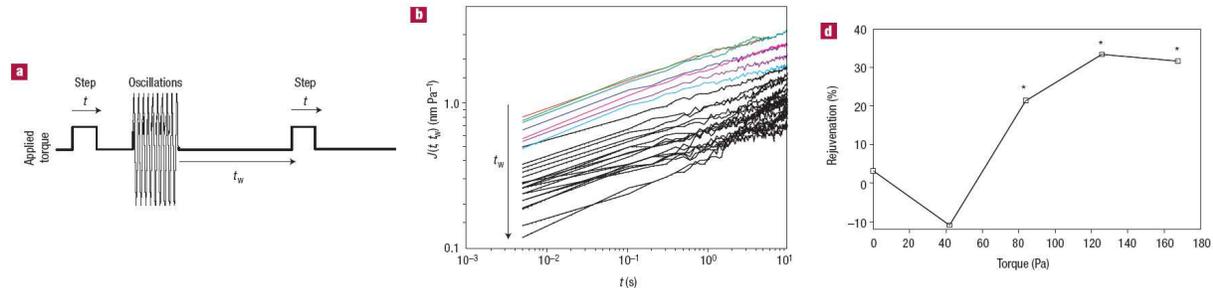


FIG. 1.31 – Expérience de "rajeunissement" sur cellule : (a) principe de l'expérience ; (b) modifications induites sur la fonction de fluage (dans le sens du temps croissant après application de la forte contrainte oscillante : courbes rouge, vert, bleu foncé, rose, violet, bleu clair) ; (c) influence de la valeur de la contrainte oscillante sur le "rajeunissement". [D'après [18]].

La figure 1.31.b montre comment la fonction de fluage est modifiée par l'application d'une forte et brève contrainte oscillante : juste après celle-ci, la cellule flue avec une amplitude plus grande, et cette amplitude diminue au fur et à mesure que le temps de latence augmente. De plus, ce degré de "rajeunissement" dépend de l'amplitude de la contrainte oscillante : la figure 1.31.c fait apparaître un effet de fluidification croissant avec la contrainte, mais un effet inverse à faible contrainte (donc, non pas une fluidification mais une rigidification).

Il semble donc que le niveau de contrainte, ainsi que le fait qu'elle soit appliquée de façon transitoire joue un grand rôle dans l'influence sur la viscoélasticité cellulaire [122]. En effet, les phénomènes de renforcement reportés plus haut demandent une lente adaptation de la cellule, en réponse à l'activation de voies de signalisation variées, et cette adaptation ne se produit certainement pas si la contrainte appliquée se produit sur un temps trop court. De même, le niveau de contrainte appliquée a certainement un effet : l'application d'une forte contrainte oscillante doit grandement modifier les interactions au sein du cytosquelette, en détruisant par exemple une partie des liens entre filaments d'actine, ou des ancrages de ces filaments aux contacts. Observer une fluidification en réponse à ce type de contrainte est alors tout à fait compréhensible.

1.4 Objectifs de la thèse

Dans ce contexte de mécanotransduction largement étudié, nous souhaitons apporter une quantification précise des phénomènes de modification de la rigidité sous force contrôlée. Le but de nos expériences est de relier les effets biologiques en réponse à l'application d'une force au niveau d'un contact (effets attendus selon ce qui a été reporté dans la littérature) aux effets mécaniques induits sur la cellule.

A l'aide d'une bille micrométrique recouverte d'un fragment de fibronectine, nous mimons l'adhésion de la cellule à la matrice. Grâce à cette sonde locale, nous pouvons, comme il est décrit au chapitre suivant, appliquer des forces contrôlées en amplitude et en durée. On mesure alors, comme il sera explicité au chapitre 3, la fonction de réponse des cellules en régime de fluage. On peut répéter cette opération, et observer alors l'évolution de la viscoélasticité de la cellule en fonction du temps d'application de la force. Par ailleurs, cette modification devant être reliée à une évolution de structure du cytosquelette, nous observons la densité de filaments d'actine autour de la bille au cours du temps, durant l'application de la force (cf. chapitre 4).

Nous voulons donc corréler état mécanique et état du cytosquelette d'actine d'une cellule, et quantifier les cinétiques de ces deux phénomènes.

Chapitre 2

Description du dispositif expérimental

Afin de réaliser des mesures mécaniques sur les cellules, nous utilisons des pinces optiques. Cela permet d'appliquer une force correctement calibrée et contrôlée sur une microbille, elle-même fixée à la membrane de la cellule. Plusieurs références sont à la base de la description du piégeage optique ci-dessous [107, 113, 88, 9], et ne seront donc pas reprises par la suite. En parallèle de ces mesures mécaniques, un dispositif d'illumination et de détection de fluorescence est utilisé afin d'imager le cytosquelette d'actine marqué à la Green Fluorescent Protein (GFP).

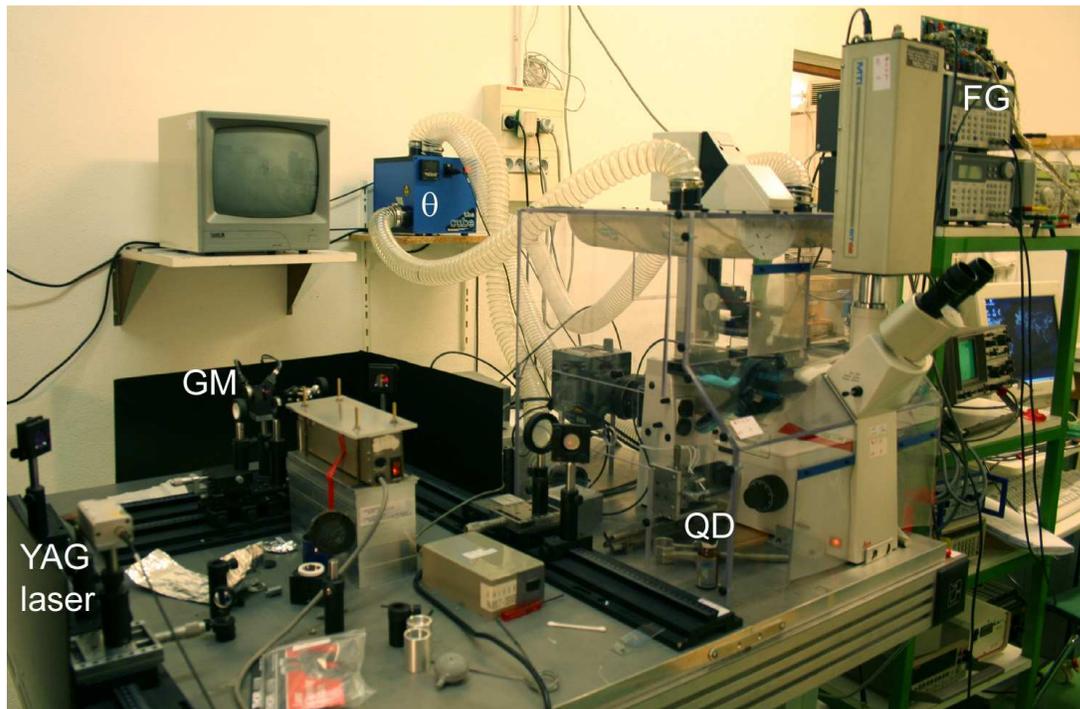


FIG. 2.1 – Photographie du montage expérimental : le laser à YAG (YAG laser), les miroirs galvanométriques (GM) et les générateurs de fonction qui les alimentent (FG), la diode à quadrant (QD), la thermalisation (θ), et le microscope surmonté de la caméra de réglage.

2.1 Les pinces optiques

2.1.1 Principe du piégeage

En observant l'action mécanique d'un faisceau laser focalisé sur de petites particules diélectriques, Ashkin découvre dans les années 70 et 80 le principe du piégeage, par un faisceau gaussien [6], de particules de quelques nanomètres à une dizaine de micromètres de taille. La force ainsi créée permet de manipuler, déplacer, ou déformer toutes sortes d'objets. De plus, la gamme de forces applicables par cette technique (d'une fraction de pN à quelques centaines de pN), la rend tout à fait adaptée à la mesure de forces exercées par de petits objets d'intérêt biologique [3]. On a ainsi déterminé le fonctionnement de moteurs moléculaires : ARN polymérases [118], pompes à protons, myosines, kinésines [112], etc ; on a aussi caractérisé les propriétés des comètes d'actine permettant la propulsion de bactéries ou de microbilles [51]...

C'est le transfert de quantité de mouvement entre les photons diffusés et l'objet qui est à l'origine de la force, mais on distingue traditionnellement deux contributions :

- la force de diffusion \vec{F}_{scat} correspond à l'effet intuitif de pression de radiation due à la lumière. La particule absorbe les photons de quantité de mouvement $\hbar \vec{k}$, et les réémet dans toutes les directions. La contribution moyenne de ce transfert de quantité de mouvement est donc dans la direction du faisceau incident, ce qui n'en fait pas une force de piégeage.
- la force de gradient \vec{F}_{grad} est une conséquence de la polarisation de l'objet diélectrique par le champ électrique, le dipôle induit étant attiré vers les zones de champ fort. Cette force est donc présente lorsque le champ électrique \vec{E} n'est pas homogène, et est dirigée dans la direction du gradient de \vec{E} .

Pour piéger de façon stable un objet en 3 dimensions, il faut que la force de gradient domine largement. La répartition gaussienne d'intensité dans le mode TEM₀₀ d'émission du laser assure le gradient d'intensité dans les directions orthogonales au faisceau, et sa focalisation par un objectif de microscope à forte ouverture numérique (définie par : $NA = n_m \sin\theta$, où n_m est l'indice du milieu et θ l'angle que fait le cône émergent de l'objectif avec l'axe optique) permet d'avoir une grande convergence des rayons, et donc un fort gradient d'intensité dans les trois directions, dirigé vers le point de focalisation. En pratique, la force de pression de radiation n'étant pas rigoureusement négligeable, le plan de piégeage est situé légèrement plus loin que le plan de focalisation.

On décrira par la suite l'effet d'un tel piège sur des particules sphériques non déformables, car c'est la configuration permettant le meilleur contrôle de la force appliquée. La particule considérée sera désignée par l'indice p , le milieu environnant (l'eau ou une solution aqueuse diluée dans notre cas, comme pour toutes les études d'objets biologiques) par l'indice m . On peut définir deux régimes selon le rapport entre la taille de l'objet et la longueur d'onde du laser.

2.1.1.1 Régime de Mie

Pour une sphère de rayon $a \gg \lambda$, on peut raisonner dans le cadre de l'optique géométrique, à l'aide du trajet des rayons lumineux. La force \vec{F}_{scat} provient de la réflexion des rayons à l'interface m/p ainsi que de l'absorption d'une faible partie du rayonnement par la particule. Elle est donc d'autant plus forte que l'intensité lumineuse est forte, donc au centre du faisceau.

La contribution \vec{F}_{grad} provient de la réfraction des rayons aux interfaces successives m/p et p/m . En effet, la réfraction d'un rayon correspond à un changement dans la quantité de mouvement des photons, et donc, par conservation de la quantité de mouvement totale, à un changement opposé de la quantité de mouvement de la sphère. La réfraction des rayons n'a un effet de piégeage que si la particule est plus réfringente que le milieu environnant ($n_p > n_m$).

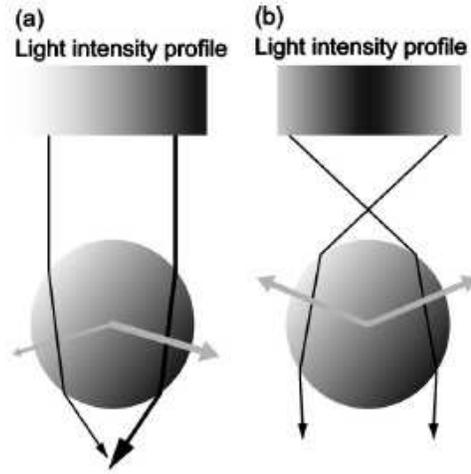


FIG. 2.2 – Description de la force de gradient selon l’optique géométrique : le profil d’intensité du faisceau est représenté en niveaux de gris en haut de chaque schéma ; les chemins des rayons est représenté par les flèches noires, dont l’épaisseur symbolise leur intensité ; les flèches grises montrent la force exercée par chaque rayon sur la bille. (a) faisceau avec gradient d’intensité vers la droite, et force résultante vers la droite ; (b) faisceau gaussien convergent, et force résultante vers le point de focalisation [D’après [88]].

Ceci est schématisé sur la figure 2.2, et on voit que les rayons les plus fortement réfractés sont ceux qui frappent la particule sur ses bords, et ceux qui sont fortement inclinés par rapport à l’axe optique. D’où la double nécessité

- d’utiliser un objectif à forte ouverture numérique (typiquement 1.2 à 1.4, 1.25 dans notre cas) ;
- d’envoyer dans l’objectif un faisceau dont l’intensité sur le bord ne soit pas trop faible. C’est pourquoi on choisit d’élargir le faisceau envoyé dans le microscope, de façon à ce que, idéalement, la pupille d’entrée tronque le faisceau à $1/e^2$ de l’intensité au centre¹ ($\sim 87\%$ de puissance entrante).

2.1.1.2 Régime de Rayleigh

Pour une sphère de rayon $a \ll \lambda$, la particule peut être considérée comme un dipôle ponctuel : les deux contributions sont alors bien séparées. \vec{F}_{scat} , due à l’absorption et à la réémission de lumière par la sphère, vaut alors :

$$F_{\text{scat}} = \sigma \frac{n_m I}{c} \quad \text{avec} \quad \sigma = \frac{128\pi^5 a^6}{3\lambda^4} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 \quad (2.1)$$

où σ est la section efficace de diffusion de la sphère, I l’intensité lumineuse incidente (module du vecteur de Poynting, en W.m^{-2}), λ la longueur d’onde du laser, n_m l’indice du milieu environnant, et $m = n_p/n_m$ le rapport entre les indices de l’objet et du milieu.

$\vec{F}_{\text{grad}} = -\nabla(-\frac{1}{2}\alpha E^2)$, due à l’interaction du dipôle induit $\vec{p} = \alpha \vec{E}$ avec le champ inhomogène, vaut :

$$\vec{F}_{\text{grad}} = \alpha \frac{\mu_0 c}{2} \nabla I \quad \text{avec} \quad \alpha = 4\pi\epsilon_0 n_m^2 a^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \quad (2.2)$$

¹On peut piéger des objets même sans respecter cette condition, mais le piégeage sera moins efficace.

où α est la polarisabilité de la sphère. $\overrightarrow{F_{\text{grad}}}$, dont le signe dépend du rapport des indices, pointe donc dans la direction du gradient d'intensité lumineuse, dès que $n_p > n_m$.

Par exemple, dans le cas simple d'un faisceau gaussien se propageant selon z , de puissance lumineuse totale P , que l'on fait converger par un objectif d'ouverture numérique NA sans le tronquer, son waist vaut $w_0 = 1,22\lambda/(2 NA)$ au point de focalisation, et la répartition de l'intensité lumineuse vaut :

$$I(r, z) = \frac{2P}{\pi w(z)^2} e^{-\frac{2r^2}{w(z)^2}} \quad \text{avec} \quad w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_0}\right)^2} \quad (2.3)$$

avec $z_0 = \pi n_m w_0^2 / \lambda$. Ceci permet de calculer l'expression de la force de gradient transverse, dans le plan de focalisation :

$$F_{\text{grad}} \propto -r e^{-\frac{2r^2}{w_0^2}} \quad (2.4)$$

et on a donc, près du centre, une force de rappel linéaire $F_{\text{grad}} \sim -kr$. L'allure de cette force est représentée sur la figure 2.3, avec l'énergie potentielle de piégeage correspondante.

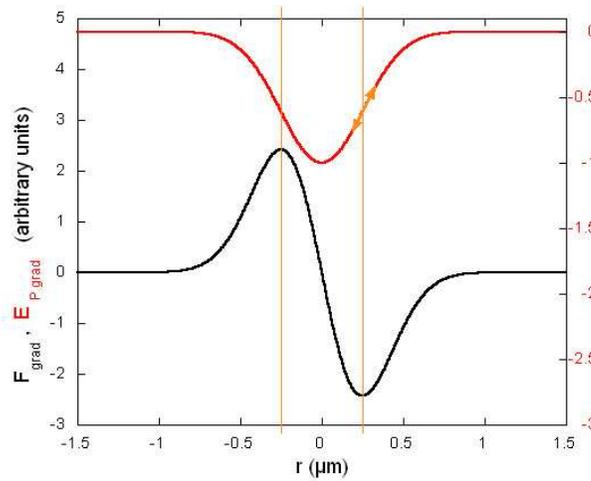


FIG. 2.3 – Représentation de l'allure de la force de gradient (courbe noire) et de l'énergie potentielle correspondante (rouge) dans le plan de piégeage, pour un faisceau de $w_0 = 500$ nm. En orange est délimitée la zone où la force de piégeage reste approximativement linéaire, la double flèche orange correspondant à la force maximale.

Etant donnée la dépendance en m de chaque contribution, on comprend que 2 objets de même taille mais d'indice différent ne seront pas forcément piégés avec la même efficacité : par exemple, il est plus facile de piéger des billes de silice ($n_p = 1.51$ donc $m_{\text{sil}}^2 = 1.29$ à 589 nm) que des billes de latex ($n_p = 1.59$ donc $m_{\text{lat}}^2 = 1.43$), car la force de gradient croît en $m^2 - 1$ et la force de diffusion en $(m^2 - 1)^2$. Pour deux billes de même taille, la force de gradient exercée sur la bille de latex est donc d'environ $(m_{\text{lat}}^2 - 1)/(m_{\text{sil}}^2 - 1) \simeq 1,5$ fois plus grande que celle exercée sur la bille de silice, mais la force de pression de radiation est $\simeq 2,2$ fois plus grande sur la bille de latex. Celle-ci est donc beaucoup plus facilement éjectée hors du piège le long de l'axe optique.

2.1.1.3 Régime intermédiaire

Dans le cas où la taille de l'objet est du même ordre de grandeur que la longueur d'onde ($a \sim 0,1\lambda - 10\lambda$, ce qui est exactement le cas des objets d'intérêt biologique), il faut faire appel

à de complexes calculs d'électromagnétisme pour obtenir une évaluation de la force s'exerçant sur l'objet.

Cependant, toutes les aberrations optiques (objectif, dioptries successifs, structure non parfaitement gaussienne du faisceau...) ne peuvent être prises en compte. C'est pourquoi on préfère déterminer les propriétés du piège de façon expérimentale : on l'étalonne précisément avant toute expérience (cf. figure 2.11).

2.1.1.4 Choix de la longueur d'onde

Outre la nécessité de disposer d'un faisceau de forte puissance et à répartition d'intensité gaussienne, le choix de la longueur d'onde du laser obéit à une nécessité majeure : il faut limiter l'échauffement du milieu dû à l'absorption du rayonnement électromagnétique. Les milieux étant essentiellement aqueux dans les études de systèmes biologiques, il faut une longueur d'onde à laquelle les molécules d'eau n'absorbent pas trop. D'où l'utilisation de lasers situés dans le rouge et le proche infra-rouge. En effet, le spectre d'absorption des molécules d'eau présente un minimum justement vers 1060-1100 nm (et un autre vers 800 nm) [113]. Un rapide calcul de diffusion de la chaleur [9] permet alors d'évaluer l'échauffement du milieu pour un rayonnement à 1064 nm : 1,4 K/100 mW environ. Cette valeur reste faible, mais est à prendre tout de même en considération : c'est notamment pourquoi, en pratique, on règle la température de thermalisation de notre chambre expérimentale à 34 ou 35°C et non 37°C.

2.1.2 Notre dispositif

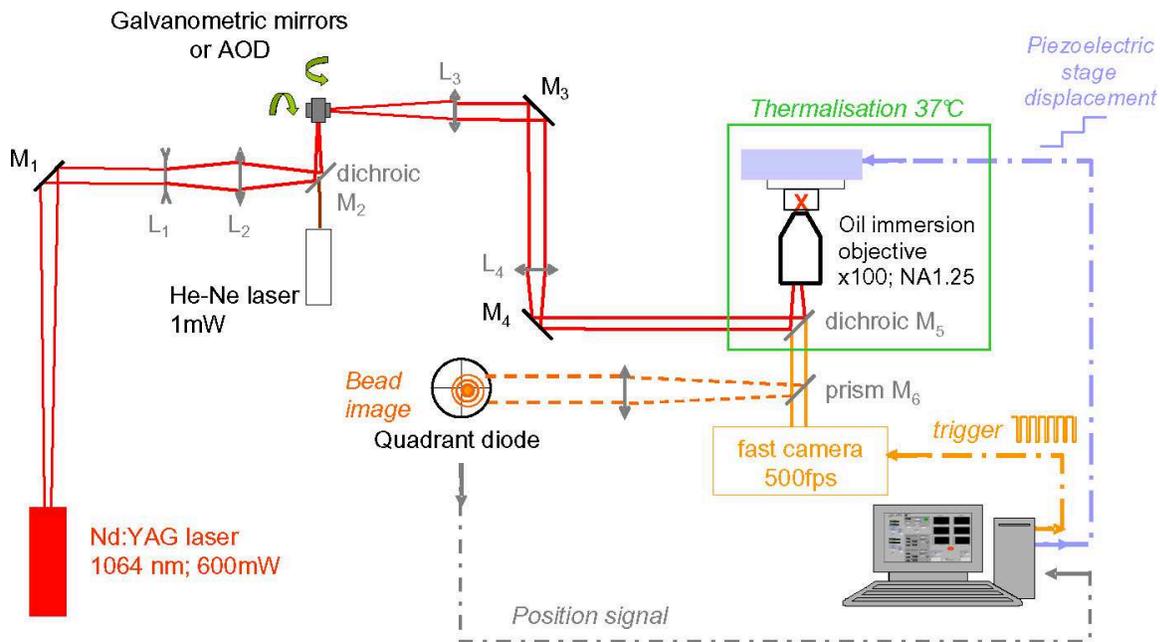


FIG. 2.4 – Schéma du montage de pinces optiques

2.1.2.1 Laser et chemin optique

Ce dispositif de pinces optiques est basé sur un laser infra-rouge Nd :YAG fonctionnant à 1064 nm (Spectra Physics). Le milieu amplificateur est un cristal de YAG (grenat d'yttrium et d'aluminium) dopé en ions néodyme Nd^{3+} , qui sont le siège des transitions de pompage optique

et d'émission stimulée. Il est pompé par diode laser aux alentours de 800 nm. La puissance de pompe est accordable entre 0,4 W et 2 W, ce qui permet de fournir une puissance lumineuse émise de 100 à 600 mW, à la longueur d'onde $\lambda=1064$ nm (cf. figure 2.5). Le trajet optique du laser jusqu'à la pupille d'entrée du microscope est schématisé sur la figure 2.4). Il comprend :

- un miroir dichroïque M_2 (miroir chaud, réfléchissant l'infra-rouge et transmettant le visible), où arrive un laser He-Ne ($\lambda'=632,8$ nm), superposé de façon à rendre les alignements visibles.
- 2 miroirs galvanométriques (Cambridge Technology Inc.), permettant de défléchir le faisceau. Ces miroirs sont pilotés par des générateurs de fonction (TTi TG1010), commandés par le port série (COM1) de l'ordinateur.
- 4 lentilles, dont les distances focales sont données dans le visible², à 589 nm. L_1 (de focale $f'_1 = -70$ mm) et L_2 ($f'_2 = 75$ mm) pré-élargissent le faisceau et le rendent légèrement convergent, de façon à compenser la variation de l'indice de l'objectif avec la longueur d'onde. En effet, comme l'indice du verre diminue avec la longueur d'onde, la focale augmente et le faisceau infra-rouge est focalisé plus loin de l'objectif que la lumière visible. Si on veut pouvoir piéger des objets dans le même plan que celui où on observe, il faut rendre le faisceau laser légèrement convergent avant l'entrée dans l'objectif. L_3 ($f'_3 = 100$ mm) et L_4 ($f'_4 = 500$ mm) sont disposées en configuration télescope : elles élargissent d'un facteur $f'_4/f'_3 = 5$ la taille du faisceau. Elles sont placées afin que les miroirs galvanométriques soient dans le plan conjugué de la pupille d'entrée de l'objectif. Un mouvement des miroirs provoque donc une variation dans l'angle d'entrée du faisceau dans l'objectif, sans modifier la position de son centre. Ainsi la puissance entrante reste la même.
- un dernier miroir chaud M_5 , inséré dans le tube du microscope, juste sous l'objectif, vers lequel il fait remonter le faisceau.

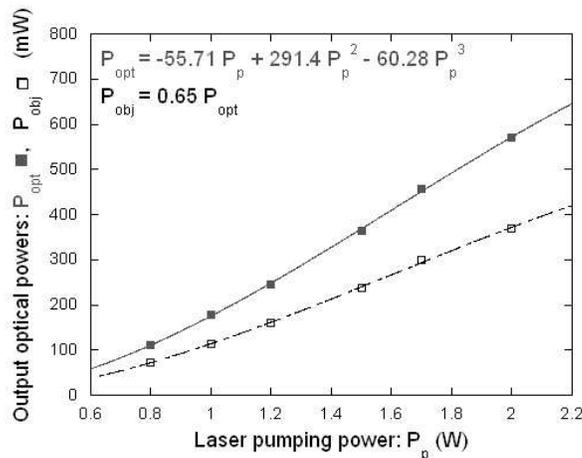


FIG. 2.5 – Puissance lumineuse en sortie de la tête laser (carrés gris pleins) et juste avant l'objectif après chemin optique (carrés noirs), en fonction de la puissance de pompe.

Le passage par les divers éléments d'optique diminue d'un facteur environ 2/3 la puissance lumineuse entrant dans l'objectif, comme on le voit sur les courbes de la figure 2.5. Cependant, par la suite, quand on parlera de la puissance lumineuse du laser, ce sera la puissance en sortie de la tête laser, et ce pour deux raisons : tout d'abord un simple facteur de proportionnalité permet de remonter à la puissance "effectivement disponible" juste avant l'objectif ; et ensuite,

²Leur valeur à 1064 nm est de quelques % plus grande : $\frac{\Delta f'}{f'} = -\frac{\Delta(n-1)}{n-1} = 2,5\%$ environ pour du verre de type BK7.

une autre fraction de l'intensité lumineuse (non mesurable, elle) est perdue au niveau de la pupille d'entrée, puisque, comme expliqué précédemment, le faisceau a été élargi pour obtenir un diamètre légèrement plus grand que celui la pupille d'entrée. On perd par ailleurs encore une petite fraction de la puissance lumineuse à l'intérieur même de l'objectif, par réflexions sur les dioptries séparant les couches successives qui le composent.

2.1.2.2 Le microscope : objectif et cale piézoélectrique

Outre le laser, l'élément fondamental de ce montage est le microscope inversé (modèle DM IRB de la marque Leica), muni d'un objectif de grossissement $\times 100$ et d'ouverture numérique $NA = 1,25$ (Leica C Plan). Cet objectif est à immersion à huile, de façon à augmenter l'ouverture numérique, et à adapter l'indice de réfraction entre l'objectif et la lamelle de verre. En effet les fortes variations d'indice sur les dioptries successifs provoquent des aberrations géométriques qui altèrent la qualité du faisceau ainsi que l'efficacité de convergence, et donc le piégeage. L'ensemble du microscope est placé dans une enceinte thermostatée (The Box, thermalisée par The Cube, Life Imaging Services) permettant de se placer dans les conditions de température convenant à la physiologie des cellules animales. On maintient ainsi une température de 34 à 35°C relativement uniforme sur l'ensemble du microscope, ce qui limite les gradients de température qui peuvent avoir pour effet d'engendrer des dérives mécaniques ou des aberrations optiques.

La chambre expérimentale dans laquelle sont contenues les cellules (qui sera décrite plus précisément au 2.2.3) est montée sur une cale piézoélectrique elle-même fixée sur la platine du microscope. Cette cale (NanoCube®, Physik Instrumente) permet un déplacement de l'échantillon dans les 3 directions (X,Y,Z), contrôlé au nm près. Elle est par ailleurs commandable sur chacune de ses voies par un signal analogique. On utilise cette entrée pour asservir la position du piège au moyen d'un signal fourni par la carte d'acquisition (PCI-MIE 16E-4, National Instruments) de l'ordinateur. Ceci sera détaillé au 2.3.2.1.

2.1.2.3 Détecteur de position

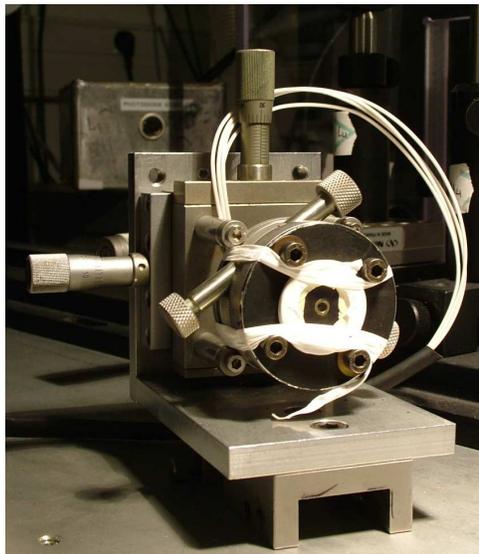


FIG. 2.6 – Photographie de la diode à quadrant montée sur deux platines de translation micro-métriques et sur une platine de rotation.

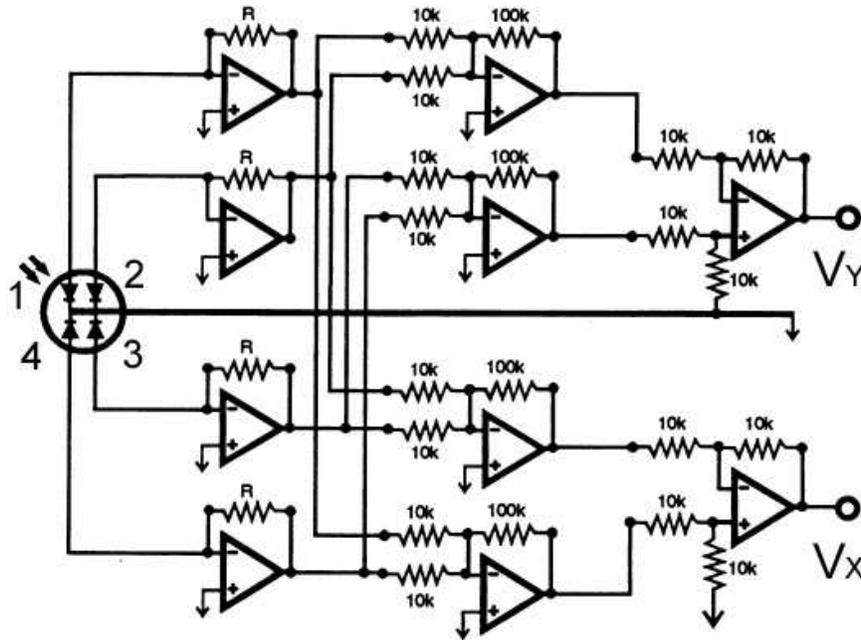


FIG. 2.7 – Schéma électronique de l'amplificateur différentiel situé après la diode à quadrant : les quadrants sont indicés 1 (haut-gauche), 2 (haut-droite), 3 (bas-droite) et 4 (bas-gauche). [D'après [109]]

Enfin, le dernier élément de notre dispositif est la photodiode à quadrants, de diamètre 1 mm (S1557, Hamamatsu), qui permet de mesurer la position de la bille. Elle est située après une sortie vidéo du microscope (lentille de tube réglée sur $\times 1$), dans l'enceinte thermostatée. Elle reçoit ainsi la lumière provenant de l'illumination du microscope. Une bille placée au centre du champ apparaît comme un disque sombre sur fond lumineux (avec un grandissement $\times 100$). Chaque quadrant, recevant une intensité lumineuse I_n , délivre un courant $i_n \propto I_n$. Ils sont ensuite reliés à un amplificateur différentiel, inspiré de [109], schématisé sur la figure 2.7. On obtient ainsi en sortie deux tensions :

$$\begin{cases} V_X = 10 \cdot 10^3 R ((I_1 + I_4) - (I_2 + I_3)) \\ V_Y = 10 \cdot 10^3 R ((I_3 + I_4) - (I_1 + I_2)) \end{cases}$$

proportionnelles à la différence d'intensité entre les quadrants respectivement de gauche et de droite pour V_X et du haut et du bas pour V_Y . Ces signaux devraient donc être proportionnels aux déplacements respectifs de la bille : $-X$ et $-Y$.

On a donc étalonné ce détecteur, afin d'en vérifier la linéarité, en faisant simplement se déplacer une bille collée sur la lamelle à l'aide du Nanocube. Les courbes donnant la valeur absolue des tensions V_X et V_Y en fonction du déplacement de la bille sont présentées sur la figure 2.8 : la linéarité est excellente, sur la plage de $1 \mu\text{m}$ présentée ici. Afin d'être certain de rester dans cette zone de linéarité, on utilise le détecteur proche de son centre (cf 2.3.2.1).

Pendant, les coefficients de proportionnalité A et A' (en $\text{V}/\mu\text{m}$) dépendent fortement de l'éclairement, donc on les remesure rapidement avant chaque expérience : un programme sous LabVIEW génère quelques oscillations de la cale piézoélectrique à amplitudes X et Y contrôlées, et on mesure les signaux V_X et V_Y obtenus.

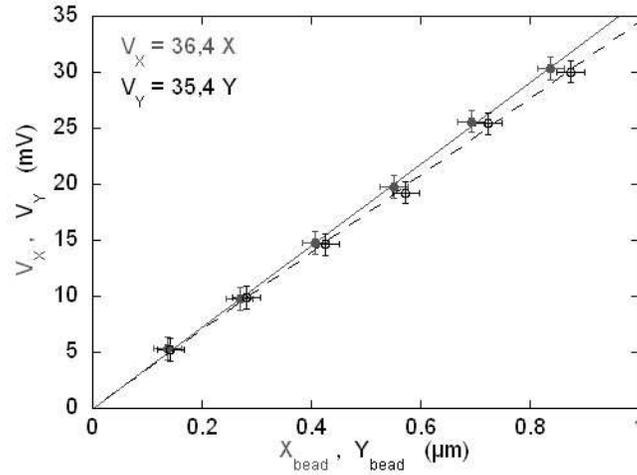


FIG. 2.8 – Courbes d'étalonnage des signaux analogiques délivrés par la diode à quadrant en fonction du déplacement d'une bille de silice de diamètre $3,47 \mu\text{m}$. Ces signaux sont linéaires avec la distance : $V_X = AX$ et $V_Y = A'Y$, avec $A = 36,4 \cdot 10^{-3}$ et $A' = 35,4 \cdot 10^{-3} \text{ V}/\mu\text{m}$.

2.1.3 Calibration du piège

Avant toute expérience, il faut donc mesurer les propriétés du puits de potentiel que forme le piège (cf. 2.1.1). Même si celui-ci n'aura pas exactement la même allure que celle estimée pour le régime de Rayleigh (figure 2.3), on peut, près du centre, l'approximer par un potentiel harmonique (*i.e.* une force linéaire).

Pour calibrer un tel dispositif, plusieurs méthodes peuvent être employées :

- ◆ **spectre de fluctuations** : les billes micrométriques dans l'eau constituent des particules browniennes. Une fois piégée, on peut obtenir l'allure du spectre des petites fluctuations de position de la sphère³, autour du centre du piège [88] :

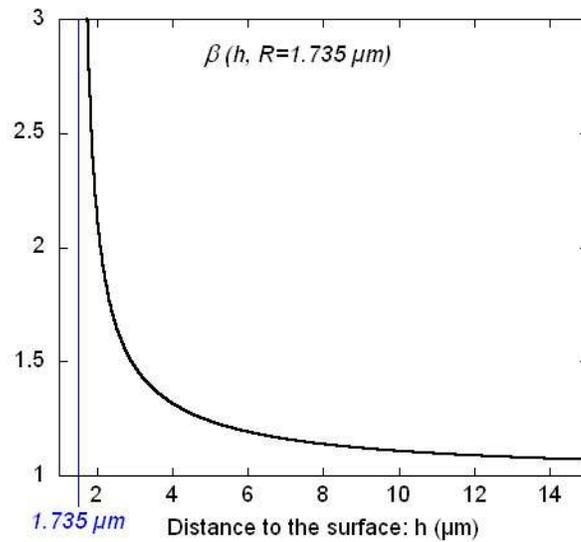
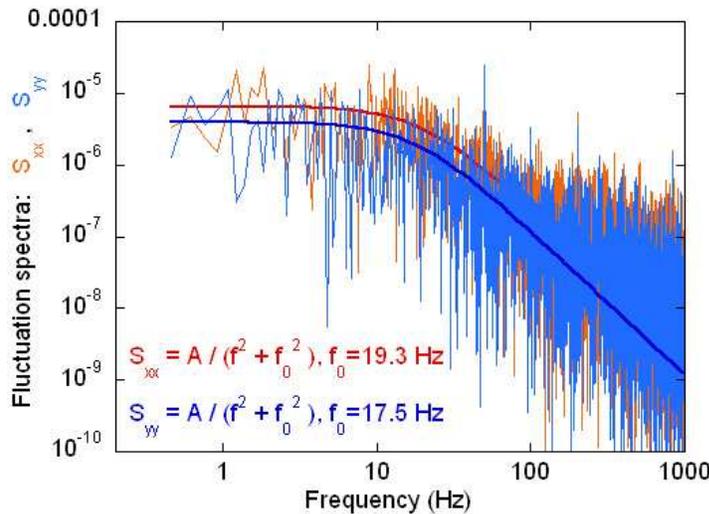
$$S_{xx}(f) = \frac{k_B T}{\gamma \pi^2 (f_0^2 + f^2)} \quad \text{avec} \quad f_0 = \frac{k}{2\pi\gamma} \quad (2.5)$$

où η_m est la viscosité du milieu environnant (solvant aqueux : $\eta_{\text{eau}} = 9 \cdot 10^{-4} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ à 25°C , $\eta_{\text{eau}} = 7 \cdot 10^{-4} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ à 37°C), f_0 la fréquence de coupure du spectre, et k la constante de raideur du piège. γ est le coefficient de friction du milieu sur la sphère et vaut, en fonction de son rayon a et de la hauteur h par rapport à la surface (lamelle de verre), sur laquelle la vitesse du fluide est nulle :

$$\gamma(a, h) = 6\pi\eta_m a \beta(a/h) = \frac{6\pi\eta_m a}{1 - \frac{9}{16} \frac{a}{h} + \frac{1}{8} \left(\frac{a}{h}\right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{a}{h}\right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{a}{h}\right)^5} \quad (2.6)$$

La fonction $\beta(a/h)$ est représentée sur la figure 2.9 pour des billes de rayon $a = 1.735 \mu\text{m}$. On obtient donc la raideur du piège en mesurant la fréquence de coupure f_0 . Le spectre de la figure 2.10 a été mesuré sur notre dispositif, pour la puissance de pompe la plus faible (400 mW). On mesure une fréquence de coupure de 18 Hz environ selon X et Y , ce qui équivaut à une raideur de $3,5 \text{ pN}/\mu\text{m}$ environ, et qui est compatible avec les mesures de raideur réalisées par les méthodes présentées plus loin.

³ $S_{xx}(f)$ est en unité de déplacement²/Hz, ce qui suppose évidemment d'avoir auparavant étalonné la réponse du détecteur.


 FIG. 2.9 – Allure de la fonction $\beta(h)$ pour des billes de rayon $1,735 \mu\text{m}$.

 FIG. 2.10 – Spectres de fluctuation de position selon X et Y en fonction de la fréquence, mesurés sur des billes de rayon $1,735 \mu\text{m}$ à distance $h = 15 \mu\text{m}$ de la surface, piégées à puissance minimale ($P_p = 400 \text{ mW}$).

Cette méthode a l'avantage d'être simple à mettre en oeuvre, et de ne nécessiter aucun dispositif de déplacement du piège ou de l'échantillon. Cependant, elle ne donne accès qu'à la raideur au centre du piège, et ne permet donc de connaître la force que pour de très petits déplacements. De plus, elle est assez peu adaptée aux pièges de forte rigidité : d'abord parce qu'une bille très fortement piégée a des fluctuations de position très faibles, et qu'il faut donc qu'elles soient supérieures au bruit du détecteur (on voit d'ailleurs sur la figure 2.10 que les spectres sont assez bruités) ; ensuite parce que la fréquence de coupure est proportionnelle à la rigidité, et qu'il faut donc un détecteur à très large bande passante pour pouvoir mesurer le spectre au moins une décade au-delà de f_0 (typiquement, pour notre dispositif, avec le laser à puissance maximale, des billes de $3,47 \mu\text{m}$ à $10\text{-}15 \mu\text{m}$ de la

surface, la fréquence de coupure serait de l'ordre de 500 Hz).

- ◆ **méthode hydrodynamique** : cette méthode tire profit de la viscosité du milieu homogène (l'eau) entourant la sphère. Si on impose un flux hydrodynamique autour d'une bille piégée, on a égalité, à l'équilibre, entre la force exercée par le piège sur la bille, et la force de frottement visqueux $F_{visq} = -\gamma v$ où v est la vitesse de la bille par rapport au flux. L'équilibre des forces peut être considéré comme presque instantanément atteint : la durée du régime transitoire peut être estimée par $\tau = \frac{\frac{4}{3}\pi\rho_{\text{eff}}a^3}{3\pi\eta_m a} = \frac{4}{9}a^2\frac{\rho_{\text{eff}}}{\eta_m} \simeq 10^{-6}$ s, où $\rho_{\text{eff}} = \rho_{\text{sil}} - \rho_m \simeq 1,5.10^3$ kg.m⁻³ est la masse volumique effective de la bille dans le milieu aqueux.

On applique le flux en déplaçant la chambre expérimentale contenant une suspension de billes dans l'eau, à l'aide de la cale piézoélectrique. Ce déplacement est contrôlé par ordinateur, *via* un programme LabVIEW (National Instruments, USA), mis au point par Martial Balland pendant sa thèse au laboratoire [9]. Des trains d'onde sinusoïdaux d'amplitude et fréquence contrôlables sont envoyés à la cale piézoélectrique, et sont synchronisés avec l'acquisition des images sur une caméra rapide (Kodak SR500), et ce dans les 2 directions X et Y (même si les équations qui suivent sont écrites selon X seulement).

On a alors les grandeurs suivantes :

- le déplacement de la cale c'est-à-dire du milieu (par rapport au référentiel du laboratoire R_{lab}) $X(t) = X_0 \sin(2\pi ft)$, étalonné préalablement ;
- le déplacement de la bille par rapport au centre du piège (fixe dans R_{lab}) $x(t) = x_0 \sin(2\pi ft + \phi)$, mesuré sur les images obtenues à la caméra rapide (à l'aide du logiciel ImaQ Vision Builder, NI, USA) ;
- le déplacement relatif de la bille par rapport au flux : $\delta X(t) = x(t) - X(t) = \delta X_0 \sin(2\pi ft + \phi')$ calculé à l'aide des grandeurs précédentes.

La vitesse de la bille par rapport au flux vaut alors : $v(t) = 2\pi f \delta X_0 \cos(2\pi ft + \phi')$. En prenant simplement les amplitudes de chacun de ces signaux, on doit avoir l'égalité suivante :

$$2\pi f \delta X_0 6\pi\eta_m a \beta(a, h) = F_{trap}(x_0) \quad (2.7)$$

et l'on peut donc mesurer la force F_{trap} en fonction de la distance x_0 de la bille au centre du piège. Ces mesures sont représentées sur les courbes de la figure 2.11.

On voit donc que le piège n'est pas tout à fait linéaire, l'ajustement se faisant par un polynôme de degré 2 passant par zéro. On estime l'incertitude sur la connaissance du déplacement de la cale piézoélectrique $X(t)$ à quelques dizaines de nm ; l'incertitude sur la mesure de la position de la bille $x(t)$ à la caméra rapide peut être réduite à moins d'un pixel par interpolation de la forme de la bille soit moins de 50 nm. La quantité probablement la plus délicate à connaître avec précision est le rapport a/h : la hauteur h est estimée en remontant l'objectif à partir du fond de la chambre, au moment où la bille semble se défocaliser et le rayon des billes est connu à ± 0.05 μm près. On peut donc estimer que $\beta(a, h)$ n'est pas connu à mieux que 5 % près, et que la calibration de la force est effectuée avec à peu près le même degré de précision.

Il faut ensuite prendre en compte les conditions expérimentales au moment des manipulations sur cellules : le laser traverse en général au moins une partie de la cellule, où l'indice varie, ce qui modifie la forme du piège. On peut donc estimer que l'on contrôle la force à mieux que 10% près, mais peut-être pas beaucoup mieux.

- ◆ **mesure de force à l'échappement** : le principe est globalement le même que celui décrit précédemment, mais on cherche uniquement à estimer la force maximale (cf. figure 2.3).

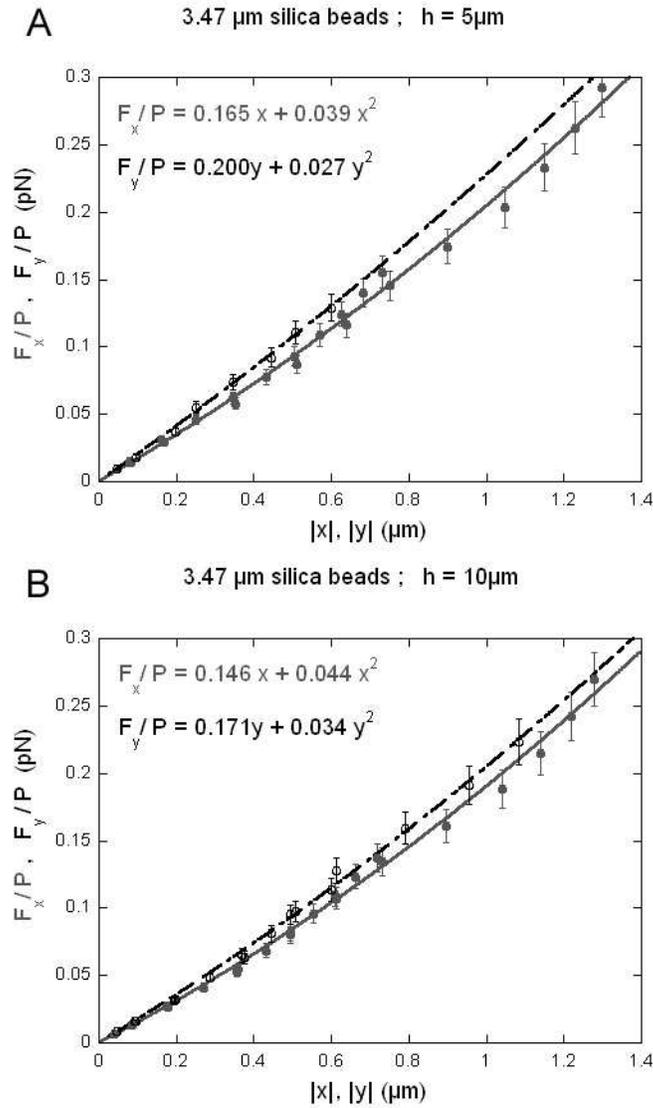


FIG. 2.11 – Etalonnage de la force de piègeage sur des billes de diamètre $2a = 3,47 \mu\text{m}$ en fonction de la distance au centre du piège, en X (disques gris, courbe continue grise) et en Y (cercles noirs, courbe pointillée noire) (regroupement des mesures effectuées à diverses puissances ($P_p=1$ et $1,5$ W), alignées sur une même courbe représentant la force divisée par la puissance lumineuse F/P_{opt}). L'ajustement est réalisé par des polynômes du deuxième degré passant par zéro. La bille est située à une hauteur h de (A) $5 \mu\text{m}$ et (B) $10 \mu\text{m}$ au-dessus de la lamelle.

On applique pour cela une force extérieure, par exemple un flux hydrodynamique, et on n'a alors qu'une mesure à effectuer : celle de la force nécessaire pour faire sortir une bille du piège.

Dans notre cas, on se sert de cette méthode rapide pour vérifier, avant toute expérience, que le piège est bien réglé. On piège une bille à hauteur $h = 30 \mu\text{m}$ au-dessus de la lamelle (pour pouvoir prendre $\beta \simeq 1$) avec le laser à $P_p = 800$ mW, soit une puissance lumineuse de 115 mW environ. On utilise cette fois-ci les miroirs galvanométriques pour défléchir le faisceau. On fait osciller le piège sinusoïdalement à fréquence f , à une amplitude prise, par référence, à 420 mV_{P-P} (ce qui correspond à un déplacement sinusoïdal du centre du piège $X_p(t) = X_{p,0} \sin(2\pi ft)$ avec $X_{p,0} \simeq 5,5 \mu\text{m}$ dans le plan focal). La bille oscille

alors sinusoidalement : $x(t) = x_0 \sin(2\pi ft + \phi)$. On augmente f jusqu'à ce que la bille s'échappe du piège. A cette fréquence f_{max} , on mesure la force à l'échappement : $F_{max} = 6\pi\eta_m a 2\pi f_{max} \delta X_0$.

Toujours pour les billes de rayon $a = 1,735 \mu\text{m}$, on mesure en général $f_{max} \simeq 29 \text{ Hz}$ à 25°C . Or on a $\delta X_0 = |x_0 e^{i\phi} - X_{p,0}| \simeq 0,95 X_{p,0}$, et $\eta_m = 0,89 \text{ Pa.s}$ pour l'eau à 25°C . Cela donne une force maximale $F_{max} \simeq 27,5 \text{ pN}$, ce qui est tout à fait en accord avec notre courbe d'étalonnage (en prenant le dernier point $X = X_{max} \simeq 1,3 \mu\text{m}$).

On considère, lors de la vérification préliminaire à toute expérience, que le piège est "bien" réglé quand on mesure une fréquence $f_{max} \geq 27 \text{ Hz}$, soit une tolérance d'environ 7-8% sur la valeur de la force.

Notre piège est de raideur 35 à 120 pN/ μm , selon la puissance de laser envoyée. Typiquement, à l'aide de billes de silice de diamètre 3,47 μm , maintenues de 1 à 1,5 μm du centre du piège, on peut appliquer des forces de 35 à 180 pN.

2.2 Préparation des échantillons

2.2.1 Culture cellulaire

Des cellules de trois lignées différentes ont été utilisées pour ce travail. Tout d'abord des cellules épithéliales alvéolaires humaines de type A549 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA), puis des myoblastes murins, de types C2 (fournies par Maité Coppey, Institut Jacques Monod, Paris, France) puis C2C12 (fournies par Mme Mireille Lambert, Institut du Fer à Moulin, Paris, France). Dans les trois cas, la culture s'effectue dans des flasques en plastique stériles. On utilise comme milieu de culture du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté en glutamine à 2 mM, en sérum de veau foetal (SVF⁴) à 10%, et en antibiotiques : pénicilline à 100 U/mL et streptomycine à 50 mg/mL (Invitrogen).

Les cellules sont conservées dans un incubateur à 37°C, en atmosphère saturée en humidité et à 5 % en CO₂. Quand elles se rapprochent de la confluence⁵, les cellules sont décrochées à l'aide de 1 mL d'un mélange d'EDTA à 0,53mM (soit 0,02%) et de trypsine à 0,05%(Invitrogen), une endoprotéase qui coupe notamment les protéines d'adhésion des cellules⁶. L'action de la trypsine est stoppée par redilution de la suspension de cellules obtenue dans du milieu de culture contenant du SVF.

2.2.2 Préparation des billes

A l'aide des billes, on souhaite sonder de façon locale les propriétés mécaniques des cellules en mimant l'action d'une force externe. Il faut donc s'ancrer aux mêmes récepteurs membranaires que ceux qui interviennent dans la mécanotransduction lorsque la cellule est en interaction avec la matrice extracellulaire *in vivo*. On recouvre donc les billes d'un ligand contenant le tripeptide RGD (Arg-Gly-Asp), séquence de la fibronectine qui est reconnue par les intégrines.

Les billes de silice, de diamètre 3,47 μm (Bangs Laboratories Inc.) présentent à leur surface des groupements carboxyles (-COOH) qui vont pouvoir former, avec l'extrémité -NH₂ du ligand peptidique, un lien covalent (liaison amide).

Cependant, afin de générer un ancrage fort au cytosquelette d'actine [82], il faut que la séquence RGD soit entièrement disponible et que l'ensemble de la molécule soit assez flexible. C'est pourquoi on utilise une séquence de 23 acides aminés (PepTide 2000, Telios Pharmaceuticals, CA, USA), de telle sorte que la séquence RGD soit loin de l'extrémité N-terminale :



On part de la solution stock à 5 mg/mL, et on suit le protocole suivant ⁷ (pour 2 mg de solution stock) :

⁴Le SVF contient un grand nombre d'acides aminés, de protéines, d'hormones (facteurs de croissance notamment), et de molécules lipidiques (notamment le LPA, un phospholipide intervenant entre autres dans les voies de signalisation biochimiques permettant une forte contractilité cellulaire).

⁵Pour les C2 et C2C12, le passage doit en fait avoir lieu dès que la confluence atteint environ 50%, de façon à éviter que les cellules, en entrant en contact les unes avec les autres, ne se différencient en myotubes.

⁶La trypsine hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles un acide aminé basique (Lysine ou Arginine) engage sa fonction acide.

⁷L'EDAC, de formule C₈H₁₇N₃, est un agent favorisant la formation des liaisons amides en activant les groupements carboxyles. La BSA (Bovine Serum Albumine), de poids 66,4 kDa, est une grosse protéine très stable, servant à saturer des sites de liaison d'autres molécules de façon non spécifique.

| | | |
|---|--|-----|
|  | Préparer l'EDAC à 1 mg/mL : 20 mg d'EDAC dans 20 mL de tampon phosphate 100 mM (soit une tablette Sigma dans 20 mL d'eau distillée). Ajuster à pH=5 (extemporanément avec HCl 1 M) | |
|  | Prélever 2 mg de billes (= 20 μ L de la suspension stock, après avoir bien vortexé) | |
|  | Ajouter sur le culot de billes 560 μ L d'EDAC à 1 mg/mL | |
|  | Ajouter le peptide RGD : 80 μ L (de la solution stock à 5 mg/mL dans DMSO), ou 8 μ L (pour dilution 1/10), ou 4 μ L (1/20)... Vortexer. | |
|  | Agiter 2 h à température ambiante. Re-vortexer. | 2h |
|  | Laver 2 fois avec du PBS 1X (précipiter les billes par centrifugation, éliminer le surnageant, ajouter 1 mL de PBS 1X, reprendre le culot, reprécipiter) | |
|  | Sur le culot de billes ajouter 1 mL de PBS stérile | |
| | Garder la suspension stock au frigo | |
|  | Suspension à diluer 20 fois dans du milieu BSA, le jour même de l'utilisation sur cellules : 50 μ L de billes dans 950 μ L de DMEM 1% BSA. | |
|  | Ajouter environ 50 μ L de cette suspension diluée sur les lamellesensemencées de cellules, et laisser incuber 30 min à 37°C. | 30' |

2.2.3 Préparation des chambres expérimentales

2.2.3.1 Ensemencement des lamelles

24 h avant expérimentation, on prépare les lamelles destinées aux chambres expérimentales : on utilise des lamelles de verre 22 \times 22 mm, préalablement stérilisées à l'étuve. On y dépose pour incubation environ 500 μ L de solution de fibronectine (Sigma) à 5 μ g/mL dans du DMEM, pendant 3 heures à température ambiante. Cela permet aux molécules de fibronectine de s'adsorber à la surface du verre. La fibronectine est un composant de la matrice extracellulaire reconnu par les intégrines de la membrane des cellules, et permet donc leur ancrage spécifique.

On décolle ensuite les cellules de la boîte de culture à la trypsine-EDTA, et on les ensemence sur la lamelle, dans une petite boîte de Pétri contenant 2 mL de DMEM. On utilise entre 50 et 100 μ L de suspension cellulaire, selon la densité dans la boîte de culture de départ.

2.2.3.2 Adhésion des billes aux cellules

Au moment de l'expérience, on met en contact les billes et les cellules : on ajoute environ 50 μ L de la suspension diluée (de façon à avoir entre 1 et 5 billes par cellule, environ) sur la lamelle contenant les cellules. On laisse incuber 15 minutes à 37°C : les billes sédimentent au fond de la boîte, et s'ancrent aux cellules sur lesquelles elles tombent. Puis on rince plusieurs fois avec du DMEM complet, de façon à éliminer les billes non liées aux cellules.

Enfin, on fixe la lamelle à une lame de verre *via* un espaceur souple (Gene Frame[®], VWR), ce qui délimite une chambre ayant une contenance de 65 μ L. Cette chambre est remplie de DMEM non fluorescent (pour ne pas perturber les observations en épifluorescence) supplémenté à 10% de SVF et tamponné à l'HEPES⁸ (1,5 mM).

⁸L'HEPES, de formule $C_8H_{18}N_2O_4S$, est un tampon organique permettant de maintenir le pH d'une solution à valeur physiologique, aux alentours de 7,5.

2.3 Manipulations à force imposée

2.3.1 Mobilité de l'échantillon par rapport au piège optique

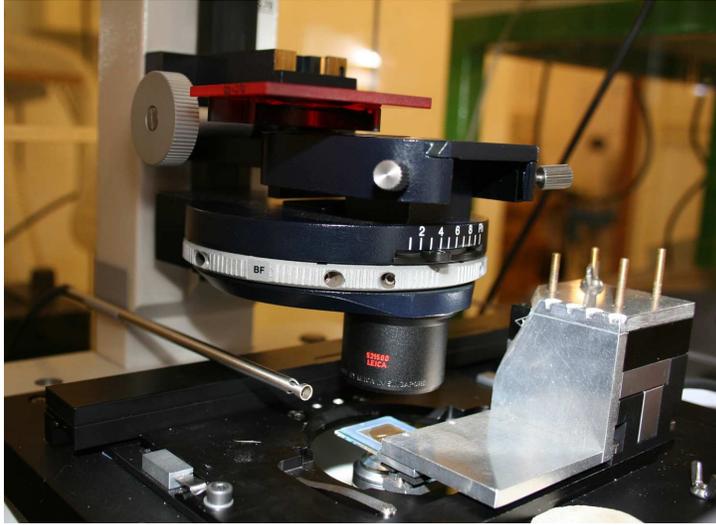


FIG. 2.12 – Photo de la chambre expérimentale (avec l'espaceur bleu), montée sur la cale piézo au moyen d'une pièce métallique d'adaptation

Pour déplacer l'échantillon dans les 3 directions, on dispose, outre la crémaillère et la platine du microscope, de la cale piézoélectrique décrite au 2.1.2. On y fixe donc notre chambre expérimentale, comme on le voit sur la photo de la figure 2.12. La pièce d'adaptation étant relativement lourde, la cale piézoélectrique voit sa bande passante diminuer : sa fréquence de coupure est de l'ordre de 50 Hz.

Par ailleurs, pour éviter les dérives mécaniques dues aux vibrations, au jeu dans les diverses pièces mécaniques, et aux gradients thermiques qui existent malgré la thermalisation, on fixe la platine et la molette de mise au point à l'aide de pinces. On place aussi la cale piézoélectrique en position "Servo Off", pour éviter qu'elle compense les charges mécaniques qu'elle supporte par une dérive.

2.3.2 La rétroaction

Une fois trouvée une cellule sur laquelle au moins une bille est ancrée à proximité d'un bord (afin de minimiser la traversée du corps cellulaire par le laser), et qui soit, pour une expérience en épifluorescence, fluorescente *mais pas trop* (cf. 2.4.1), on veut appliquer sur cette cellule, *via* la bille, une force constante. Étant donnée la dépendance monotone de la force de piègeage avec la distance, cela revient à maintenir la bille à distance constante du centre du piège.

2.3.2.1 Principe

À $t = 0$, on impose au piège un saut d'une distance R_0 dans la direction θ_0 tangente à la cellule, de façon à déplacer la bille suivant une ligne de niveau de la cellule, et à éviter ainsi qu'elle change de plan selon Z . En effet, on ne dispose pas de rétroaction selon l'axe perpendiculaire à la lamelle, et un changement de focalisation de la bille entraîne une modification de la force et une mauvaise évaluation de sa position, par modification de son image sur le détecteur.

On souhaite par la suite que la bille reste en $(0; 0)$, afin que le vecteur bille-piège reste à la valeur $\vec{R}_0 = (X_0 = R_0 \cos \theta_0 ; Y_0 = R_0 \sin \theta_0)$. Cela correspond à une force que l'on évalue à l'aide des courbes de calibration à hauteur $5 \mu\text{m}$ ⁹ :

$$F_0 = \sqrt{F_X^2 + F_Y^2} = P_{opt} \sqrt{(0,165X_0 + 0,039X_0^2) + (0,200Y_0 + 0,027Y_0^2)} \quad (2.8)$$

Cette formule ne correspond pas à la *vraie* valeur de la force dans la direction θ_0 , c'est une interpolation à l'aide des calibrations dont on dispose, qui sont uniquement selon X et Y .

On mesure la position de la bille sur la diode à quadrant, et on renvoie vers la carte d'acquisition les signaux analogiques V_X et V_Y . Ces signaux sont alors échantillonnés à 180 Hz, et traités par le programme LabVIEW décrit ci-après. Les signaux de correction δW_X et δW_Y sont envoyés sur la cale piézoélectrique à cadence de 45 Hz, et induisent un déplacement de la cale $-\delta\vec{R} = (\delta X; \delta Y)$. C'est l'opposé de ce déplacement, $\delta\vec{R}(t)$, qui nous donne la déformation de la cellule sous la bille au cours du temps. Le diagramme de la figure 2.13 présente les différents éléments de cette boucle de rétroaction. Le calcul de la fonction de transfert du PID est effectué numériquement, et non analogiquement comme dans [109].

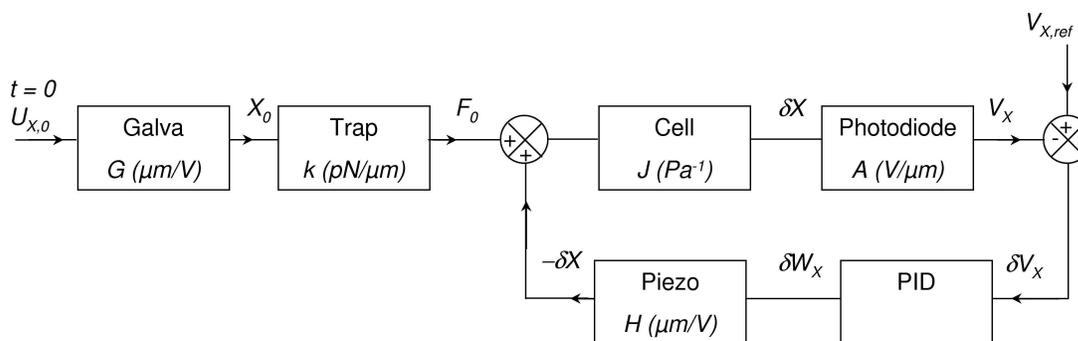


FIG. 2.13 – Diagramme de la boucle de rétroaction (pour la voie X seulement) permettant de maintenir une force constante sur la bille. Les fonctions de transfert des différents éléments sont indiquées, avec leurs unités. On pourrait tracer le même diagramme pour la voie Y.

2.3.2.2 La partie numérique de la rétroaction

Le choix d'une boucle de rétroaction numérique présente, par rapport à la solution analogique, des avantages et des inconvénients. L'inconvénient majeur réside dans l'échantillonnage nécessaire à l'acquisition. Cela suppose une discrétisation du signal, qui introduit un bruit dans la mesure de position de la bille. On pallie cet inconvénient en réalisant une moyenne sur les signaux V_X et V_Y au cours de l'acquisition (moyenne sur 4 points en général). Un autre inconvénient est la limitation dans la fréquence d'acquisition, due au temps de calcul dans la boucle. Cela n'est cependant pas le facteur limitant dans la rapidité de la rétroaction : la fréquence de coupure de la cale piézoélectrique est bien plus basse, de l'ordre de 50 Hz . C'est pourquoi on se limite finalement à une fréquence de rétroaction de 45 Hz . A l'inverse, l'avantage majeur d'une boucle numérique, est la facilité avec laquelle on peut changer tous les paramètres de la rétroaction (les facteurs P, I et D, les fonctions de transfert des différents éléments...). Evidemment, cela permet aussi une synchronisation de divers appareils : on contrôle ainsi les miroirs galvanométriques qui opèrent le saut du piège à $t = 0^-$, et le déplacement de la cale piézoélectrique dès $t = 0^+$.

⁹On prend comme référence les courbes de calibration à $h = 5 \mu\text{m}$ car la hauteur du bord des cellules est de cet ordre.

On utilise pour cela un programme réalisé à l'aide du logiciel LabVIEW (National Instruments, USA).

On commence (cf. 2.1.2) par mesurer rapidement les valeurs des fonctions de transfert $\mu\text{m} \rightarrow V$ de la diode, à l'éclairement choisi, et dans la configuration exacte dans laquelle va se dérouler le reste de l'expérience (c'est-à-dire pour une bille ancrée sur la cellule à mesurer). On fait effectuer à la cale, en l'absence du laser de piègeage, quelques oscillations d'amplitude contrôlée. On mesure l'amplitude des oscillations des signaux V_X et V_Y sortant de la diode à quadrant, et on en déduit les valeurs de A et A' ($V/\mu\text{m}$).

Puis on lance le piège et le programme de rétroaction : on commence par mesurer les tensions résiduelles $V_{X,ref}$ et $V_{Y,ref}$ en l'absence de force (piège en $(0,0)$), car ces tensions sont très dépendantes de la géométrie précise de la cellule sur laquelle on réalise la mesure. Ce sont ces tensions qui seront les valeurs de référence pour contraindre la position de la bille.

Puis (à $t = 0$) on commande un saut du piège en (X_0, Y_0) , et la cellule se déforme petit à petit sous l'effet de la force. Les tensions de sortie de la diode s'éloignent alors de leurs valeurs de référence, et on effectue alors la correction numérique sur les valeurs $\delta V_X = V_{X,ref} - V_X$ et $\delta V_Y = V_{Y,ref} - V_Y$. Le principe de la correction PID (proportionnelle, intégrale et dérivée) est d'obtenir une boucle à la fois stable (rôle de P), précise (rôle de I) et rapide (rôle de D). Le signal de sortie est alors, par exemple selon X :

$$\delta V'_X = P\delta V_X + I \int \delta V_X dt + D \frac{d\delta V_X}{dt} \quad . \quad (2.9)$$

On prend en pratique $D = 0$, car ce paramètre a tendance à entraîner une oscillation de notre système ; la rapidité obtenue ainsi est déjà suffisante. On prend pour les autres paramètres $P = 0.05$ et $I = 5, 0$ (aussi bien en X qu'en Y).

On envoie ensuite à la cale piézoélectrique un signal de commande $\delta W_X = \frac{1}{AH} \delta V'_X$, et de même selon Y , où H est la fonction de transfert en $V/\mu\text{m}$ de la cale piézoélectrique.

2.3.3 Pourquoi manipuler à force constante ?

L'action d'une force constante sur un matériau permet de mesurer sa fonction de fluage, que l'on a définie au 1.3.1. A l'aide de cette fonction de fluage, on peut remonter à la mesure des paramètres mécaniques (module viscoélastique G_0 en particulier).

Réaliser cette mesure sur une cellule *in vitro* permet de mimer une situation physiologique où la cellule serait soumise à une force par un élément de son environnement, tout en contrôlant finement cette force. On pourra attribuer les effets ainsi engendrés à un niveau de force donné en fonction d'un temps d'application connu. De plus, à l'inverse des mesures en régime sinusoïdal, on sonde ici la cellule sur un domaine continu de fréquences. Donc on sollicite l'ensemble des temps caractéristiques qui interviennent dans sa réponse mécanique et physiologique (des temps très courts aux temps plus longs, jusqu'à la durée totale du palier de force).

Cependant, on est limité dans l'application de cette force par la durée pendant laquelle on a accès à la mesure de la fonction de fluage de la cellule. En effet, il faut tout d'abord rester dans le domaine de déformation linéaire : si on applique la force pendant trop longtemps, on risque de trop déformer la cellule et de sortir de son domaine de réponse linéaire.

Ensuite, il faut que la cellule se comporte, pendant le temps de mesure, comme un matériau relativement passif. On peut donc réaliser cette mesure de façon précise sur 10 à 50 sec, mais ensuite des phénomènes actifs dans la cellule (migration, flux d'actine tendant à ramener progressivement la bille vers le noyau...) et des dérives mécaniques du système font que, si la force est bien maintenue constante, on ne mesure pas pour autant la fonction de fluage du matériau. On a donc choisi une durée de 150 s pour le palier de force, puis on laisse la cellule relaxer pendant à peu près la même durée. Puis on applique un deuxième palier de force, et on laisse la cellule

relaxer etc. On a donc accès à l'évolution de la réponse cellulaire à l'application de la force, au cours du temps.

Cela permet aussi de voir comment la cellule s'adapte à cette force : on mesure pour cela la répartition d'actine dans la cellule pendant l'application de la force, car le cytosquelette d'actine est un facteur déterminant dans la rigidité et la contractilité cellulaires. Ces mesures en fluorescence imposent des contraintes, présentées ci-après, qui ont en partie guidé notre mode opératoire.

2.4 Fluorescence : mise en oeuvre, détection, et principe des mesures

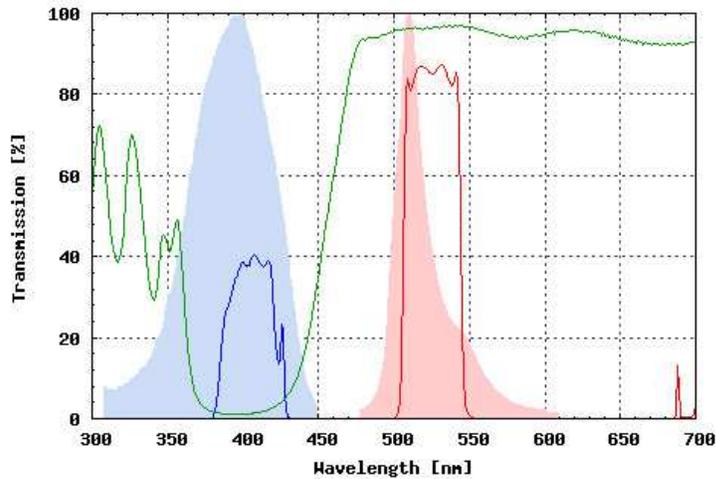


FIG. 2.14 – Les spectres d’excitation et d’émission de la GFP (courbes pleines bleu clair et rose), et les transmittances des éléments du jeu de filtres en fonction de la longueur d’onde : filtre d’excitation (bleu), miroir dichroïque (vert), filtre d’émission (rouge) [D’après <https://www.omegafilters.com>].

2.4.1 Transfection des cellules

Pour les expériences en épifluorescence, on transfecte environ 5 heures après ensemencement les cellules¹⁰ à l’aide d’un plasmide codant pour de l’actine couplée à un fluorophore : la GFP. Comme on le voit sur les spectres de la figure 2.14, ce fluorophore est excité dans le bleu ($\lambda_{exc} = 395 \text{ nm}$) et réémet dans le vert ($\lambda_{em} = 509 \text{ nm}$). La figure 2.15 montre le résultat de cette transfection sur une cellule.

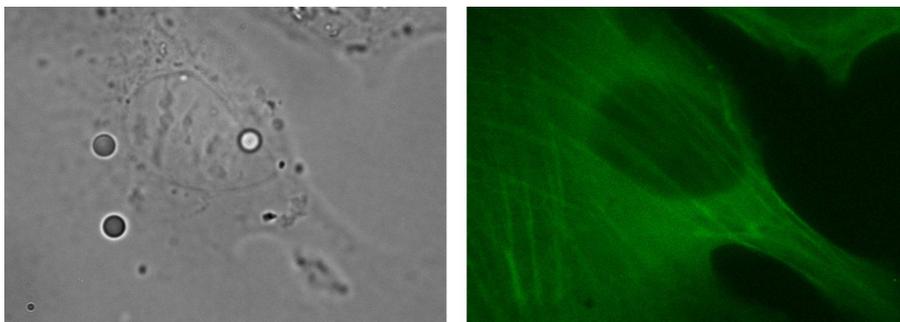


FIG. 2.15 – Une cellule C2C12 transfectée à l’aide du plasmide actine-GFP vue en transmission (gauche) et en épifluorescence (droite). On voit bien les fibres de stress présentes dans la cellule.

Le plasmide, à $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ nous a été fourni par l’équipe de Maïté Coppey (Institut Jacques Monod, Paris, France), et on le dilue ensuite à $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ pour plus de commodité. Pour faire

¹⁰On n’a réalisé des expériences en épifluorescence que sur les C2C12, qui semblaient mieux résister à la transfection.

entrer le plasmide dans la cellule puis le noyau afin que l'actine-GFP soit exprimée, on utilise un kit de transfection à la nanofectine (PAA), en suivant les indications fournies par le fabricant. Après optimisation des rapports ADN/transfectant, on utilise le protocole suivant, pour une lamelle 22×22 mm dans une boîte de Pétri de diamètre 35 mm (contenance : 2 mL) :

| | | |
|---|---|--------|
|  | Préparer deux micro-eppendorfs stériles contenant chacun 50 μL de NaCl à 150 mM ("nanofectin diluent") | |
|  | Dans l'éppendorf n°1 : ajouter 0,75 μg de plasmide, et cisailier doucement | |
|  | Dans l'éppendorf n°2 : ajouter 3 μg de nanofectine, et cisailier doucement | |
|  | Introduire le contenu de l'éppendorf n°2 dans l'éppendorf n°1 | |
|  | Attendre 20 à 30 min | 20-30' |
|  | Pendant ce temps, s'assurer que la boîte de Pétri contenant la lamelle contient 1 mL de DMEM, et préparer un eppendorf avec 900 μL de DMEM | |
|  | Verser le contenu de l'éppendorf de nanofectine+plasmide dans celui de DMEM, et cisailier doucement | |
|  | Verser le contenu total sur les cellules dans la boîte. Agiter doucement pour homogénéiser | |
|  | Observation à partir de 20h après. On peut rincer la nanofectine au bout de 15h environ (limite la toxicité) | 15 h |

Le taux de transfection (rapport du nombre de cellules exprimant le plasmide au nombre total de cellules) obtenu avec ce protocole sur les C2C12 est approximativement de 20%. Le niveau d'expression du plasmide variant d'une cellule à l'autre, on choisira, pour nos expériences, les cellules dont le niveau de fluorescence n'est pas trop élevé. Tout d'abord car on souhaite ne pas trop s'éloigner des conditions physiologiques *normales* (c'est-à-dire en l'absence de transfection) et que plus les cellules sont fluorescentes, plus elles ont exprimé d'actine en plus de l'actine *normalement* présente dans leur cytoplasme. Ensuite car on veut pouvoir observer une augmentation dans l'intensité de fluorescence détectée, sans risquer de saturer les images.

2.4.2 Prise d'image : contraintes en tous genres

Le schéma de la figure 2.16 résume l'essentiel de notre dispositif : les contraintes de positionnement des divers éléments sont multiples.

Le laser entre sous l'objectif par le biais d'un miroir chaud, et arrive sur l'échantillon, où une partie du faisceau est transmise, une autre partie rétrodiffusée. Mais cette dernière est, en grande partie, réfléchi au niveau du miroir chaud, et ne peut donc pas être utilisée comme faisceau de détection sur la diode.

Juste sous ce miroir chaud se trouve le jeu de filtres pour la fluorescence (XF 100, Omega Optical) : le miroir dichroïque du schéma représente l'ensemble {filtre d'excitation + dichroïque + filtre d'émission} (le filtre d'excitation est situé en amont, le filtre d'émission juste en-dessous). Les spectres de leurs coefficients de transmission en fonction de la longueur d'onde sont représentés sur la figure 2.14. On voit donc que le filtre d'émission ne laisse passer qu'une faible bande entre 500 et 550 nm.

Sous les cubes de filtres se trouve une lame séparatrice qui envoie une partie du faisceau vers la sortie de la diode à quadrant. On utilise l'illumination standard du microscope (lampe +

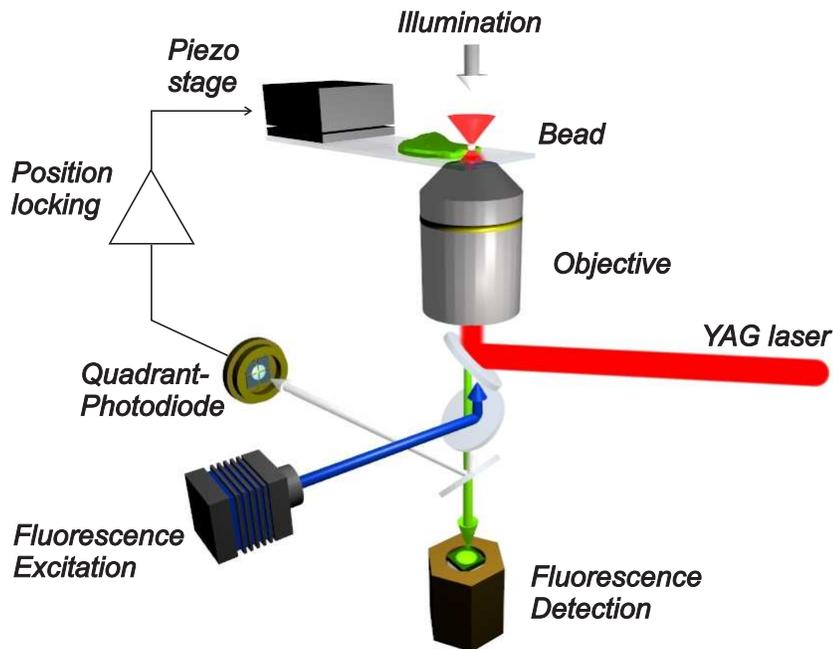


FIG. 2.16 – Vue en 3D des trajets des faisceaux à différentes longueurs d’onde : laser infra-rouge (en rouge), excitation de fluorescence (en bleue), émission de fluorescence (en vert), illumination (en blanc).

condenseur) pour recueillir du signal sur la diode (cf. 2.1.2). La raison majeure ayant poussé à l’utilisation de la lumière transmise plutôt que du laser IR pour la détection de position est la présence d’anneaux de diffraction engendrés par la présence de la bille près du point de convergence du faisceau laser. Ces anneaux changent d’allure en fonction de la position de la bille dans le plan focal, et quand la bille s’éloigne du centre du piège, la répartition d’intensité lumineuse sur les 4 quadrants de la diode ne varie pas de façon monotone avec la distance. Et on souhaite justement travailler à force assez grande, donc avec la bille relativement loin du centre du piège.

On comprend alors qu’il est presque impossible d’observer la fluorescence de la GFP tout en mesurant du signal sur la diode. En effet, pour ce faire, il faut disposer avant le condenseur un filtre rouge (ne laissant passer que les longueurs d’onde supérieures à 550 nm), de façon à ne pas exciter la GFP et à ne pas avoir de lumière parasite sur la caméra (sensible) de détection de la fluorescence. Mais ces longueurs d’onde sont justement coupées par le filtre d’émission, et ne parviennent donc pas jusqu’à la diode.

Une solution à ce problème est de déplacer le filtre d’émission hors du cube prévu à cet effet, et de le placer juste avant la caméra. Ceci a cependant le fort désavantage de ne plus rendre les cellules fluorescentes visibles à l’œil, ce qui complique fortement la recherche d’une cellule fluorescente et ayant une bille ancrée sur un de ses bords.

C’est pourquoi on a finalement choisi de réaliser les mesures de fluorescence entre les applications de force, de façon à pouvoir enlever le cube de filtres pendant la mesure mécanique, qui nécessite un fort signal lumineux sur la diode (et en plaçant effectivement un filtre rouge avant le condenseur). On a donc des séquences de paliers de force dont chacun est suivi de la prise d’images en fluorescence, pendant que la cellule relaxe. Ceci sera détaillé au chapitre 4.

Les images sont acquises sur une caméra CCD de grande sensibilité (Coolsnap ES, Roper Scientific), commandée par ordinateur grâce à un plug-in sous ImageJ. Celui-ci pilote l’ouverture

et la fermeture d'un obturateur (Uniblitz) placé entre la lampe d'excitation et le microscope, de façon à contrôler le temps d'exposition des cellules. Le plug-in contrôle aussi le déplacement en Z de la cale piézoélectrique *via* un module de sortie analogique (PMD-1208LS, Measurement Computing). Ceci permet d'acquérir une pile d'images séparées d'un μm environ selon Z et ainsi de choisir, pour l'analyse des images, des plans situés au niveau de la bille et en-dessous.

Chapitre 3

Mécanique cellulaire : caractérisation et évolution sous contrainte

Ce chapitre présente tout d'abord les caractéristiques mécaniques mesurées par application locale d'une force constante sur plusieurs types cellulaires. La fonction de fluage et les paramètres mécaniques qui en sont extraits pourront être comparés aux mesures réalisées précédemment au laboratoire : en régime sinusoïdal à l'aide de pinces optiques [9, 10] et en régime de fluage sur cellules entières par étirement uniaxial [30].

On examine ensuite l'évolution de cette réponse mécanique suite à l'application répétée d'une force. En effet, comme décrit au 1.2.4 et au 1.3.4, l'adaptation à long terme des forces exercées par la cellule et de sa rigidité en fonction des contraintes qui lui sont appliquées, est un phénomène désormais assez bien caractérisé [103, 85, 27]. Mais la dynamique de cette adaptation n'est pas encore clairement élucidée. On a donc soumis les cellules non plus à un seul palier de force, mais à une série de paliers successifs, et mesuré pour chacun d'eux la fonction de fluage. On a alors pu caractériser la dynamique de rigidification des cellules en réponse à l'application d'une force, et mesurer un temps de renforcement τ_G pour une cellule A549 et un ensemble de cellules C2C12.

3.1 Mesure locale de la fonction de fluage d'une cellule

3.1.1 Relations contrainte/déformation dans les expériences de pinces optiques

Dans nos expériences de pinces optiques, on mesure à tout instant la force F_{trap} exercée sur la bille par le piège (par la mesure de la position r de la bille par rapport au centre du piège) ainsi que le déplacement δR de la cellule par rapport à la bille ($\delta R = R - r$, où R est le déplacement, contrôlé, de la cale piézoélectrique). Mais pour mesurer une fonction de fluage ou un module viscoélastique, il faut connaître la relation entre la contrainte appliquée et la déformation résultante. Nous avons donc besoin d'un modèle mécanique permettant de relier le déplacement cellule-bille δR à la déformation du milieu cellulaire, et la force F_{trap} à la contrainte appliquée sur la cellule. Si on veut tenir compte de tout ce que l'on connaît "réellement" sur les déformations cellulaires, le problème est insoluble : bien sûr, les résultats vont dépendre de la géométrie du problème : angle d'enfoncement 2θ de la bille dans la cellule (cf. figure 3.1.C), hauteur h de cellule contenue sous la bille, et même topologie de la cellule au niveau du contact. Puis il faudrait prendre en compte le fait que la bille est ancrée *via* un certain nombre de points d'attache. Enfin, il faudrait connaître la rigidité mécanique de ces ancrages, afin de la prendre en compte dans le calcul permettant de remonter à la viscoélasticité du reste du milieu cellulaire... Sans compter, comme on l'a déjà évoqué, la non-homogénéité mécanique de la cellule. D'où le

fait que nos mesures doivent être prises comme une estimation locale de la viscoélasticité de la cellule sondée.

La première approximation consiste donc à considérer que la bille est ancrée de façon homogène au niveau de sa surface de contact avec la cellule. On néglige également la contribution mécanique des adhésions bille-cellule. Ces deux approximations reviennent à prendre une surface d'adhésion égale à la surface immergée de la bille dans la cellule ($2\pi a^2(1 - \cos\theta)$), et à dire que celle-ci est infiniment rigidement liée au milieu cellulaire sous-jacent, de sorte que l'on sonde vraiment la viscoélasticité du cytosquelette. Cette seconde approximation se justifie par le fait qu'il semble avoir été montré que les adhésions focales, formées au niveau des contacts RGD-intégrines, ne jouent pas de rôle dans la viscoélasticité cellulaire mesurée [18]. Le nombre de ces adhésions spécifiques n'est certainement pas très élevé (et donc la cellule est certainement sondée par un nombre de liens discret, et non par une surface homogène), mais on peut supposer que si la bille est ancrée suffisamment profondément dans la membrane (comme c'est ce que l'on observe sur les images en transmission), des adhésions non spécifiques viennent compléter le nombre réduit des liens aux intégrines et procure une grande surface de contact effective entre la bille et le cytosquelette de la cellule sondée.

Nous allons développer les aspects concernant la géométrie du problème. Là encore, des approximations seront nécessaires : on va considérer la cellule comme un milieu viscoélastique semi-infini. En effet, il serait impossible de tenir compte de la topologie exacte de la cellule au niveau de la bille afin de calculer analytiquement la déformation induite dans le milieu. Même en considérant la cellule comme un milieu semi-infini viscoélastique et homogène, le calcul analytique exact n'existe pas. Nous allons donc présenter les approximations effectuées afin d'obtenir une expression approchée du facteur géométrique que nous prendrons en compte pour analyser nos expériences.

Une autre approche, mais que nous n'avons pas développée, consiste à utiliser des simulations numériques afin de calculer l'allure du champ de déformation et de contrainte dans ce genre de problèmes [67, 92]. Cela pourrait en effet conduire à une meilleure estimation du facteur géométrique $f(\theta, h)$ prenant en compte l'enfoncement de la bille et la hauteur de cellule sous bille.

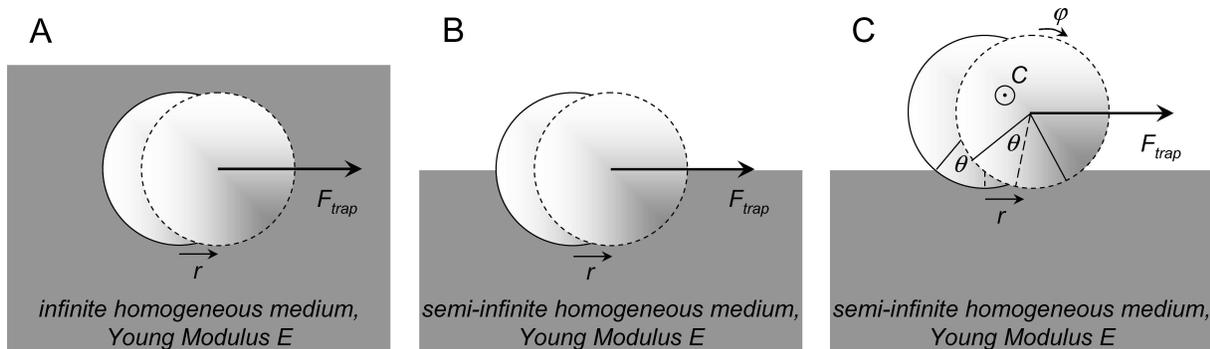


FIG. 3.1 – Schéma du modèle mécanique utilisé pour obtenir les relations contrainte-déformation à partir des expériences de pinces optiques : cas d'une bille totalement immergée (A), à moitié immergée (B), et partiellement immergée d'un demi-angle θ (C).

On considérera pour les expressions qui suivent, établies précisément dans l'article de Laurent et al. [74], un milieu homogène, incompressible et immobile dans le référentiel du laboratoire. La bille est soumise à la force exercée par le piège, $F = F_{trap}$, et transmet cette force au milieu. Son déplacement algébrique par rapport au milieu est alors noté r , comme indiqué sur la figure 3.1.

Dans un cas où le milieu ne serait pas immobile, il faudrait remplacer r par $r - R = -\delta R$.

3.1.1.1 Cas d'un matériau élastique, de module d'Young E

Sphère immergée dans un milieu élastique infini Le calcul de la force de rappel exercée par le milieu élastique sur la sphère nécessite une approximation. On suppose que le déplacement de la sphère de rayon a est le même que le déplacement moyen du milieu sans sphère mais soumis à la même force appliquée en O . Le champ de déformation au point M à distance a du centre de la sphère ($\overrightarrow{OM} = a\overrightarrow{u}_r$) vaut alors :

$$\overrightarrow{u} = \frac{3}{8\pi E} \frac{\overrightarrow{F} + (\overrightarrow{F} \cdot \overrightarrow{u}_r) \overrightarrow{u}_r}{a} . \quad (3.1)$$

La moyenne sur la surface de la bille donne un déplacement global r , dans la direction de la force appliquée F :

$$r = \frac{1}{2\pi a E} F \quad (3.2)$$

Sphère à moitié immergée dans un milieu élastique semi-infini Le champ de déformation est plus complexe, mais l'approche est la même, et le calcul donne alors [74] :

$$r = \frac{9}{8\pi a E} F \quad (3.3)$$

Sphère partiellement immergée dans un milieu élastique semi-infini Dans le cas où la sphère n'est immergée que d'un angle $\theta < \pi/2$ dans le milieu, la déformation a deux origines. Une première déformation r' existerait seule, si la force était appliquée en O' , projection de O sur le plan de l'interface avec le milieu :

$$r' = \frac{9}{8\pi a \sin^3 \theta E} F \quad (3.4)$$

Et comme la force n'est pas exercée en O' mais en O , il y a apparition d'un couple $C = aF \cos \theta$, qui fait tourner la bille d'un angle ϕ (cf. figure 3.1.C), valant¹ :

$$\phi = \frac{3}{4\pi a^3 \sin^3 \theta E} C \quad (3.5)$$

ce qui provoque un déplacement de la bille : $r'' = a\phi$. D'où finalement un déplacement total :

$$r = r' + r'' = \frac{3}{4\pi a E} \left(\frac{3}{2\sin^3 \theta} + \frac{\cos \theta}{\sin^3 \theta} \right) F . \quad (3.6)$$

3.1.1.2 Cas d'un fluide visqueux, de viscosité η

Sphère immergée dans un milieu visqueux infini En régime laminaire et stationnaire, la bille évolue à vitesse $v = \dot{r}$, fixée par la force de Stokes :

$$v = \frac{1}{6\pi a \eta} F . \quad (3.7)$$

Sphère à moitié immergée dans un milieu visqueux semi-infini La force de Stokes exercée par le milieu sur la sphère est alors divisée par deux, donc à force donnée, la vitesse de la bille est double.

¹ ϕ est calculé en remplaçant l'action du couple par l'action de deux forces opposées et de points d'applications très proches par rapport au rayon de la bille, avec les mêmes approximations que précédemment

Sphère partiellement immergée dans un milieu visqueux semi-infini Si l'angle θ est faible, on considère alors juste le déplacement d'un petit disque de rayon $a \sin \theta$ à la surface du fluide. Sa vitesse vaut alors : $v = \frac{3}{16 a \sin \theta \eta} F$.

3.1.1.3 Cas d'un milieu viscoélastique, de module viscoélastique $G(\omega)$

Pour un milieu viscoélastique, comme le milieu cellulaire, on prendra comme facteur géométrique celui calculé dans le cas purement élastique, étant donné que le module viscoélastique G est défini comme une extension du module d'Young E . Pour une déformation $\delta R = r - R$ de la cellule, cela donne donc, en représentation fréquentielle (cf. 1.3.1) :

$$F(\omega) = 2\pi a f(\theta) G(\omega) \delta R(\omega) \quad \text{avec} \quad f(\theta) = \frac{2}{3} \frac{1}{\left(\frac{3}{2 \sin \theta} + \frac{\cos \theta}{\sin^3 \theta}\right)} \quad (3.8)$$

et en régime de fluage :

$$J(t) = 2\pi a f(\theta) \frac{\delta R(t)}{F_0} \quad . \quad (3.9)$$

Etant données les hypothèses nécessaires à l'établissement de cette formule, on évalue à 20% au minimum l'erreur commise² sur la détermination absolue de $G(\omega)$ ou de $J(t)$ [74]. Cela n'a en revanche aucune influence respectivement sur les dépendances fréquentielle et temporelle de ces fonctions.

3.1.2 Exemple de mesure d'une fonction de fluage

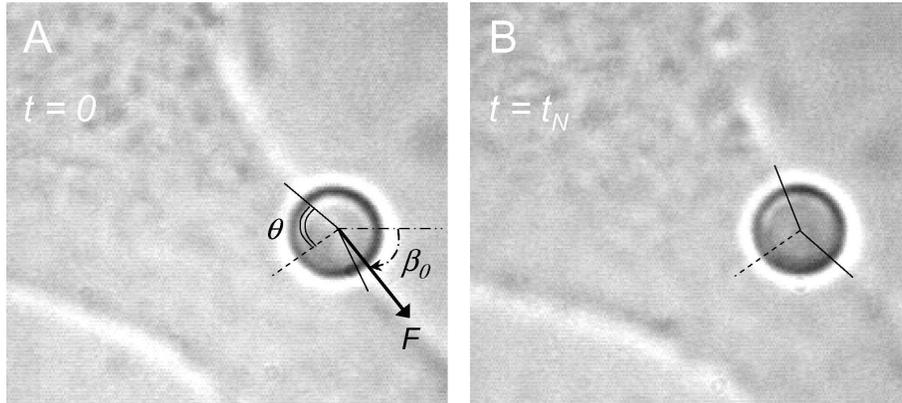


FIG. 3.2 – Image d'une cellule C2C12 en transmission : avant le début de l'expérience, avec la bille située près du bord (A) ; après l'expérience, avec la bille un peu plus enfoncée dans la cellule (B).

Lors d'une expérience de fluage, on applique une force constante sur une bille ancrée à la surface d'une cellule. La figure 3.2.A montre une cellule ayant une bille ancrée près d'un de ses bords. On essaie en effet, quand c'est possible, de choisir des billes dans cette position de façon à éviter de traverser la cellule avec le laser. On peut alors mesurer de façon approximative, sur l'image, l'angle d'enfoncement θ de la bille dans la cellule. Cependant, très souvent dans le

²Les travaux de modélisation aux éléments finis de Ohayon et coll., en cours de réalisation, cherchent à déterminer précisément l'influence de la hauteur réelle de cellule sous la bille ainsi que de l'angle d'enfoncement θ sur la valeur du module élastique. Il semblerait qu'aux petits angles d'enfoncement et aux petites hauteurs sous bille, notre calcul surestime G_0 d'un facteur deux environ.

cours d'une expérience, la bille est ramenée vers l'intérieur de la cellule, comme on le voit sur la figure 3.2.B. Cela est vraisemblablement dû à l'action des moteurs qui exercent des forces contractiles. Ce phénomène est probablement relié à la rigidification que nous décrirons plus loin (cf. 3.3) : cette activité de la cellule tendant à ramener la bille vers l'intérieur est d'autant plus marquée que la cellule est en train de se renforcer mécaniquement. Quand la bille est positionnée sur une sorte de lamellipode, ce peut être aussi le flux d'actine sous-jacent à la membrane qui la ramène vers le noyau, mais sa vitesse de déplacement est alors plus élevée (de l'ordre de $10^{-2} \mu\text{m.s}^{-1}$). La bille finit parfois par être située complètement sur le dessus de la cellule, et, par défaut, on évalue l'angle d'enfoncement à $\theta = 90$ degrés. On choisit la direction d'application de la force tangentielle au bord cellulaire le plus proche, de façon à essayer de rester le long d'une ligne de niveau, et éviter que la bille ne se défocalise. Car si elle n'est plus exactement dans le plan de piègeage, la valeur de la force est différente (et inconnue). De plus, la rétroaction ne fonctionne alors plus correctement car l'image de la bille sur le détecteur est modifiée.

Comme évoqué au 2.1.2.3, avant le début de l'expérience, on réévalue, pour chaque bille liée à une cellule, la valeur des coefficients de proportionnalité A et A' permettant de connaître la tension délivrée par la diode en fonction du déplacement de la bille selon X et Y . En effet, la présence du bord de la cellule modifie l'image de la bille sur le détecteur, et donc la réponse en tension de ce dernier.

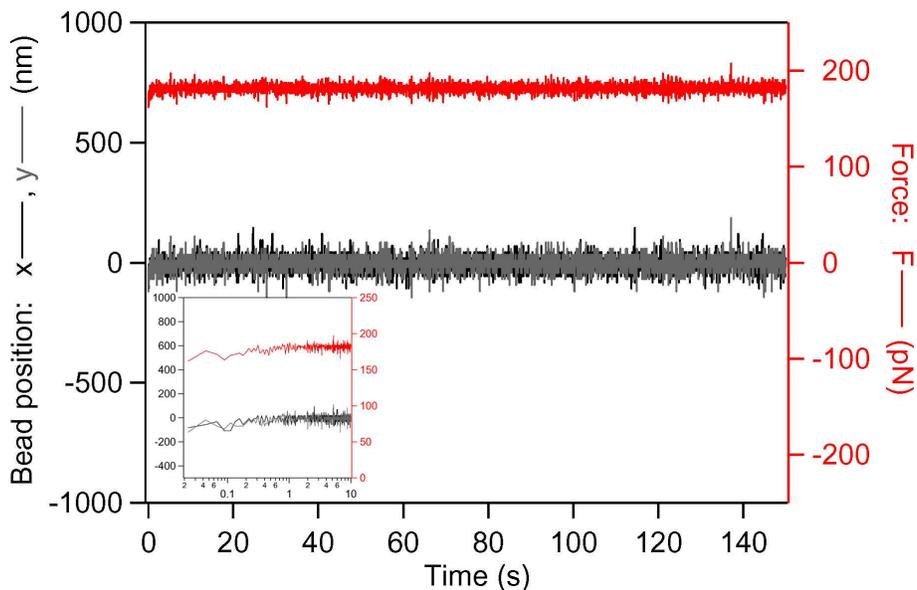


FIG. 3.3 – Mesures de la position de la bille $x(t)$ (courbe noire) et en $y(t)$ (courbe grise), et force calculée $F(t)$ (courbe rouge) au cours d'une expérience de fluage sur une cellule C2C12. En insert, le même graphique en échelle semi-log (pour $t < 10$ s) : on voit que la force s'établit rapidement (dès $t \leq 0,2$ s) à la valeur de contrôle.

À $t = 0$, on déplace le laser d'une distance R_0 dans la direction angulaire β_0 à l'aide des miroirs galvanométriques, puis on maintient la force constante grâce à la boucle de rétroaction : on mesure en temps réel les positions $x(t)$ et $y(t)$ de la bille par rapport à l'origine $(0,0)$ et on les asservit à cette position. La force vaut alors $\vec{F}(t) = \vec{F}_0 - (F_x(x(t))\vec{u}_x + F_y(y(t))\vec{u}_y) \simeq \vec{F}_0$. La figure 3.3 montre un exemple de mesure de $x(t)$, $y(t)$ et $F(t)$.

Afin de maintenir la bille en $(x = 0, y = 0)$, il faut déplacer la cale piézoélectrique de $X(t), Y(t)$ afin de suivre le fluage de la cellule. Le déplacement de la cellule par rapport à la bille

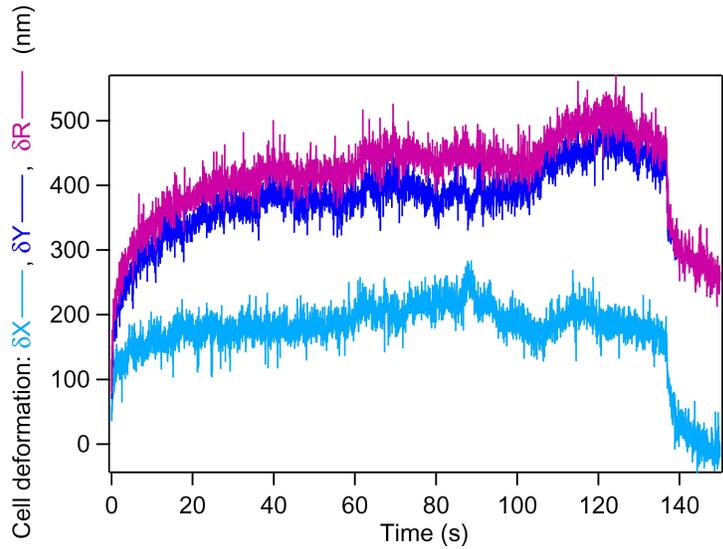


FIG. 3.4 – Mesures des déformations cellulaires pendant la même expérience de fluage : $\delta X(t)$ (bleu clair), $\delta Y(t)$ (bleu foncé), $\delta R(t)$ (violet). La fonction de fluage de la cellule est correctement évaluée entre 0, 2 et 40 s. Vers 135 s, le piège est coupé et la bille relaxe vers sa position d’origine.

au cours de l’expérience vaut donc :

$$\delta R(t) = \sqrt{\delta X^2 + \delta Y^2} = \sqrt{(x(t) - X(t))^2 + (y(t) - Y(t))^2} \quad (3.10)$$

et la mesure de la fonction de fluage est donnée par le rapport entre ce déplacement et la force F_0 appliquée, moyennant le coefficient géométrique discuté plus haut : $J(t) = 2\pi a f(\theta) \frac{\delta R(t)}{F_0}$. La figure 3.4 montre l’évolution des fonctions $\delta X(t)$, $\delta Y(t)$ et $\delta R(t)$ au cours de la même expérience. Sur cet exemple, de $t = 0$ à $t = 40$ s environ, la cellule se déforme sous l’effet de la contrainte appliquée et on peut mesurer la fonction de fluage correctement. A partir de $t = 40$ s, on peut voir que l’évolution n’est plus toujours monotone : en effet, la cellule a alors un comportement actif : elle rappelle la bille vers le noyau (et cette force qu’elle exerce sur la bille n’est pas nécessairement dans la même direction que F_0), elle se déplace... La force appliquée continue à rester constante (cf. figure 3.3), mais on ne mesure plus la fonction de fluage de la cellule. Vers $t = 135$ s sur cet exemple, on a coupé la force, et la bille relaxe alors vers sa position d’origine, mais sans y revenir totalement³.

Quand on trace la fonction de fluage d’une cellule, on se restreint donc à une durée de 50 sec au maximum après le début de l’expérience. $J(t)$, toujours pour la même expérience, est tracé en coordonnées log-log sur la figure 3.5 : on s’est restreint à l’intervalle 0,02–40 s, sur lequel on peut ajuster la fonction de fluage par une loi de puissance $J(t) = A t^\alpha$ sur plus de trois décades. Sur cet exemple, $\alpha = 0,181$ et $A = 5,88.10^{-3} \text{ Pa}^{-1}$.

3.1.3 La cellule : une rhéologie en loi de puissance

Comme on le voit sur l’exemple de la figure 3.5 ainsi que sur l’ensemble de nos mesures, et comme nous l’avons évoqué au 1.3.3, le comportement rhéologique d’une cellule peut être

³Cela est une preuve du fait que des mécanismes actifs de modification de la rigidité cellulaire se sont mis en place au cours de ces 135 s. Ces mécanismes de réponse à la force aux temps longs sont à la base du phénomène de rigidification que nous développerons au 3.3

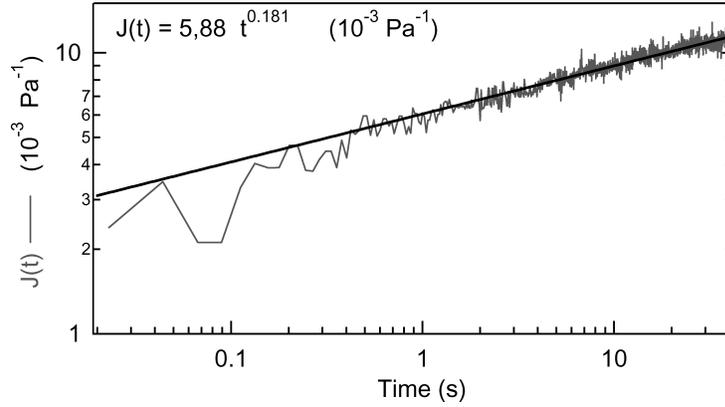


FIG. 3.5 – Fonction de fluage en coordonnées log-log, calculée sur la même expérience, et son ajustement par une loi de puissance : $J(t) = At^\alpha$ avec $A = 5,88 \cdot 10^{-3} \text{Pa}^{-1}$ et $\alpha = 0,181$.

modélisé par une loi de puissance sur plusieurs décades. On se place donc dans ce modèle pour la fonction de fluage : $J(t) = A(t/t_0)^\alpha$.

Ceci est équivalent au fait de considérer, pour la réponse dynamique, que les parties réelles et imaginaires de G varient ensemble, en loi de puissance de la fréquence f (ou de la pulsation ω , avec $f = \omega/(2\pi)$) :

$$G(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega) = (1 + i\eta) G'(\omega) = G_0 e^{i\delta} \left(\frac{\omega}{\omega_0} \right)^\alpha \quad (3.11)$$

où $\eta = \tan \delta$ mesure l'importance de la dissipation dans le matériau.

On a vu en effet à l'équation 1.8 que l'on peut relier la fonction de fluage $J(t)$ au module viscoélastique *via* leur transformée de Fourier, ce qui donne, dans ce cas précis des lois de puissance :

$$\tilde{J}(\omega) = A \frac{\Gamma(1 + \alpha)}{i\omega (i\omega t_0)^\alpha} \quad (3.12)$$

d'où

$$G(\omega) = \frac{1}{i\omega \tilde{J}(\omega)} = \frac{(it_0)^\alpha}{A \Gamma(1 + \alpha)} \omega^\alpha \quad (3.13)$$

et on retrouve donc bien, pour $G(\omega)$, une variation en loi de puissance.

On préfère utiliser une dépendance en fréquence plutôt qu'en pulsation, de façon à définir G_0 comme le module viscoélastique à $f_0 = 1 \text{ Hz}$. De même, en prenant le temps $t_0 = 1 \text{ s}$, on retrouve finalement $G(f) = G_0 e^{i\delta} \left(\frac{f}{f_0} \right)^\alpha$ avec $\delta = \frac{\alpha\pi}{2}$ et :

$$G_0 = \frac{(2\pi)^\alpha}{\Gamma(1 + \alpha)} \frac{1}{A} \quad (3.14)$$

On retrouve d'ailleurs la signification du paramètre δ : pour un matériau élastique, $\alpha = 0$ et donc $\tan \delta = 0$, il n'y a pas de dissipation dans le matériau, toute l'énergie est stockée sous forme élastique ; alors que pour un liquide visqueux $\alpha = 1$ et $\tan \delta \rightarrow \infty$ et toute énergie fournie au matériau est dissipée sous forme de frottement visqueux. Le comportement de la cellule se trouve donc entre ces deux extrêmes.

Pour l'exploitation des résultats obtenus en fluage, on réalise un ajustement en loi de puissance du temps (sur la gamme de temps comprise entre 0,02 s et 10 à 50 s) pour la fonction $J(t)$, duquel on tire les valeurs de A et α . On calcule ensuite G_0 , et c'est de cette grandeur que l'on se sert

pour analyser nos mesures. En effet, G_0 donne une évaluation directe du module élastique du matériau mesuré par l'expérience et est plus facile à appréhender que la valeur de A .

3.2 Caractérisation mécanique des cellules

On présente ici les résultats obtenus pour la viscoélasticité de trois types cellulaires, sondés *via* leurs intégrines par l'intermédiaire de billes recouvertes d'un peptide contenant la séquence RGD (cf. chapitre 2). L'ensemble des moyennes, médianes, et écart-types sont résumés dans le tableau 3.1.

3.2.1 Statistiques sur différents types de cellules

Dans un premier temps, nous allons examiner les résultats obtenus avec des billes recouvertes de peptide RGD à 1/10^{ème} de la concentration stock (cf. 2.2.2. On a pour habitude de noter cette concentration de peptide sur les billes : "coating RGD 1/10").

3.2.1.1 Lignée A549

Ces mesures de fluage ont été effectuées sur 22 cellules A549. L'ajustement par une loi de puissance du temps $J(t) = At^\alpha$ entre $t_1 = 0,02$ à 1 s et $t_2 = 5$ à 50 sec était toujours possible, sauf dans les cas où la cellule était vraiment trop motile, ou que la bille était trop mal ancrée à sa surface.

La statistique des exposants α mesurés est représentée sur le graphique de la figure 3.6. La répartition statistique de α est gaussienne. On s'en assure en réalisant un ajustement sur la probabilité cumulative $p(\alpha)$ par une fonction d'erreur :

$$p(x) = \frac{1}{2} \left(1 + \operatorname{erf} \left(\frac{x - \langle x \rangle}{\sigma\sqrt{2}} \right) \right) = \frac{1}{2} + \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \int_0^x \exp \left(-\frac{(u - \langle x \rangle)^2}{2\sigma^2} \right) du \quad (3.15)$$

où les deux paramètres ajustables sont la valeur moyenne $\langle x \rangle$ et la largeur σ de la distribution.

La gaussienne déduite de cet ajustement est représentée sur l'histogramme. On obtient dans ce cas une valeur moyenne $\langle \alpha \rangle = 0,315$, et un écart-type $\sigma_\alpha = 0,0915$.

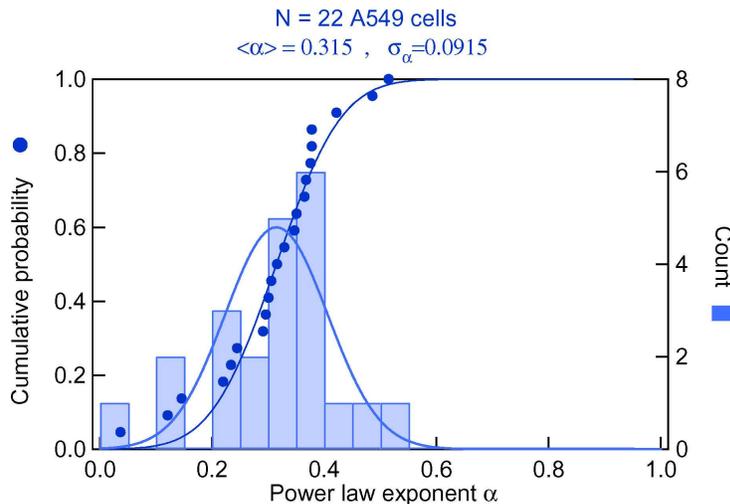


FIG. 3.6 – Répartition statistique de l'exposant α mesuré sur les fonctions de fluage de 22 cellules A549, à l'aide de billes RGD 1/10. Moyennes et écart-type tirés de l'ajustement de la probabilité cumulative par la fonction erf : $\langle \alpha \rangle = 0,315$ et $\sigma_\alpha = 0,0915$.

L'ensemble des modules viscoélastiques G_0 déduits de la mesure du préfacteur A et de l'exposant α est représenté sur la figure 3.7, en échelle log. Cela permet de constater que la répartition

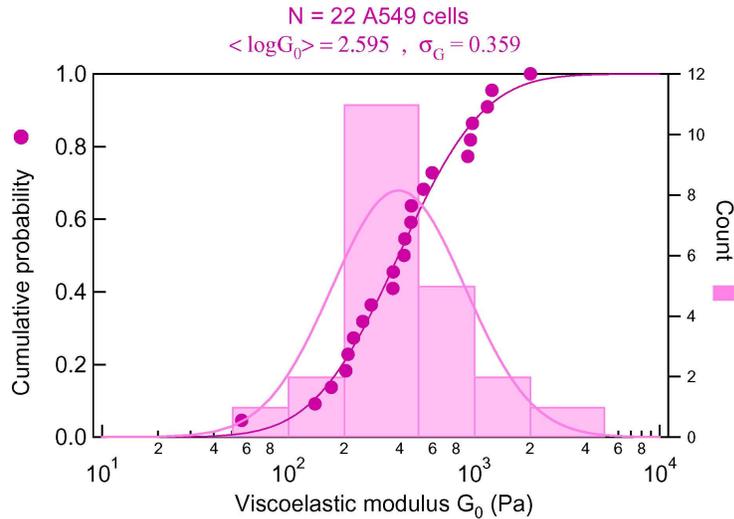


FIG. 3.7 – Répartition statistique du module viscoélastique G_0 (en échelle log) mesuré à partir des fonctions de fluage de 22 cellules A549. Moyennes et écart-type tirés de l’ajustement de la probabilité cumulative de $\log G_0$ par la fonction erf : $\langle \log G_0 \rangle = 2,595$ et $\sigma_G = 0,359$.

du module viscoélastique est log-normale : $\log G_0$ suit une loi normale, avec pour valeur moyenne $\langle \log G_0 \rangle = 2,595$ et pour écart-type $\sigma_G = 0,359$ (issus de l’ajustement).

On notera différemment les valeurs calculées sur l’ensemble statistique et celles obtenues à l’aide de l’ajustement des données par une fonction erreur. En l’occurrence :

- on désignera respectivement par $\text{med}(G_0)$ et $\text{moy}(G_0)$ les médiane et moyenne géométrique calculées sur l’ensemble statistique ;
- on notera $\overline{G_0} = 10^{\langle \log G_0 \rangle}$ la valeur de la moyenne géométrique tirée de l’ajustement, qui se confond, pour une distribution parfaitement log-normale, avec la valeur médiane "théorique". On notera entre parenthèses l’erreur commise sur l’évaluation de cette médiane : $\pm \delta G_0 = 10^{\langle \log G_0 \rangle \pm \sigma_G / \sqrt{N}} - \overline{G_0}$.

Nos distributions de G_0 ne sont pas parfaitement log-normales compte-tenu du nombre fini de nos données : on n’a donc pas exactement l’égalité entre $\overline{G_0}$ et $\text{moy}(G_0)$ ou $\text{med}(G_0)$. A titre d’exemple dans le cas de la figure 3.7, on a : $\overline{G_0} = 10^{\langle \log G_0 \rangle} = 394 (-221 / + 506)$ Pa, $\text{med}(G_0) = 424$ Pa et $\text{moy}(G_0) = 416$ Pa. Ces trois valeurs sont relativement proches, surtout au vu de la largeur de la distribution.

On peut aussi étudier la façon dont les grandeurs mesurées dépendent de la force appliquée. En effet, on a supposé que l’on restait dans le régime de déformation linéaire, c’est-à-dire que l’élasticité mesurée ne dépendait pas de la force appliquée. Pourtant, une telle non-linéarité a été rapportée sur des expériences de magnétocytométrie [128]. Cela est en grande partie dû aux contraintes et déformations imposées aux cellules (déplacements parfois supérieurs à 500 nm et contraintes de plusieurs centaines de Pa), qui sont nettement plus grandes que celles que nous utilisons⁴ (la rigidité de notre piège va de 35 à 120 pN/ μm).

Dans notre cas, on constate tout d’abord que α ne dépend pas du tout de la force appliquée (figure 3.8, gauche). En revanche, G_0 semble croître avec la force (figure 3.8, droite). Mais cela

⁴De plus, dans les expériences de magnétocytométrie non optique [128], la façon dont la déformation est mesurée est par essence non linéaire : la déformation angulaire moyenne sur N billes, Φ_N est mesurée par induction. Or le flux induit est proportionnel à la moyenne sur les cosinus des angles de rotation ϕ des billes individuelles, et l’angle moyen de rotation est finalement estimé par : $\Phi_N \propto \arccos(\cos \phi)_N$. Les expériences de magnétocytométrie optique, développées depuis, ont pu s’affranchir de cet artefact [37, 39].

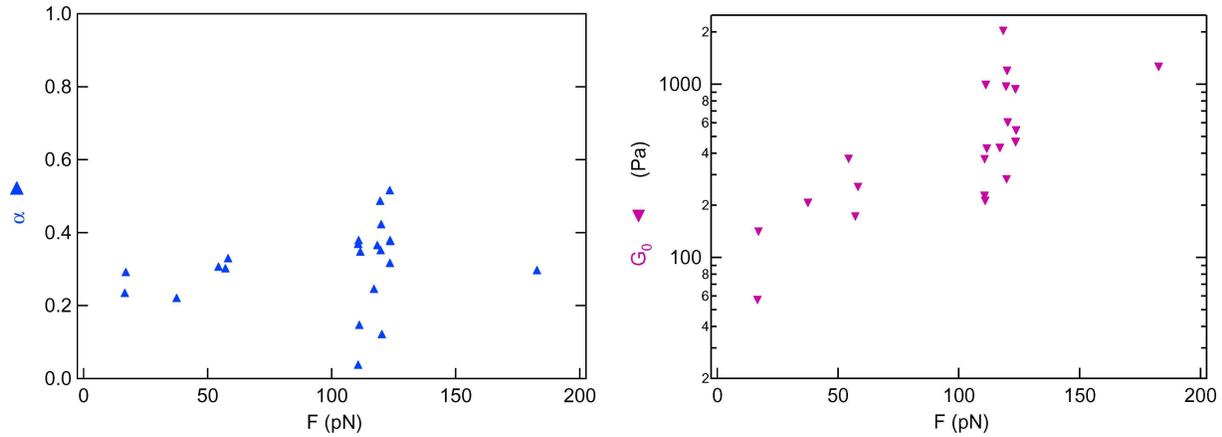


FIG. 3.8 – Dépendance de l'exposant α (gauche) et du module G_0 (droite) en fonction de la force appliquée.

est certainement dû au fait que, dans nos expériences, on adapte la force "à l'oeil", à la qualité de l'ancrage que l'on peut constater entre la bille et la cellule. En effet, pour déplacer cette bille de manière sensible sans toutefois l'arracher, on choisit la force qu'on lui applique, et celle-ci peut être d'autant plus grande que la rigidité est grande. Cela ne veut pas dire que la rigidité d'une cellule dépende de la contrainte qu'on lui applique, mais plutôt que l'on applique des contraintes plus grandes aux cellules que l'on évalue comme étant plus rigides. Le nuage de points aux alentours de 120 pN, et pour lequel les rigidités mesurées vont de 200 à 2000 Pa est rassurant sur ce point : à cette force typique, on a sondé 14 cellules ayant des valeurs de rigidité très différentes.

De plus, pour affirmer que nous restons bien dans le régime de déformation linéaire, on peut s'appuyer sur les expériences réalisées avec le même dispositif de pinces optiques en régime sinusoïdal [8, 10] : on a vérifié que la linéarité y était respectée, et ce pour des valeurs de force comparables à celles que l'on applique dans nos expériences de fluage.

3.2.1.2 Comparaison avec les lignées C2 et C2C12

Sur les graphiques 3.9 et 3.10, on a représenté les probabilités cumulatives des exposants α ainsi que des modules G_0 mesurés sur les trois types cellulaires : 22 cellules épithéliales alvéolaires A549, 8 cellules C2 et 21 cellules C2C12 (deux types issus d'une lignée de cellules pré-musculaires) ont été testées. Les probabilités cumulatives sont ajustées par une fonction erreur comme décrit plus haut. On indique dans la légende des figures les valeurs moyennes ou médianes, ainsi que les précisions sur celles-ci : $\pm\delta G_0$ et $\delta\alpha = \frac{\sigma_\alpha}{\sqrt{N}}$.

On peut constater qu'à la fois α et G_0 dépendent du type cellulaire. Les C2C12 et A549 ont, à exposant à peu près identique, des rigidités assez différentes : $\overline{G_0} = 394$ Pa pour les A549 et $\overline{G_0} = 251$ Pa pour les C2C12. Cela pourrait refléter le caractère physiologique différent de ces deux types cellulaires.

Les mesures effectuées sur les C2 sont à prendre avec plus de précaution, étant donné que le nombre de mesures est faible, et ce en raison du fait que les cellules paraissaient en mauvais état au moment de l'expérience (la lignée avait pu un peu dériver, ou commencer à se différencier, ce qui arrive fréquemment avec les cultures de ces cellules pré-musculaires, au bout d'un nombre de passages trop élevé).

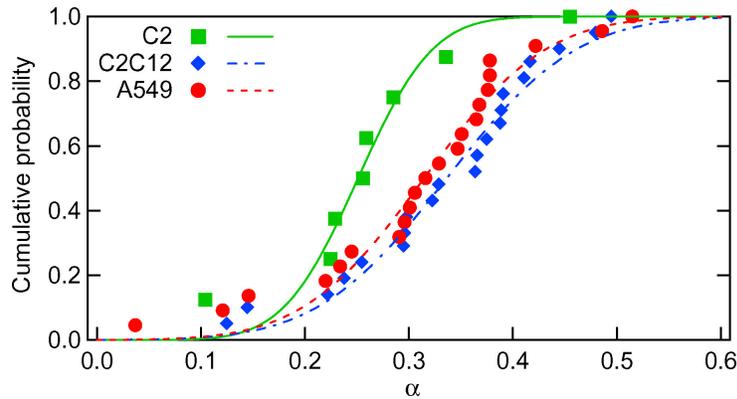


FIG. 3.9 – Dépendance de l'exposant α en fonction du type cellulaire : probabilités cumulatives et leurs ajustements par des fonctions erreur pour 22 cellules A549 : $\langle \alpha \rangle = 0,315 \pm 0,019$, 21 cellules C2C12 : $\langle \alpha \rangle = 0,336 \pm 0,020$, et 8 cellules C2 $\langle \alpha \rangle = 0,251 \pm 0,021$.

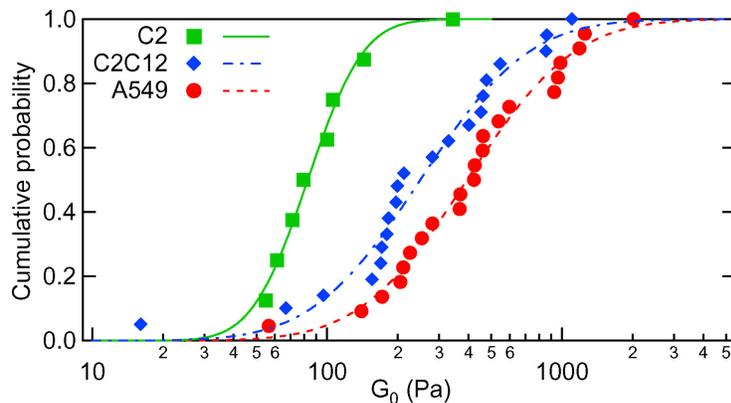


FIG. 3.10 – Dépendance du module viscoélastique G_0 en fonction du type cellulaire : probabilités cumulatives et leurs ajustements par des fonctions erreur. On obtient, pour 22 cellules A549 : $\overline{G_0} = 394 -64/+76$ Pa; 21 cellules C2C12 : $\overline{G_0} = 251 -42/+50$ Pa; et 8 cellules C2 $\overline{G_0} = 83 -12/+14$ Pa.

3.2.2 Influence de la densité de coating des billes

On a utilisé plusieurs concentrations en peptide pour recouvrir les billes. En effet, l'ancrage des billes aux cellules est d'autant plus fort que les billes contiennent à leur surface un grand nombre de ligands prêts à se lier aux protéines transmembranaires. Dans le cas des liaisons aux intégrines, c'est d'autant plus vrai que leur rassemblement sous forme de cluster et le déclenchement des voies de signalisation permettant leur ancrage au cytosquelette sous-jacent n'a pas lieu en-dessous d'un certain seuil de concentration locale en ligand, en l'occurrence la séquence RGD de la fibronectine. Nous nous sommes situés à des concentrations auxquelles la bille était suffisamment ancrée au cytosquelette pour ne pas être arrachée par l'application de la force (dans le cas contraire, quand on applique une force sur la bille, on peut l'arracher sans résistance, en tirant entre la bille et la cellule un tube de membrane). Mais même dans le cas où la bille est bien attachée, *via* les adhésions focales, au cytosquelette, on peut se douter que la force de cet ancrage dépend de la concentration en ligand, et que donc les propriétés viscoélastiques des cellules sondées dans différentes conditions de concentration en ligand ne seront pas forcément identiques.

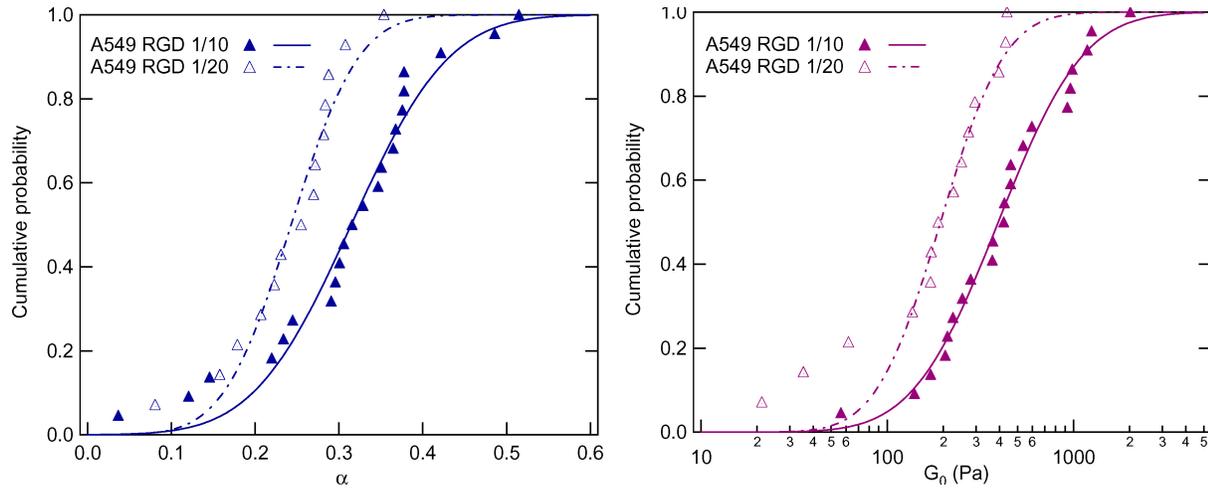


FIG. 3.11 – Probabilités cumulatives des α et G_0 mesurés sur des A549 à l’aide de billes coatées RGD1/10 (22 cellules) ou 1/20 (14 cellules), et ajustement par des fonctions erreur. Les valeurs de $\langle \alpha \rangle$, σ_α , $\langle \log G_0 \rangle$ et σ_G obtenues dans les deux cas sont résumées dans le tableau 3.1.

On a donc utilisé deux coatings différents : RGD 1/10 et une concentration deux fois plus diluée, RGD 1/20. Les figures 3.11 et 3.12 montrent les répartitions statistiques de α et G_0 pour respectivement des A549 et des C2C12 aux deux concentrations de coating.

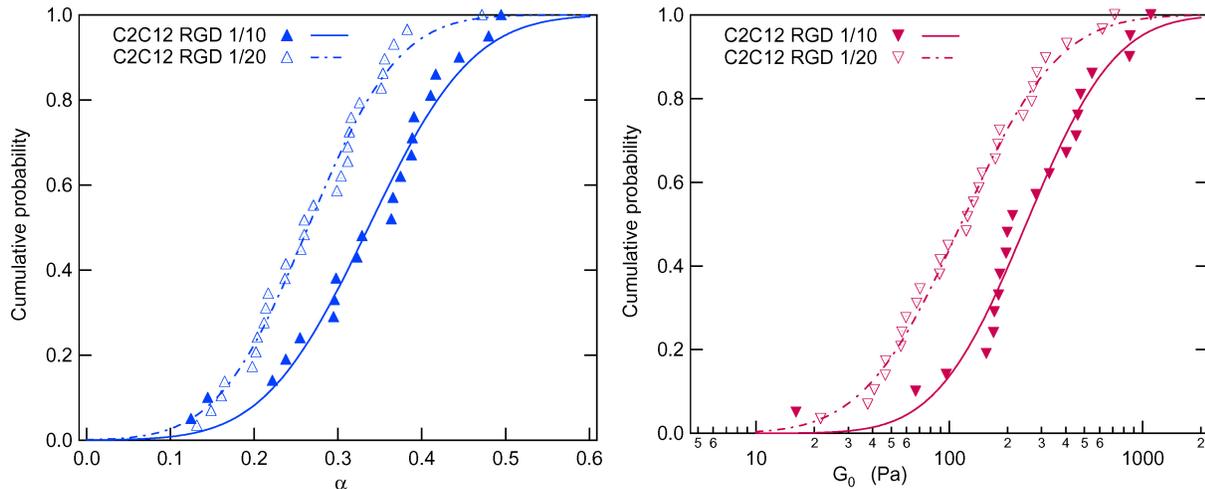


FIG. 3.12 – Probabilités cumulatives des α et G_0 mesurés sur des C2C12 à l’aide de billes coatées RGD1/10 (21 cellules) ou 1/20 (29 cellules) : de même, voir le tableau 3.1 pour les résultats des ajustements.

On s’aperçoit que les deux paramètres de notre description de la cellule en terme de matériau viscoélastique sont affectés par ces variations de concentration. On mesure, bien sûr des rigidités plus grandes quand la bille est plus fortement liée au cytosquelette : $\overline{G_0}(\text{RGD1/10}) = 394 > \overline{G_0}(\text{RGD1/20}) = 193$ Pa pour les A549, et $\overline{G_0}(\text{RGD1/10}) = 251 > \overline{G_0}(\text{RGD1/20}) = 115$ Pa pour les C2C12. A chaque fois, le module viscoélastique est multiplié par plus d’un facteur deux quand la concentration en RGD est doublée. Cela est vraisemblablement dû à un recrutement d’actine plus important autour de la bille. Des marquages en immunofluorescence sur cellules

ayant lié des billes coatées à la densité maximale de RGD (RGD1/1), ont en effet montré un véritable anneau d'actine entourant les billes, même en l'absence de force appliquée [74, 9]. Cet anneau est absent pour des coatings plus faibles, tels que ceux que l'on utilise.

Mais l'exposant α varie aussi : $\langle\alpha\rangle(\text{RGD1}/10) = 0,315 > \langle\alpha\rangle(\text{RGD1}/20) = 0,243$ pour les A549, et $\langle\alpha\rangle(\text{RGD1}/10) = 0,336 > \langle\alpha\rangle(\text{RGD1}/20) = 0,264$ pour les C2C12. La cellule apparaît donc localement d'autant plus dissipative que la concentration en ligand est importante. Comme on sait que la dissipation au sein du cytosquelette est principalement liée au glissement des moteurs myosines le long des filaments d'actine [8], on peut faire l'hypothèse que c'est la façon dont ces myosines participent à l'organisation à l'actine, près du point de contact, qui régit la viscosité locale du cytosquelette.

Il est alors raisonnable d'expliquer nos observations par le fait que le recrutement d'actine et de myosines est d'autant plus important que la concentration en ligand sur la bille-sonde est importante :

- G_0 augmente car le réseau d'actine est plus dense et plus enchevêtré (les myosines jouent le rôle de cross-linkers très efficaces) ;
- α augmente car la dissipation dans le réseau est plus forte : les myosines dissipent de l'énergie en faisant coulisser les filaments.

Il existe, à notre connaissance, peu de littérature permettant de confirmer ou d'infirmer nos hypothèses. Plusieurs études ont étudié le comportement viscoélastique de cellules en réponse à une activation de l'effet contractile des myosines [5, 95, 121] : dans ce cas, la rigidité augmente, mais l'exposant diminue, la cellule devient en quelque sorte plus rigide et plus élastique. Mais une concentration localement plus forte en myosines n'aura certainement pas le même effet que des myosines rendues plus actives. En effet, dans ce dernier cas, les myosines restent plus souvent attachées aux filaments, et confèrent donc une élasticité globale beaucoup plus importante à l'ensemble, puisqu'elles empêchent les filaments de coulisser librement les uns par rapport aux autres. L'étude de Balland et al. [8] permettrait de se rapprocher de nos observations, mais dans le cas inverse. Dans cette étude, l'activité ATP-asiue des myosines est inhibée : les moteurs décrochés restent donc décrochés, tandis que ceux qui sont encore accrochés restent accrochés aux filaments. Cela peut s'apparenter à une déplétion en myosines. Et dans ce cas, le module viscoélastique et l'exposant de la loi de puissance diminuent, ce qui pourrait être à rapprocher de ce que l'on observe quand on diminue la concentration en coating des billes.

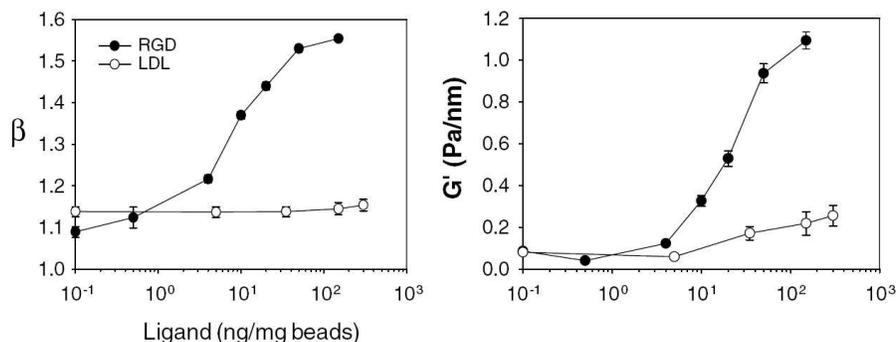


FIG. 3.13 – Variations de l'exposant β du déplacement quadratique moyen $\text{MSD} = D^* t^\beta$ et du module viscoélastique à 0,75 Hz G' avec la densité de coating RGD (disques noirs) des billes (les cercles vides correspondent à un coating LDL, protéine se liant à des récepteurs libres de la membrane, sans attache sous-jacente au cytosquelette d'actine) [D'après [19]].

Enfin, récemment, Bursac et al. [19] ont étudié spécifiquement les modifications d'ancrage

bille-cytosquelette induites par une différence de concentration de coating. Ils réalisent à la fois des observations de déplacement quadratique moyen d'une bille à la surface d'une cellule, et des mesures de module viscoélastique en OMTC. La rigidité cellulaire augmente avec la densité de coating des billes, et l'exposant β associé au déplacement quadratique moyen ($\text{MSD} = D^* t^\beta$) augmente aussi (cf. figure 3.13 : les données qui nous intéressent ici sont celles représentées par des disques noirs, correspondant à un coating RGD, c'est-à-dire identique au nôtre). Or cet exposant est, en théorie, relié à l'exposant de la loi de puissance du $G(\omega)$ [73] par une loi du type $\beta = 1 + 2\alpha$, ce qui signifie que l'exposant α associé augmenterait aussi avec la densité de coating. Ces observations vont donc dans le même sens que les nôtres.

3.2.3 Récapitulatif des mesures en régime de fluage

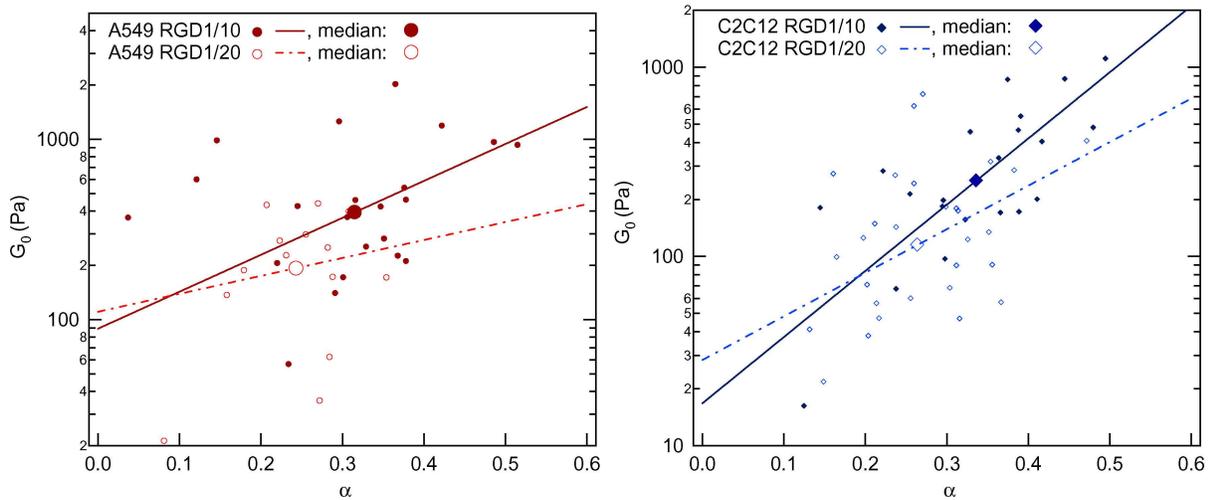


FIG. 3.14 – Comparaison de l'ensemble des données $G_0(\alpha)$ sur A549 (gauche) et C2C12 (droite); ajustement par une loi de puissance $G_0 = C \cdot 10^{\alpha/\alpha_0}$ avec C ajustable, et α_0 donné par l'équation 3.16.

Le fait que la fonction de fluage suive une loi de puissance du temps, les valeurs obtenues pour l'exposant et le préfacteur, ainsi que le type de lois de répartition auxquelles obéissent α et G_0 correspondent à ce qui est mesuré à l'aide d'autres techniques expérimentales, sur des types cellulaires très divers, et qui pousse à décrire la cellule en terme de milieu vitreux mou (cf. 1.3.3) ou de structures multi-échelles [10]. Or les études appliquant ce modèle aux cellules donnent une variation en loi de puissance pour $G_0(\alpha)$ [37, 39].

On a représenté les dépendances en α de G_0 pour les A549 et les C2C12 avec deux coatings différents sur la figure 3.14. L'ajustement est réalisé par une loi de puissance $G_0 = C \cdot 10^{\alpha/\alpha_0}$ avec un seul paramètre ajustable : C . α_0 est fixé par $\overline{G_0}$ et $\langle \alpha \rangle$:

$$\alpha_0 = \frac{\langle \alpha \rangle}{\log \frac{\overline{G_0}}{C}} \quad . \quad (3.16)$$

La pente de cette courbe (une droite en coordonnées log) est donnée, d'après l'article que nous proposons en annexe D, par : $d \ln(G_0)/d\alpha = (\ln 10)/\alpha_0$.

On obtient :

- pour les A549 RGD1/10 : $C = 95,9$ Pa et $\alpha_0 = 0,49$ (pente : $d \ln(G_0)/d\alpha = 4,7$)
- pour les A549 RGD1/20 : $C = 122$ Pa et $\alpha_0 = 1,00$ (pente : $d \ln(G_0)/d\alpha = 2,3$)

- pour les C2C12 RGD1/10 : $C = 14,1$ Pa et $\alpha_0 = 0,29$ (pente : $d \ln(G_0)/d\alpha = 7,9$)
- pour les C2C12 RGD1/20 : $C = 30,6$ Pa et $\alpha_0 = 0,43$ (pente : $d \ln(G_0)/d\alpha = 5,3$)

La valeur de la pente, 5,3 pour les C2C12 RGD 1/20, est très proche de celle obtenue, au laboratoire, sur myoblastes C2 sondés par pinces optiques et étirement uniaxial en coating RGD 1/20 (cf. Fig. 14 de l'article en annexe D : $d \ln(G_0)/d\alpha = 5,2$). De même, ici sur les A549 RGD 1/20 : $d \ln(G_0)/d\alpha = 2,3$ et dans l'article est rapportée la valeur 2,8, très proche.

Les pentes ne sont pas exactement parallèles même pour un type cellulaire : elles semblent d'autant plus grandes que le coating est dense. Il est difficile de comparer cette tendance aux valeurs fournies dans la littérature, qui concernent souvent un même type cellulaire avec un coating donné, mais en présence de différentes drogues modifiant les propriétés du cytosquelette [39]. Le modèle de l'article annexé propose une interprétation en terme de temps de relaxation maximal dans la cellule : ce temps est d'autant plus grand que la pente $d \ln(G_0)/d\alpha$ est élevée. Le fait que l'on observe une pente plus élevée sur des billes plus denses en coating, donc plus fortement ancrées signifierait que l'on sonde la cellule jusqu'à des temps caractéristiques plus élevés. Cela peut être associé au fait que l'on sollicite des structures de plus grande taille quand la bille est plus fortement ancrée (par exemple *via* des fibres de stress qui partiraient du réseau entourant la bille).

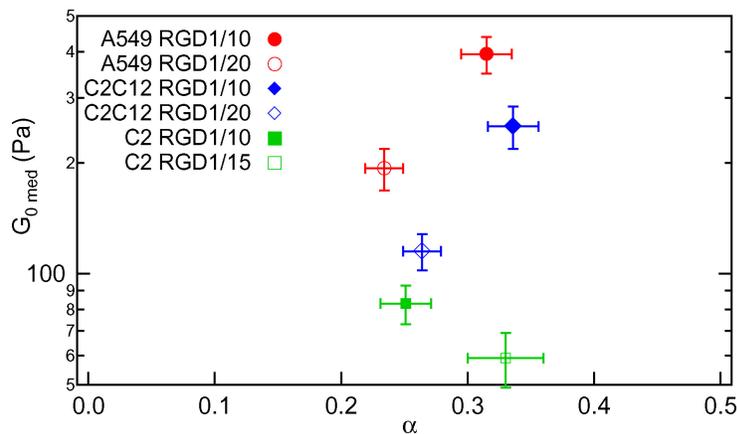


FIG. 3.15 – $\overline{G_0}$ en fonction de $\langle \alpha \rangle$ obtenus pour les 3 types cellulaires avec des densités de coating différentes.

La figure 3.15 résume l'ensemble des mesures de $\overline{G_0}$ en fonction de $\langle \alpha \rangle$. Là aussi, il est difficile de les comparer aux prévisions en loi de puissance décroissante prévue par la littérature [37, 39] pour un même type cellulaire dont on modifie l'état du cytosquelette d'actine.

L'ensemble de nos mesures, résumé dans le tableau 3.1, peut toutefois être comparé à celles obtenues au laboratoire, sur les mêmes types cellulaires, par pinces optiques en régime sinusoïdal, et par étirement uniaxial (cf. tableau de l'article [10] en annexe D).

Aussi bien dans les figure 3.15 et 3.18 que dans les tableau 3.1 et 3.2, les résultats obtenus sur C2 en coating RGD 1/15 sont fournis à titre indicatif, mais sont à prendre avec beaucoup de précaution, comme nous l'avons déjà suggéré précédemment (possibilité de dérive de la lignée au moment où les expériences étaient réalisées).

Les mesures de fluage sur cellule entière donnent, pour des myoblastes de type C2 :

- par adhésion au glutaraldéhyde : $\langle \alpha \rangle = 0,242$ et $\overline{G_0} = 1060$ Pa
- par adhésion *via* cadhérines : $\langle \alpha \rangle = 0,29$ et $\overline{G_0} = 850$ Pa

ce qui montre donc que l'exposant α mesuré dans les deux types d'expériences est tout à fait comparable, mais que les valeurs de G_0 obtenues sont dans notre cas significativement plus faibles.

| Type | [RGD] | N | $\langle \alpha \rangle$ | σ_α | $\langle \log G_0 \rangle$ | $\sigma_{\log G_0}$ | $\overline{G_0}$ (Pa) | $\text{moy}(G_0)$ (Pa) |
|-------|-------|-----|--------------------------|-----------------|----------------------------|---------------------|-----------------------|------------------------|
| A549 | 1/10 | 22 | 0,315 | 0,091 | 2,60 | 0,36 | 394 (-64/+76) | 416 |
| A549 | 1/20 | 14 | 0,243 | 0,063 | 2,29 | 0,27 | 193 (-30/+35) | 166 |
| C2C12 | 1/10 | 21 | 0,336 | 0,098 | 2,40 | 0,36 | 251 (-42/+50) | 250 |
| C2C12 | 1/20 | 29 | 0,264 | 0,085 | 2,06 | 0,40 | 115 (-18/+21) | 123 |
| C2 | 1/10 | 8 | 0,251 | 0,057 | 1,92 | 0,19 | 83 (-12/+14) | 100 |
| C2 | 1/15 | 15 | 0,330 | 0,128 | 1,77 | 0,24 | 59 (-8/+9) | 63 |

TAB. 3.1 – Paramètres mécaniques mesurés sur 3 types cellulaires à partir des expériences de fluage local réalisées à l’aide de billes de diamètre $3,47 \mu\text{m}$ recouvertes du peptide RGD. $\langle \rangle$ représente la valeur moyenne et σ la largeur de la distribution, obtenue par ajustement des probabilités cumulatives par une fonction erreur ; $\overline{G_0}$ est la valeur médiane théorique du module viscoélastique : $\overline{G_0} = 10^{\langle \log G_0 \rangle}$ avec ses barres d’erreur : $\pm \delta \overline{G_0} = 10^{\langle \log G_0 \rangle \pm \sigma_G / \sqrt{N}} - \overline{G_0}$, et $\text{moy}(G_0)$ est la moyenne géométrique.

Toutefois, la pertinence d’une comparaison poussée des résultats de fluage par étirement uniaxial et par pinces optiques est discutable, étant donné que les coating utilisés pour les lamelles de verre (à savoir glutaraldéhyde, qui engage toutes les protéines transmembranaires dans la liaison, et cadhérine, qui mime un contact cellule-cellule et non cellule-matrice) dans ces expériences sont très différents du nôtre.

Par pinces optiques en régime sinusoïdal, il a été mesuré, à l’aide de billes RGD 1/20 :

- sur cellules épithéliales A549 : $\langle \alpha \rangle = 0,219$ et $\overline{G_0} = 420$ Pa
- sur myoblastes C2 : $\langle \alpha \rangle = 0,208$ et $\overline{G_0} = 310$ Pa

Pour comparer nos résultats avec ceux-ci, il faut prendre, dans le tableau 3.1 les valeurs correspondant au coating RGD 1/20. Nos valeurs de α sont en général un peu plus élevées et celles de G_0 significativement plus basses. Il est possible que cela soit dû à un sous-échantillonnage des cellules lors des expériences. D’une part, dans nos expériences de fluage, avant de soumettre la cellule à un palier de force, on teste d’abord le déplacement de la bille en réponse à une petite force oscillante. On évite de réaliser la mesure sur les billes trop fortement liées au cytosquelette, car alors la déformation induite ne pourrait pas être précisément mesurée par le détecteur, on resterait dans le bruit du signal détecté. Cela expliquerait pourquoi on mesure en moyenne des G_0 plus petits.

D’autre part, la rétroaction est limitée en fréquence *via* la limitation de la cale piézo. Dans le cas d’une cellule au comportement très élastique, son α_{vrai} est petit. Or, comme la bille va se déplacer alors très vite au moment du saut du piège (plus vite que si le α_{vrai} était plus grand, ce qui voudrait dire une cellule plus visqueuse), la cale piézo ne va pas forcément arriver à rétroagir assez vite sur la position de la bille pour maintenir la force constante. On élimine alors dans l’analyse ces expériences où on peut voir que la rétroaction n’a pas assez bien fonctionné. Donc n’apparaissent pas dans la statistique les cellules de α_{vrai} trop petit.

Par ailleurs, on peut se demander quel rôle joue le lien entre la bille et le cytosquelette dans les effets mesurés en fluage ou en régime sinusoïdal. En effet, de nombreuses questions, évoquées au chapitre 1 (notamment au 1.2.4.4) restent ouvertes, quant au comportement mécanique des

adhésions focales elles-mêmes. Si on suppose qu'elles sont infiniment rigides comparé à la rigidité du cytosquelette que l'on mesure, elles ne jouent aucun rôle dans la réponse mécanique à laquelle on a accès. Si en revanche elles se déforment suite à l'application d'une force, alors leur compliance doit entrer en jeu comme une partie de la réponse du cytosquelette. Or il a été récemment prouvé qu'une des molécules impliquée dans les adhésions focales, p130Cas, est étirée quand une force est appliquée au niveau du contact et que cette extension est à la base d'une réponse biochimique de la cellule à la force ressentie [106]. L'extension d'une molécule ou la force d'un lien en réponse à une force dépendent en général de la vitesse à laquelle cette force est appliquée [36]. Donc la contribution mécanique des liens entre intégrines et cytosquelette n'a certainement pas une signature fréquentielle plate. Si son effet n'est pas complètement négligeable comparé aux effets de déformation du cytosquelette lui-même, cette signature fréquentielle pourrait faire partie de la réponse que l'on mesure. Or dans les expériences de fluage, on mesure l'intégrale de la réponse du système sondé à toutes les fréquences, contrairement aux expériences en régime sinusoïdal où on sonde la réponse du système à une fréquence donnée. D'où l'hypothèse que la contribution de la réponse mécanique de ces liens pourrait modifier l'exposant auquel on a accès par nos mesures de fluage par rapport à l'exposant mesuré pour la réponse fréquentielle des cellules.

3.3 Renforcement : réponse à l'application prolongée d'une force

Une fois caractérisée la réponse mécanique des cellules à l'application d'un palier de force, on s'est intéressé à l'évolution de cette réponse au cours du temps. La raison pour laquelle on a choisi d'appliquer des séries de paliers de force successifs et non une force continue sont multiples. Tout d'abord, il faut, pour avoir accès à la fonction de fluage, pouvoir mesurer la déformation de la cellule à partir d'un temps initial t_0 bien connu. Ensuite, il faut pouvoir considérer la cellule comme un matériau passif, c'est-à-dire négliger son mouvement propre, les mouvements internes (notamment le flux d'actine qui a tendance à ramener la bille vers le noyau), et les dérives mécaniques du système. Enfin, et c'est une raison conceptuelle majeure, il faut rester dans le régime de déformation linéaire. Or en appliquant une même force pendant trop longtemps, on risque de causer des déformations trop grandes et de sortir de ce régime (cf. les observations de ce type effectuées en fluage sur cellule entière [30]).

On a donc fixé la durée de chaque palier de force à 150 s, un bon compromis par rapport à toutes ces exigences. On laisse la bille relaxer mécaniquement entre deux applications de force, pendant un temps qui ne doit pas être trop long non plus, afin de ne pas perdre l'influence de l'application de force précédente. On a fixé ce temps de latence à 150 s aussi.

3.3.1 Evolution de la rigidité cellulaire pendant l'application d'une force

3.3.1.1 Mise en évidence du phénomène de renforcement sous contrainte

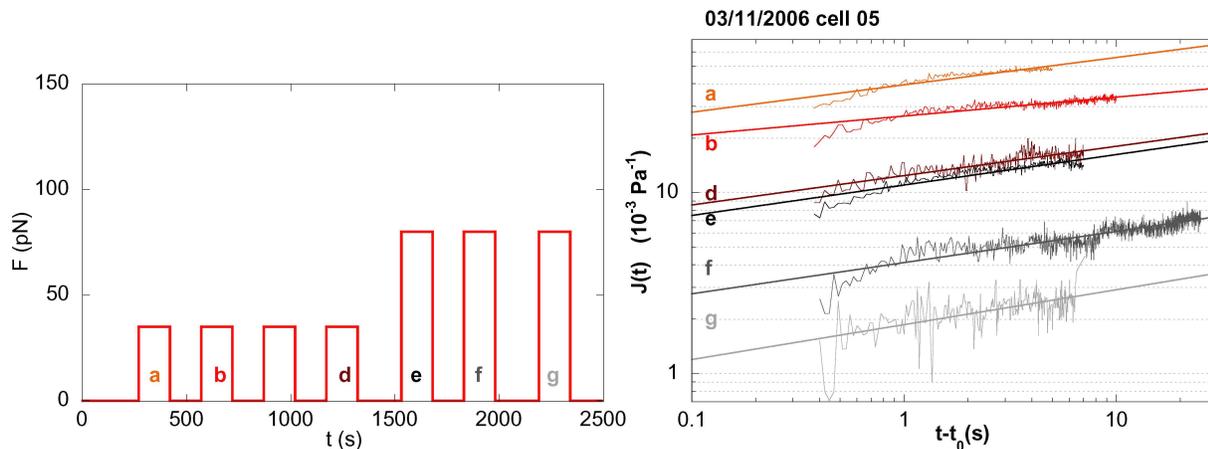


FIG. 3.16 – Réponse d'une cellule unique à l'application locale d'une force : allure des paliers de force successifs en fonction du temps (gauche) et fonctions de fluage obtenues pour chacun de ces paliers (droite), avec ajustements par des lois de puissance.

Lorsque l'on applique sur une cellule une série de paliers de force, comme schématisé sur la figure 3.16 (gauche), on observe, dans plus de 50% des cas, une réponse similaire : la cellule se déforme de moins en moins au fur et à mesure de l'application de la force. En effet, on constate sur la figure 3.16 (droite) que les fonctions de fluage sont d'amplitude de moins en moins grande. Plus précisément, le préfacteur A de la loi de puissance utilisée pour l'ajustement diminue, mais l'exposant α reste sensiblement le même. Sur cet exemple, on observe :

| Palier de force n° | temps t_0 (s) | préfacteur A (10^{-3} Pa $^{-1}$) | exposant α | G_0 (Pa) |
|--------------------|-----------------|---|-------------------|------------|
| 1 | 270 | 39,4 | 0,151 | 36 |
| 2 | 570 | 26,5 | 0,105 | 48 |
| 4 | 1170 | 12,4 | 0,162 | 117 |
| 5 | 1530 | 11,0 | 0,168 | 128 |
| 6 | 1830 | 4,11 | 0,172 | 361 |
| 7 | 2190 | 1,87 | 0,193 | 832 |

Cela signifie donc que la cellule garde le même type de comportement rhéologique, mais devient de plus en plus rigide : G_0 augmente de plus d'un ordre de grandeur dans cette expérience, passant de 36 à 832 Pa en un peu plus d'une demi-heure. C'est une mesure dynamique du phénomène de renforcement sous contrainte présenté au chapitre 1 (1.3.4).

3.3.1.2 Statistique du renforcement

Ce type d'expérience requiert une conjonction de facteurs favorables assez délicate à obtenir et on ne peut pas toujours en tirer une mesure précise du G_0 à chaque palier de force. Mais on peut tout de même appliquer ces paliers, et on mesure en général A et α (d'où on tire G_0), pour quelques-uns d'entre eux. On peut alors comparer ces valeurs en fonction du nombre n de paliers de force appliqués (le temps d'application total de la force étant donc $T_{tot} = 150n$ s puisque chaque palier dure 150 s, avec un temps de relaxation entre chaque palier à peu près équivalent).

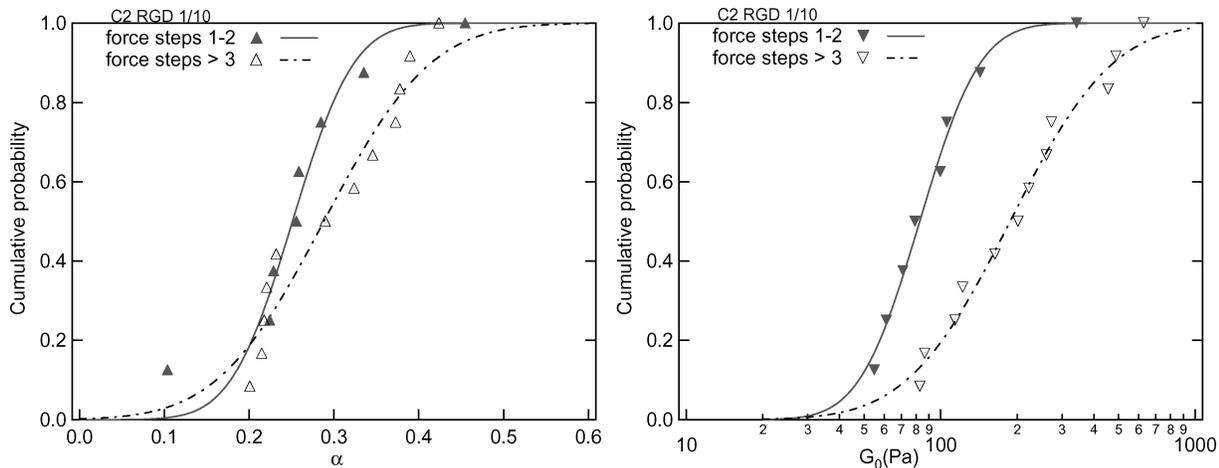


FIG. 3.17 – Répartition statistique des exposants α (gauche) et des modules G_0 (droite) mesurés sur des cellules C2 sondées *via* des billes RGD 1/10, la force étant appliquée pendant 1 ou 2 paliers (triangles gris pleins) ou pendant plus de 3 paliers (triangles noirs). On obtient : $\langle \alpha \rangle_{1,2} = 0,251 \pm 0,02$, $\langle \alpha \rangle_{\geq 3} = 0,288 \pm 0,03$, $G_{0,med1,2} = 83(-12/+14)$ Pa, et $G_{0,med\geq 3} = 186(-37/+46)$ Pa.

On a réalisé ces mesures sur plusieurs cellules C2 et C2C12, et on peut comparer l'ensemble des paramètres α et G_0 obtenus dans deux groupes expérimentaux : le groupe des mesures réalisées au début de l'application de la force (premier et deuxième paliers), et le groupe des mesures réalisées pendant les paliers suivants. Sur la figure 3.17 sont rassemblés les deux groupes de mesures réalisées sur cellules C2 à l'aide de billes RGD 1/10. On peut voir que la répartition statistique de l'exposant α est légèrement modifiée par l'application de la force : pour $n = 1$ ou 2, on a $\langle \alpha \rangle_{1,2} = 0,251 \pm 0,02$, et pour $n \geq 3$, on a $\langle \alpha \rangle_{\geq 3} = 0,288 \pm 0,03$. En revanche, la répartition statistique de $\log G_0$ montre une augmentation nette : $\langle \log G_0 \rangle_{1,2} = 1,92 \pm 0,066$, et $\langle \log G_0 \rangle_{\geq 3} = 2,27 \pm 0,096$.

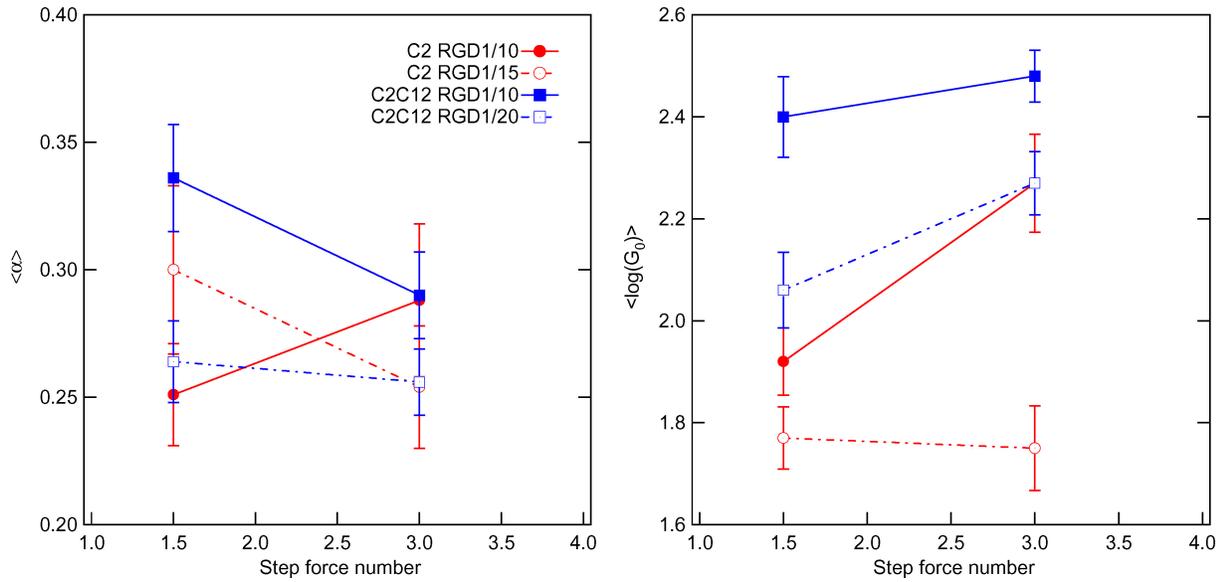


FIG. 3.18 – Evolution de l'exposant α (gauche) et du logarithme du module élastique $\log G_0$ (droite) sous contrainte. On a représenté les deux groupes de mesures, selon que la force a été appliquée une ou deux fois (1,5 en abscisse) ou plus de trois fois (3 en abscisse), pour des cellules C2 (rouge) avec billes RGD 1/10 (disques pleins) ou 1/15 (cercles), et des cellules C2C12 (bleu) avec billes RGD 1/10 (carrés pleins) ou 1/20 (carrés vides).

| Type | [RGD] | Paliers de force | N | $\langle \alpha \rangle$ | σ_α | $\langle \log G_0 \rangle$ | σ_G | $\overline{G_0}$ (Pa) |
|-------|-------|------------------|-----|--------------------------|-----------------|----------------------------|------------|-----------------------|
| C2 | 1/10 | 1-2 | 8 | 0,251 | 0,057 | 1,92 | 0,09 | 83 (-12/ + 14) |
| C2 | 1/10 | ≥ 3 | 11 | 0,288 | 0,099 | 2,27 | 0,32 | 186 (-37/ + 46) |
| C2 | 1/15 | 1-2 | 15 | 0,330 | 0,128 | 1,77 | 0,24 | 59 (-8/ + 9) |
| C2 | 1/15 | ≥ 3 | 16 | 0,254 | 0,097 | 1,75 | 0,33 | 56 (-10/ + 12) |
| C2C12 | 1/10 | 1-2 | 21 | 0,336 | 0,098 | 2,40 | 0,363 | 251 (-42/ + 50) |
| C2C12 | 1/10 | ≥ 3 | 18 | 0,290 | 0,074 | 2,48 | 0,22 | 302 (-34/+) |
| C2C12 | 1/20 | 1-2 | 29 | 0,264 | 0,085 | 2,06 | 0,40 | 115 (-18/ + 38) |
| C2C12 | 1/20 | ≥ 3 | 12 | 0,256 | 0,074 | 2,27 | 0,22 | 186 (-25/ + 29) |

TAB. 3.2 – Paramètres mécaniques mesurés sur 3 types cellulaires, à l'aide de coatings différents, en fonction du nombre de paliers de force : 1 ou 2 (cellule peu modifiée par la force appliquée), 3 ou plus (cellule en cours de rigidification).

L'ensemble des moyennes obtenues pour α et $\log G_0$ sur les deux types cellulaires avec deux densités de coating différentes est représenté sur la figure 3.18. L'évolution de l'exposant ne se fait pas toujours dans le même sens : il a plutôt tendance à diminuer, mais cette tendance se

situe globalement à l'intérieur des barres d'erreur. Le module élastique, en revanche, augmente nettement avec l'application de la force (sauf dans le cas des C2 RGD 1/15, dont on a indiqué qu'il était à prendre avec précaution). Ces mesures sont résumées dans le tableau 3.2.

3.3.1.3 Renforcement progressif sous contrainte prolongée ou rigidification non-linéaire ?

Dans nos expériences, on mesure le module $G_{0,n}$ à chaque palier de force n , $n = 1$ à N , et on constate qu'au cours du temps, ce module élastique augmente. Or on ne peut en général pas garder la même valeur de force appliquée à chaque palier, car, la cellule se renforçant, il faut lui appliquer une force plus grande pour pouvoir mesurer une déformation qui sorte du bruit de la détection. De façon à vérifier que l'augmentation de G_0 observée est un renforcement sous l'action d'une contrainte prolongée, et non une manifestation du phénomène de rigidification non-linéaire évoqué précédemment, on peut tracer les variations du module élastique en fonction des variations de la force appliquée (cf. figure 3.19).

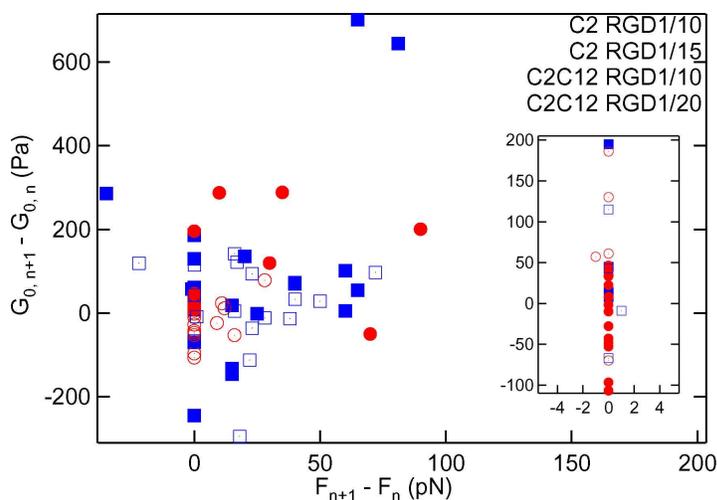


FIG. 3.19 – Evolution du module élastique entre deux paliers de force successifs $G_{0,n+1} - G_{0,n}$ en fonction de la différence de force entre ces deux paliers $F_{n+1} - F_n$, pour des cellules C2 et C2C12 avec deux concentrations de coating. En insert, un grossissement de la zone autour de $F_{n+1} - F_n = 0$.

Si les cellules obéissent à une rigidification non-linéaire, on doit observer une augmentation de G_0 en réponse à l'augmentation de la force appliquée. En revanche si, quand on passe d'un palier de force (n) au suivant ($n + 1$) en gardant la même force, soit $F_{n+1} - F_n = 0$, on observe une augmentation de G_0 , alors c'est que la cellule s'est rigidifiée en réponse à l'application prolongée de la force. Or on peut constater sur la figure 3.19 que la plupart des points correspondant à une augmentation de rigidité cellulaire sont situés à différence de force très faible (moins de 50 pN) voire nulle (insert). On observe donc bien une adaptation des cellules se traduisant par un renforcement sous l'action prolongée de la contrainte.

Cependant, ces mesures sont des statistiques sur toutes les cellules testées, et la dispersion naturelle des valeurs de α ou G_0 sur une population de cellules donnée rend nos interprétations délicates. C'est pourquoi il est intéressant de regarder comment évolue, sur une même cellule, le module G_0 en fonction du temps d'application de la force. On ne s'intéressera plus à la valeur de α , dont on a vu qu'elle variait globalement peu lors de ces expériences de renforcement.

3.3.2 Echelle de temps du renforcement

3.3.2.1 Exemple et notations

Pour une cellule donnée, on suit l'évolution du module élastique $G_{0,n}$ en fonction du temps d'application de la force. On obtient des graphes comme celui présenté sur la figure 3.20. Sur cet exemple de cellule A549, le module élastique passe de $G_{0,2} = 192$ Pa à $G_{0,9} = 1255$ Pa en 1500 s environ soit 25 min. De plus, la cellule semble atteindre une certaine saturation dans sa réponse mécanique : le module reste de l'ordre de 1350 Pa (entre 1255 et 1425 Pa exactement) sur les 4 derniers paliers.

C'est pourquoi on tente d'ajuster les données de $G_0(t)$ à l'aide d'une sigmoïde :

$$G_0(t) = A + \frac{B}{1 + \exp\left(-\frac{t-t_0}{\tau_G}\right)} \quad (3.17)$$

où (t_0, τ_G) sont les deux seuls paramètres ajustables, et avec $B = (G_{0,N} - G_{0,1})(1 + \exp(-t_0/\tau))$ et $A = G_{0,N} - B$. t_0 représente le temps de latence nécessaire au début de l'augmentation de la rigidité cellulaire, et τ_G le temps de montée de ce renforcement. $G_{0,1}$ est la première valeur de rigidité mesurée, que l'on assimile à la valeur avant perturbation mécanique de la cellule. $G_{0,N}$ est la dernière valeur de rigidité à laquelle on a accès : quand la cellule semble atteindre une saturation de sa rigidité, on peut l'assimiler à sa rigidité maximale.

On peut alors utiliser la fonction normalisée $g(t)$ et réaliser l'ajustement suivant :

$$g(t) = \frac{G_0(t) - G_{0,1}}{G_{0,N} - G_{0,1}} \simeq \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{t-t_0}{\tau_G}\right)} \quad (3.18)$$

la deuxième égalité étant vérifiée pour $t_0 \gg \tau_G$, ce qui est le cas dans nos expériences. Par exemple sur la courbe de la figure 3.20, on obtient : $t_0 = 890$ s et $\tau_G = 75$ s.

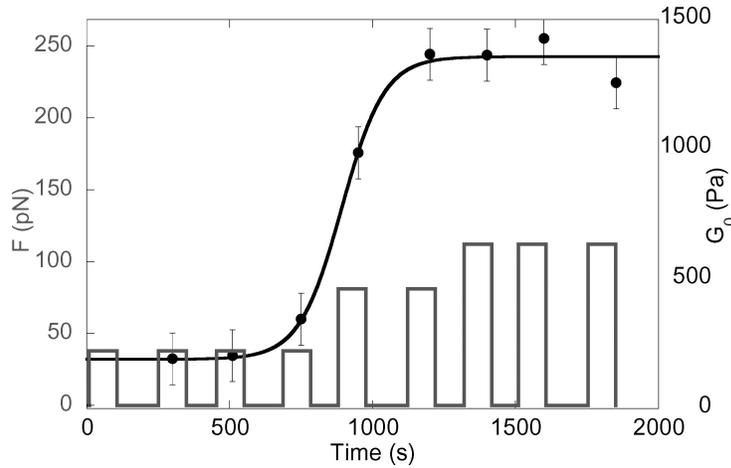


FIG. 3.20 – Evolution du module élastique G_0 d'une cellule A549 en fonction du temps, pendant l'application de paliers de force. L'ajustement de $G_0(t)$ est réalisé selon l'équation 3.17 avec $G_{0,1} = 190$ Pa, $G_{0,N} = 1350$ Pa (moyenne sur les trois dernières valeurs mesurées) : on obtient $t_0 = 890$ s et $\tau_G = 75$ s.

On peut noter que t_0 est relié à la valeur de $g(t = 0)$:

$$g(0) = \frac{1}{1 + \exp(t_0/\tau)} \quad \text{ou} \quad \exp(t_0/\tau) = \frac{1}{g(0)} - 1 \quad (3.19)$$

l'une ou l'autre des descriptions pouvant être adoptée selon qu'on veut faire apparaître un temps de latence ou une valeur de g au début de l'expérience.

Une telle saturation n'est pas toujours observée dans les expériences : la cellule devient parfois trop rigide pour que l'on puisse continuer à mesurer correctement son G_0 *via* la fonction de fluage, ou alors les temps de latence et/ou de montée peuvent être trop longs pour que l'on puisse garder la cellule dans un état physiologique correct le temps de la mesure⁵. On utilise alors un ajustement à un paramètre supplémentaire, g_{max} , relié à la rigidité maximale, à laquelle on n'a pas eu accès par la mesure :

$$g(t) = \frac{g_{max}}{1 + \exp\left(-\frac{t-t_0}{\tau_G}\right)} \quad (3.20)$$

C'est donc cet ajustement que l'on utilisera le plus souvent par la suite. Le paramètre le plus intéressant est la valeur du temps de montée τ_G , dont on voit sur l'exemple précédent qu'il est de l'ordre de la centaine de secondes. Cette valeur n'est pas totalement indépendante des contraintes expérimentales : c'est l'ordre de grandeur des temps auxquels on a accès étant donnée notre procédure de mesure. On ne pourrait pas voir des temps de renforcement inférieurs à plusieurs dizaines de secondes (car on n'aurait pas le temps d'appliquer un palier de force), et on n'a pas accès aux temps dépassant les 3000 secondes car les échantillons cessent alors d'être exploitables.

3.3.2.2 Résultats sur les C2C12

La plupart des résultats de renforcement mécanique obtenus seront présentés au chapitre suivant, avec les résultats de recrutement d'actine pour les mêmes cellules.

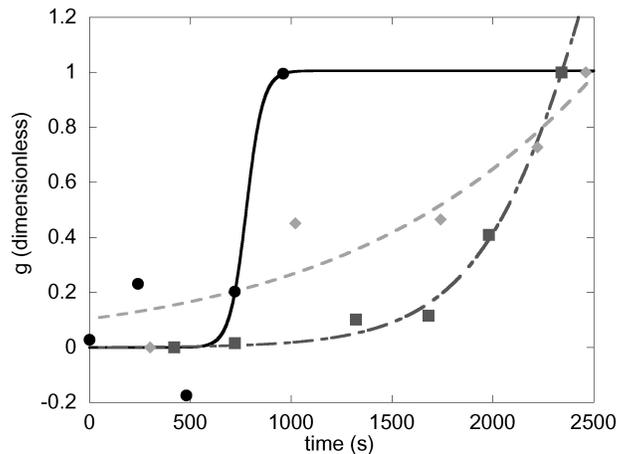


FIG. 3.21 – Augmentation du module viscoélastique adimensionné $g(t)$ sous contrainte, pour 3 cellules C2C12 individuelles, avec ajustement par une sigmoïde : $g_{max} = 1,005$, $t_0 = 776$ s et $\tau_G = 41$ s (cellule 05 du 12/07/2006, disques noirs), $g_{max} = 3,27$, $t_0 = 2590$ s et $\tau_G = 307$ s (cellule 05 du 03/11/2006, carrés gris), et $g_{max} = 6,23$, $t_0 = 4235$ s et $\tau_G = 1040$ s (cellule 03 du 24/11/2006, losanges gris clair).

La figure 3.21 montre des exemples de renforcement observés sur des cellules C2C12 individuelles, ainsi que les valeurs des ajustements réalisés : on voit que la saturation mécanique n'est en général pas atteinte. Quand on dispose de trop peu de points (5 par exemple sur les courbes

⁵Il faut se rappeler que le volume de milieu contenu dans la chambre expérimentale est petit (moins de 100 μL) et que les cellules doivent être éclairées assez intensément pour réaliser ces mesures. Ces deux conditions ont tendance à endommager les cellules, et les expériences ne peuvent s'étaler sur plus d'une heure environ.

noires et gris clair), les ajustements obtenus, comprenant trois paramètres, ne sont pas forcément très pertinents. On constate cependant des temps de montée τ_G de l'ordre de plusieurs dizaines à quelques centaines de secondes dans tous les cas.

Chapitre 4

Modifications biologiques dans la zone de contrainte

On a décrit au chapitre 2 comment, dans une cellule vivante, rendre fluorescente une protéine afin de la détecter. En excitant spécifiquement la longueur d'onde à laquelle le fluorophore utilisé absorbe, et en ne recueillant la lumière que dans la longueur d'onde à laquelle il réémet, on a une image de la répartition de la protéine d'intérêt dans la cellule. L'excitation étant maximale au point de convergence de lampe, on récupère essentiellement le signal fourni par les protéines fluorescentes situées dans le plan focal. Cependant, en l'absence d'un dispositif confocal, on ne peut pas exclure la contribution des protéines situées en avant et en arrière du plan focal. C'est pourquoi on ne peut pas, avec notre dispositif, mesurer une quantité absolue de fluorescence et en déduire une concentration en protéines : l'intensité de fluorescence détectée n'est pas exactement proportionnelle à la quantité de protéine présente dans le plan d'observation. Mais tant que l'on se restreint à mesurer l'intensité lumineuse dans une zone de la cellule au cours du temps, on peut comparer les valeurs obtenues entre elles, et en tirer des lois d'évolution.

La protéine dont on a voulu suivre l'évolution en réponse à l'application d'une force est l'actine : on sait en effet que le cytosquelette d'actine est un des acteurs majeurs de la réponse viscoélastique des cellules. On comparera donc l'évolution de la densité d'actine locale avec celle de la rigidité cellulaire mesurée en parallèle sur la même cellule. Toutes ces mesures ont été réalisées sur des C2C12.

4.1 De l'actine autour du contact bille-cellule

4.1.1 Expériences préliminaires

L'annexe C présente les résultats de quelques expériences préliminaires réalisées à l'Institut Jacques Monod. Ces observations de recrutement d'actine autour de billes liées aux cellules, en fonction de la raideur du piège qui les maintient en place, nous ont permis d'appréhender les caractéristiques principales (en terme de temps et de distances typiques, notamment) de ce phénomène.

4.1.2 Analyse quantitative des images

Pendant une expérience, on applique, comme on l'a vu au chapitre 3, une série de paliers de forces, chaque palier n étant suivi d'une relaxation de durée à peu près égale. Pendant cette durée, on prend des images en épifluorescence dans plusieurs plans en Z , distants d'un μm environ (cf. 2.4.2). On utilise ensuite un plug-in sous Image J pour analyser ces images.

Des 4 plans situés autour du centre de la bille (et couvrant une hauteur de $3\ \mu\text{m}$ environ, soit l'équivalent de la taille de la bille), on tire une image moyenne, à laquelle on applique un premier filtre lissant ("Smooth"). La figure 4.1 montre un exemple d'images ainsi obtenues (on n'a fait figurer qu'une image sur deux, si bien que l'intervalle entre deux clichés est de 600 s environ, soit deux paliers de force suivis de leur temps de relaxation). On voit très nettement que la quantité d'actine autour de la bille croît au cours du temps, et qu'apparaissent au contact-bille cellule des patches d'actine (points brillants sur les images D et E).

On n'a pas caractérisé la composition moléculaire de ces patches, mais étant donné les nombreuses études ayant montré la présence d'actine dans les adhésions focales, ainsi que l'apparition de ces adhésions sous force (voir 1.2.4), on utilisera par la suite ce terme d'adhésions focales (FA) pour les désigner.

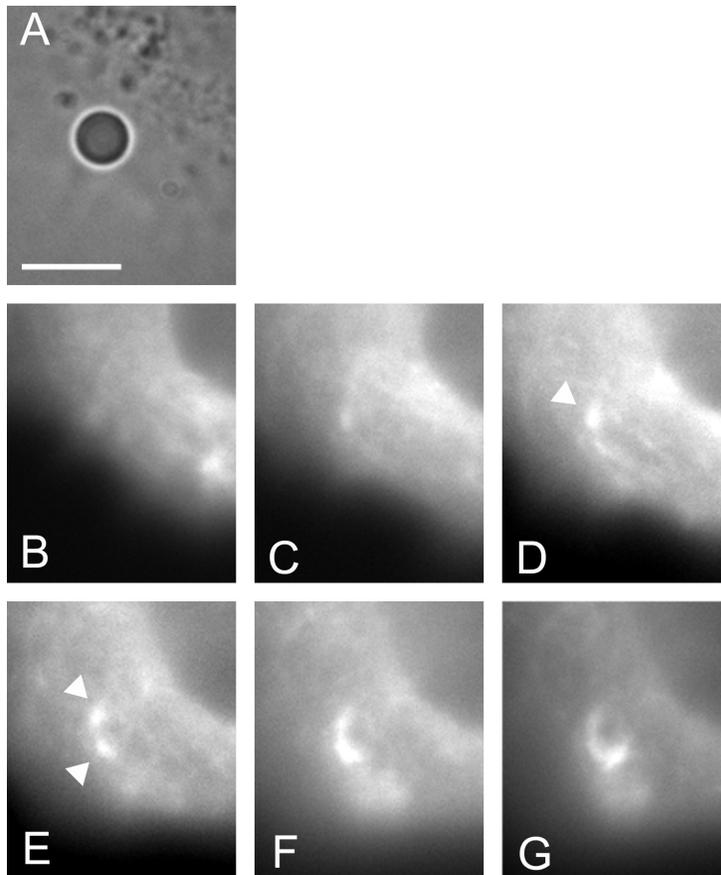


FIG. 4.1 – Images d'une cellule C2C12 pendant une expérience : (A) en transmission, où l'on voit la bille *via* laquelle on applique la force (barre : $5\ \mu\text{m}$) ; (B à G) en épifluorescence, où l'on détecte l'actine-GFP (intervalle entre deux images : 600 s environ, soit l'application de 2 paliers de force ; l'échelle des niveaux de gris n'est pas la même sur les 6 images). Les flèches sur les images D et E pointent vers des patches d'actine apparaissant au contact bille-cellule.

De plus, la quantité d'actine n'augmente pas seulement au niveau de ces patches : on peut constater une augmentation de l'intensité de fluorescence aussi en-dehors des contacts. C'est pourquoi on a choisi d'appliquer aux images deux types de traitement, afin d'analyser les deux phénomènes indépendamment : recrutement d'actine spécifiquement au niveau des contacts et plus globalement dans le réseau.

4.1.2.1 Définition des zones d'intérêt

Dans les deux cas, la procédure commence par définir dans l'image plusieurs zones d'intérêt (ROI, pour "Regions of Interest"), représentées sur la figure 4.2. Pour étudier la zone située autour de la bille, on utilise 9 disques concentriques autour de la bille : ROI_i , $i = 1$ à 9. Leurs rayons vont de $R_1 = 2,25 \mu\text{m}$ à $R_9 = 6,25 \mu\text{m}$, avec $R_{i+1} - R_i = 0,5 \mu\text{m}$. Pour s'affranchir du photoblanchiment qui pourrait avoir lieu pendant l'expérience, on mesure l'intensité lumineuse dans une zone contrôle : ROI_{bleach} . C'est un petit disque positionné dans la cellule, mais suffisamment loin de la bille pour ne pas être sensible à l'application de la force (en général, on le prend juste après le dernier disque ROI_9).

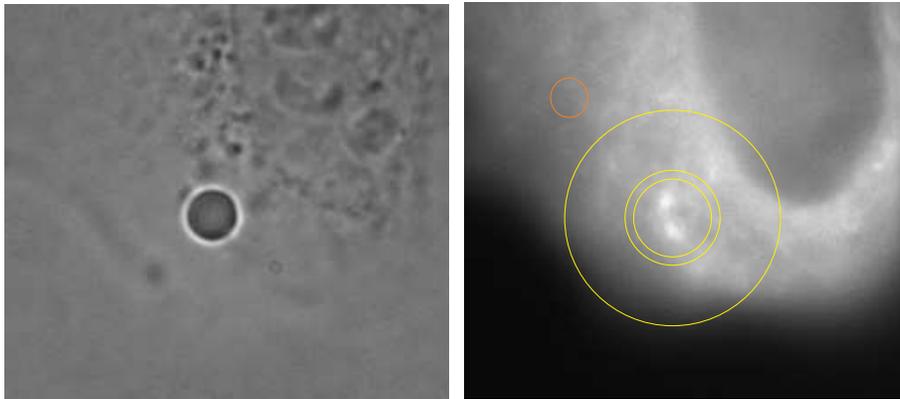


FIG. 4.2 – Définition des zones d'intérêt pour l'analyse des images : cliché en transmission pour repérer la position de la bille (gauche) ; et cliché en épifluorescence après lissage, avec les zones ROI_i en jaune (pour $i = 1, 2$ et 9) et la zone ROI_{bleach} en orange (droite).

A chaque temps t_n , après avoir moyenné les images des 4 plans d'intérêt, lissé l'image résultante et défini les ROI , on mesure l'intensité moyenne des pixels contenus dans ROI_{bleach} : I_{bleach} . Cette valeur fait office de référence de l'intensité de fluorescence dans la partie non perturbée de la cellule au cours du temps.

4.1.2.2 Quantité d'actine contenue dans les contacts

Afin d'évaluer la quantité d'actine contenue dans les contacts, on s'est inspiré des techniques de détection et d'analyse utilisées par Zamir et coll. [137].

On applique à l'image, après les traitements décrits précédemment, une soustraction du fond (afin d'éliminer le signal correspondant à l'actine présente dans la cellule sous forme diffuse), ainsi qu'un seuillage. On obtient alors une image comme celle représentée sur la figure 4.3 : on peut ainsi isoler les différents patches présents au contact bille-cellule. On ne garde pour cela que les points brillants contenus dans dans la zone ROI_1 . Chaque patche est identifié et indexé (par un indice p).

On utilise ensuite le masque correspondant à sa surface pour mesurer, sur l'image de départ (avant soustraction du fond et seuillage), le nombre de pixels N_p et l'intensité lumineuse moyenne contenue dans ce patche : I_p . L'estimation de la quantité totale d'actine contenue, au temps t_n , dans les FA vaut :

$$Q(t_n) = \frac{1}{I_{\text{bleach}}(t_n)} \sum_p N_p(t_n) I_p(t_n) \quad . \quad (4.1)$$

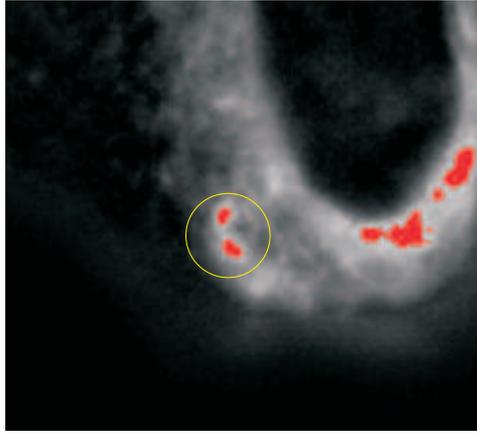


FIG. 4.3 – Le même cliché que celui de la figure 4.2, après lissage, soustraction du fond et seuillage : on voit nettement les patches d’actine correspondant aux contacts, situés dans la zone ROI_1 .

Comme on l’avait fait pour le module élastique, on définit aussi la valeur normalisée $q(t)$ par :

$$q(t_n) = \frac{Q(t) - \min(Q)}{\max(Q) - \min(Q)} \quad (4.2)$$

de façon à avoir une quantité adimensionnée et variant entre 0 et 1. Les valeurs min et max sont prises sur l’ensemble des $Q(t_n)$ ($n = 1, N$) mesuré pour cette cellule au cours du temps.

On utilise aussi les masques obtenus après seuillage pour ajuster chaque patche par une ellipse, dont on peut repérer la position (X_p, Y_p) , la taille des petit et grand axes (a_p, A_p) , et l’orientation θ_p à chaque temps t_n .

4.1.2.3 Densité d’actine dans le réseau du cytosquelette

Afin de mesurer la densité d’actine contenue dans le réseau du cytosquelette à courte et moyenne portée autour de la bille, on utilise les zones ROI_1 à ROI_9 . Comme les dernières couronnes sont relativement grandes par rapport à la taille de la bille, elle contiennent souvent une certaine zone hors de la cellule. Afin de ne pas prendre en compte cette zone dans les mesures, on applique à l’image un seuillage très bas, juste au-dessus du niveau du fond : toute la cellule est ainsi prise en compte pour les mesures d’intensité, mais pas le fond.

Le disque ROI_1 , de surface environ 1,6 fois celle de la bille est pris comme zone de référence pour le calcul de la densité moyenne d’actine autour de la bille, Q' :

$$Q'(t_n) = \frac{N_1(t_n) I_1(t_n)}{I_{\text{bleach}}(t_n)} \quad (4.3)$$

où I_1 est l’intensité moyenne sur les pixels (en nombre N_1) contenus dans ROI_1 . Pour chaque disque, on calcule de la même façon l’intensité lumineuse I_i ainsi que l’aire de cellule πR_i^2 , c’est-à-dire le nombre de pixels N_i , qu’il contient et on en déduit une densité d’actine Q'_i .

On définit ensuite les couronnes situées entre deux disques successifs : de rayons moyens $r_i = (R_{i+1} + R_i)/2$ et d’épaisseur $\delta R_i = R_{i+1} - R_i = 0,5 \mu\text{m}$, elles contiennent une intensité de fluorescence moyenne $\delta Q'_i$:

$$\delta Q'_i(t_n) = \frac{Q'_{i+1}(t_n) - Q'_i(t_n)}{\pi (R_{i+1}^2 - R_i^2)} \quad (4.4)$$

4.1.3 Caractérisation du phénomène de recrutement

L'analyse des images obtenues pendant les expériences menées sur C2C12 montre une certaine diversité de réponse physiologique à l'application d'une force prolongée. Sur 29 expériences menées à leur terme, on a obtenu 11 cas positifs de recrutement, c'est-à-dire que la quantité d'actine dans le réseau Q' augmente.

Dans 7 de ces cas, soit plus de la moitié, on a observé l'apparition de points brillants autour de la bille (contenant une quantité d'actine Q croissante au cours du temps). De tels points n'étant jamais observé tant que la bille n'est pas soumise à une force¹, on peut en déduire que ces FA apparaissent en réponse à la force appliquée.

Dans les 4 autres cas, on ne voit pas ces patches apparaître, mais la quantité d'actine présente autour de la bille augmente tout de même : on appellera "diffus" ce type de recrutement.

4.1.3.1 Expériences de contrôle

On a mené des expériences de contrôle, en appliquant le laser dans les mêmes conditions (paliers pendant lesquels le laser fonctionne, suivis de temps de latence) mais en l'absence de billes liées aux cellules. Dans ces cas, on n'a jamais vu la quantité d'actine augmenter autour du point de focalisation du laser. Ainsi, on s'est assuré que le recrutement d'actine observé n'était pas dû à l'attraction non spécifique de matériel cellulaire dans le piège optique.

On a aussi mené des expériences contrôles en recouvrant les billes de BSA, de façon à empêcher tout ancrage spécifique aux intégrines. Dans ce cas, très peu de billes se lient aux cellules (à l'oeil, on évalue à moins de 10% le rapport entre le nombre de billes BSA et le nombre de billes RGD liées aux cellules après le même temps d'incubation). Parmi celles qui se lient, une grande partie (plus de la moitié) ont un ancrage très faible, et sont arrachées facilement dès l'application d'une force de piégeage minimale. La faible fraction de billes assez fortement liées aux cellules pour faire l'objet d'une expérience de fluage exhibe toutefois le même type de comportement que les billes RGD classiques. Le module viscoélastique G_0 mesuré (entre 50 et 100 Pa en moyenne) *via* BSA est plus faible que *via* RGD mais on a pu observer 2 cas de léger renforcement mécanique, accompagnés d'un certain recrutement d'actine Q' dans le réseau. On peut en déduire que celles des billes BSA qui s'ancrent le plus fortement à la surface des cellules établissent malgré tout un certain lien avec le cytosquelette d'actine. Les voies de signalisation impliquées ne sont certainement pas les mêmes que lors du renforcement *via* RGD (des récepteurs non spécifiques sont probablement nécessaires pour lier initialement la BSA à la membrane) mais elles aboutissent tout de même à recruter un peu d'actine autour de la bille. De telles observations de lien entre billes BSA et cytosquelette d'actine sous-jacent à la membrane, ainsi que le fait que l'application d'une force augmente ce lien (ce qui implique un certain renforcement mécanique) ont déjà été mentionnées [91].

On a tenté de réaliser des marquages en immunofluorescence afin de s'assurer que les contacts bille-cellule dans le cas de la BSA ne contiennent pas de protéines spécifiques des adhésions focales (comme la vinculine), mais ces expériences se sont avérées très délicates, étant donné la faible fraction de billes liées aux cellules...

4.1.3.2 Recrutement dans les contacts

On dispose, pour évaluer la quantité d'actine contenue dans les contacts, des valeurs de $Q(t_n)$ et des tailles, positions et orientations des différents patches présents autour de la bille.

¹Une même cellule comptant en général plusieurs billes liées à sa surface, il est facile de comparer une situation avec force : celle de la bille sur laquelle on applique le laser, à une situation sans force : celle d'une autre bille située sur la même cellule.

On peut donc, pour chaque expérience, recréer une image de ces patches en prenant en compte l'instant auquel ils sont détectés. En général, ils apparaissent après le deuxième ou le troisième palier, sous forme de petits points plus ou moins allongés de taille $0,2$ à $0,5 \mu\text{m}^2$. Puis ils grossissent et enfin fusionnent sous forme d'un anneau ou d'une portion d'anneau comme on peut le voir sur les deux dernières images de la figure 4.1. La figure 4.4 montre, pour cette même expérience, le schéma reconstituant la position, taille et orientation des ellipses par lesquelles on représente les FA jusqu'au temps t_7 (ensuite, les FA deviennent de plus en plus grosses puis fusionnent).

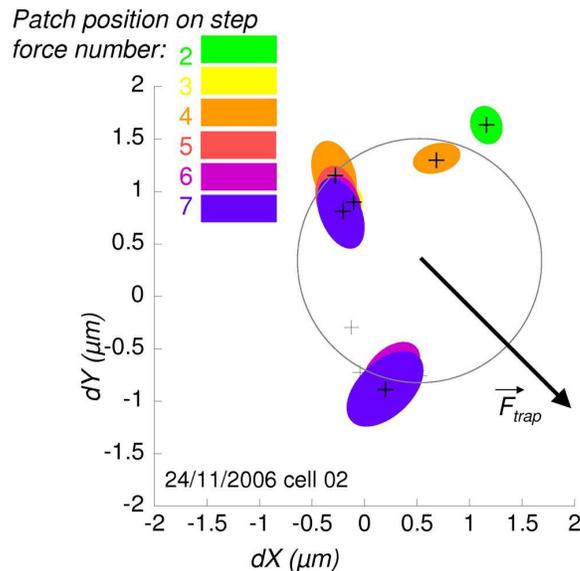


FIG. 4.4 – Schéma reconstituant les patches d'actine apparaissant autour de la bille (même expérience que celle de la figure 4.1).

On peut voir sur la figure 4.4 que la direction des patches ne semble pas être complètement aléatoire : une partie au moins de ceux-ci est nettement alignée avec la direction de la force, et évolue en grossissant dans ce sens. De façon à tester la véracité de cette hypothèse, on peut mesurer l'angle $\delta\theta$ séparant la direction de chaque FA (direction du grand axe de son ellipse) et la direction de la force appliquée. L'histogramme obtenu pour toutes les mesures est présenté sur la figure 4.5.

La répartition angulaire de l'orientation des FA n'est pas du tout aléatoire, mais très nettement piquée autour des petites valeurs : 67% des patches ont une orientation qui diffère de moins de 30 degrés de celle de la force. Cela signifie que la direction des FA apparaissant sous force est bien corrélée à la direction de la force appliquée. Ce résultat corrobore des études ayant montré la croissance des contacts focaux dans la direction de la contrainte appliquée à la cellule [89, 102] (cf. figure 1.19). Le centre de la répartition n'est cependant pas situé exactement en zéro mais en une valeur légèrement positive (6,6 deg) : ce léger biais peut être dû à un mauvais alignement entre les directions de la caméra (que l'on retrouve à la mesure sur les images) et celles du détecteur à quadrant (qui fixe l'angle d'application de la force).

Un autre paramètre à observer est la répartition de la position des patches autour de la bille : en effet, la force appliquée génère des zones de compression (à l'avant de la bille par exemple), et des zones d'extension (à l'arrière de la bille). Les contacts focaux peuvent donc apparaître de façon privilégiée dans certaines zones et non dans d'autres. L'histogramme de la figure 4.6 représente la répartition angulaire de la position des patches par rapport à l'avant de la bille

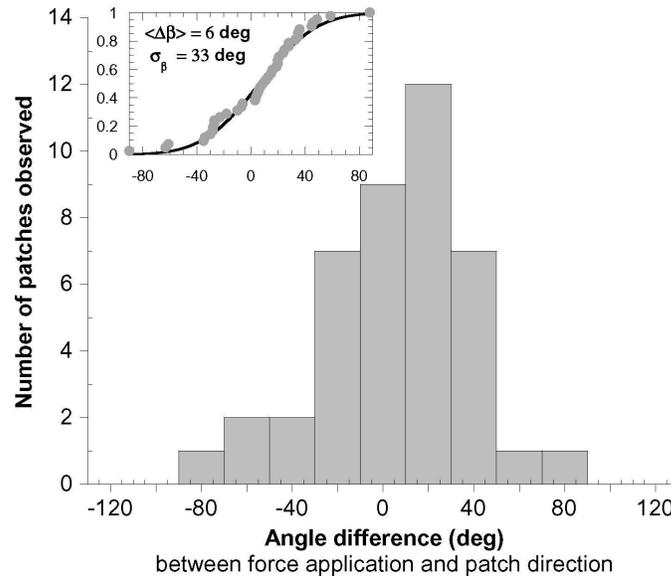


FIG. 4.5 – Histogramme représentant l'ensemble des angles entre direction des patches détectés et direction de la force appliquée (42 mesures, sur 7 cellules).

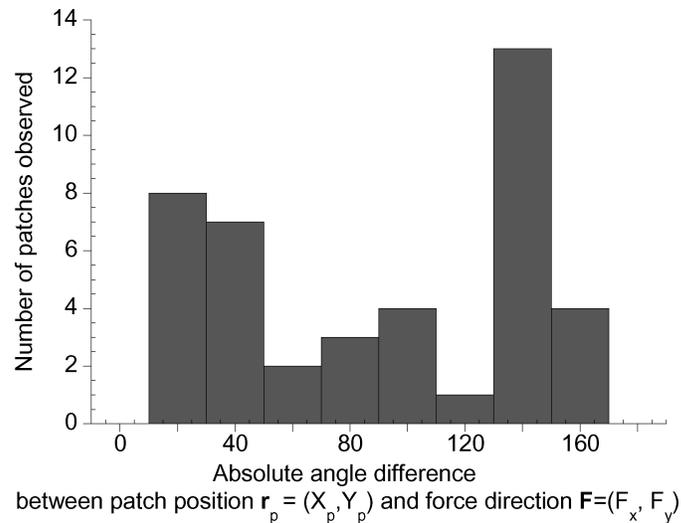


FIG. 4.6 – Histogramme représentant l'ensemble des angles entre position des patches détectés et direction de la force appliquée ; en insert : probabilité cumulative pour la détermination de la valeur moyenne de la distribution (42 mesures, sur 7 cellules).

(repérée par la direction dans laquelle la force est appliquée). Cet histogramme comporte un trou autour de 90 degrés, ce qui semble montrer que les FA apparaissent plutôt à l'avant et à l'arrière de la bille c'est-à-dire dans les zones de forte contrainte, et peut-être plus à l'arrière (extension) qu'à l'avant (compression). Il faut noter que l'allure globale des champs de contrainte et de déformation autour d'une bille partiellement immergée dans un matériau viscoélastique sur laquelle on applique une force et/ou un couple n'est a priori pas simple. Des études se penchant sur la modélisation de ces champs sont d'ailleurs en cours [67]. Une telle complexité peut expliquer que l'on n'observe aucune tendance nette dans cette répartition.

4.1.3.3 Recrutement dans le réseau

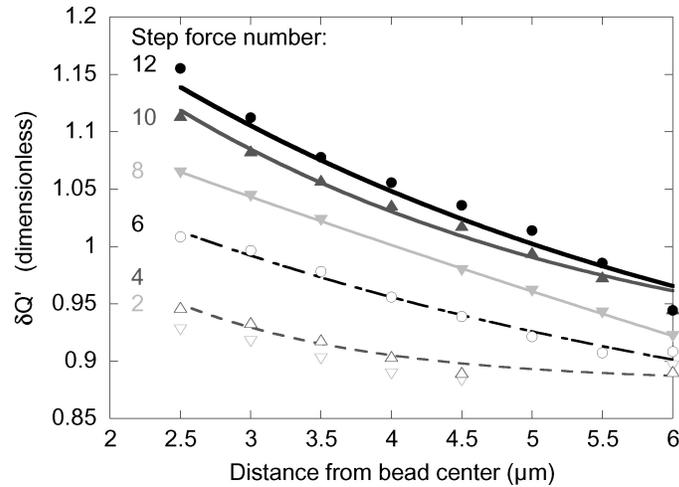


FIG. 4.7 – Densité d’actine en fonction de la distance de la couronne au centre de la bille, mesurée après différents paliers de force : $n = 2, 4, 6, 8, 10$ et 12 . Les ajustements par monoexponentielles décroissantes donnent des rayons de coupure de : $1,4$ (t_4), $5,2$ (t_6), 25 (t_8), $3,25$ (t_{10}) et $4,55$ (t_{12}) μm .

Pour évaluer l’importance du recrutement d’actine dans le réseau cytosquelettique entourant la bille, on peut regarder comment varie, au cours d’une expérience, la densité d’actine dans les différentes couronnes définies précédemment. Les valeurs de $\delta Q'_i$ prises à différents temps t_n , en fonction de la valeur du rayon moyen de la couronne r_i sont représentées sur la figure 4.7. Au début de l’expérience, la répartition d’actine est à peu près homogène autour de la bille. Avec l’application de la force, la densité d’actine dans le réseau augmente, et ce même à distance relativement grande par rapport à la taille de la bille. Les ajustements par une décroissance exponentielle en partant du centre, $\delta q'(t) = A + B \exp(-r/R_c)$, donnent un rayon de coupure R_c de l’ordre de $3,5 \mu\text{m}$ (compris, sur cet exemple, entre $1,4$ et $5,2 \mu\text{m}$, si l’on exclut la valeur de $25 \mu\text{m}$, mesurée à t_8 qui semble aberrante).

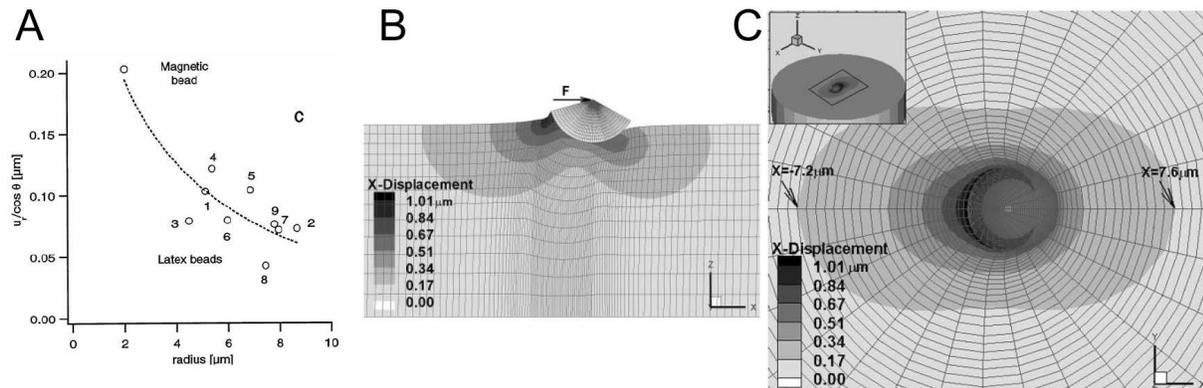


FIG. 4.8 – Mesures expérimentales (A, d’après [11]) et modélisations numériques (B : déformation du cytoplasme et C : déformation de la membrane, d’après [67]) de la portée de la déformation induite dans une cellule par application locale d’une force sur une microbille.

Cet ordre de grandeur est compatible avec les données expérimentales de Bausch et al. [11], et les modèles de Karcher et al. [67] et Ohayon et al. [92] (cf. figure 4.8). Ils évaluent la portée de la déformation et de la contrainte induites par une force ou un couple sur une bille de $4,5 \mu\text{m}$. Ils obtiennent, respectivement par des mesures et par des simulations, un rayon de coupure de 7 et $10 \mu\text{m}$. Dans le cas des simulations, le rayon de coupure est défini comme la distance à laquelle la déformation est de moins de 10% de sa valeur maximale. Cela équivaut donc, dans le cas de l'ajustement monoexponentiel décrit ci-dessus, à un rayon $R'_c = R_c \ln 10 = 2,3 R_c$. Sur l'exemple de la figure 4.7, on obtient des rayons compris entre $3,2$ et $12 \mu\text{m}$, tout à fait du même ordre de grandeur que ceux reportés dans ces études. La similitude de ces valeurs est une preuve supplémentaire du lien entre rigidité cellulaire et densité d'actine. Le niveau de recrutement d'actine serait donc directement lié au niveau de contrainte appliquée.

De plus, si on trace l'évolution de la densité d'actine dans chaque couronne en fonction du temps (cf. figure 4.9), il apparaît qu'elle augmente très nettement pour la couronne la plus proche de la bille (de rayon moyen $2,5 \mu\text{m}$), ainsi que pour les couronnes suivantes, jusqu'à un rayon de $5-5,5 \mu\text{m}$ soit environ trois fois le rayon de la bille. L'augmentation de la fluorescence en fonction du temps d'application de la force, là encore, justifie qu'on la compare à l'évolution temporelle de la rigidité cellulaire.

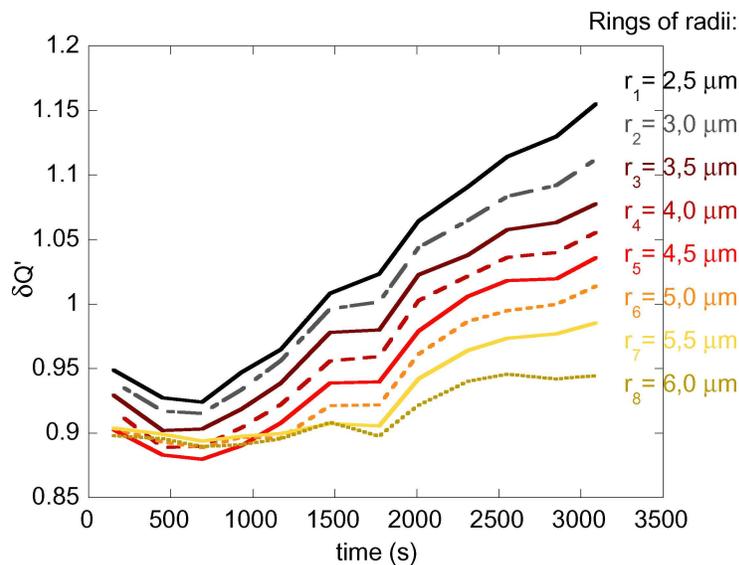


FIG. 4.9 – Densité d'actine dans les couronnes successives en fonction du temps d'application de la force.

4.2 Couplage entre renforcement et recrutement d'actine

4.2.1 Dynamiques comparées

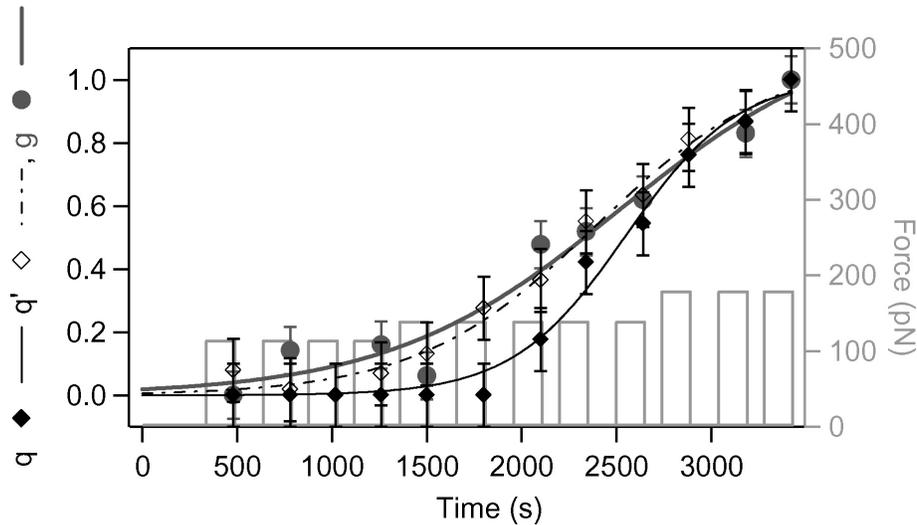


FIG. 4.10 – Evolution temporelle du module viscoélastique g (disques gris) et des densités d'actine adimensionnées q (losanges noirs pleins) et q' (losanges noirs vides).

On s'intéresse donc à la façon dont évoluent, en parallèle, la rigidité d'une cellule (quantifiée par la valeur locale du module élastique G_0) ainsi que sa densité locale d'actine. De façon à pouvoir comparer ces valeurs, on trace l'évolution des grandeurs adimensionnées : module élastique $g(t)$, quantité d'actine contenue dans les contacts $q(t)$, et densité d'actine dans le réseau entourant la bille $q'(t)$. On obtient alors des graphes similaires à celui de la figure 4.10.

L'ajustement de chacune des fonctions est réalisé par une sigmoïde (f désigne une des trois grandeurs g , q ou q') :

$$f(t) = \frac{f_{\max}}{1 + \exp(-(t - t_0)/\tau)} \quad (4.5)$$

et on obtient, dans ce cas précis, les valeurs suivantes des paramètres ajustables :

| Grandeur f | f_{\max} | t_0 (s) | τ (s) |
|--------------|------------|-----------|------------|
| q | 1,01 | 2550 | 295 |
| q' | 1,08 | 2390 | 470 |
| g | 1,18 | 2520 | 610 |

Les dynamiques de recrutement de l'actine et de rigidification cellulaire apparaissent donc très fortement corrélées : les valeurs des temps de latence t_0 sont toutes de l'ordre de 2500 s, et les temps de montée τ sont de l'ordre de plusieurs centaines de secondes, compris entre 295 et 610 s.

De plus, on peut remarquer, et c'est une tendance générale sur l'ensemble des courbes de ce type que nous avons obtenues, que le temps de montée de la rigidité τ_G est plus proche du temps de croissance de l'actine dans le réseau $\tau_{Q'}$ que de celui de l'actine dans les contacts τ_Q .

Tout d'abord, on constate que l'effet de l'application d'une force constante pendant un temps suffisamment long provoque, outre l'augmentation de la taille et du nombre des adhésions focales

liant la sonde à la cellule, une densification locale du réseau d'actine. De plus, la proximité des valeurs de τ_G et τ'_Q signifie probablement que la rigidité localement mesurée par nos expériences de fluage est déterminée par la densité locale du réseau d'actine, plus que par la densité des contacts entre la bille et la cellule.

Or ce résultat est relativement nouveau : le renforcement des cellules sous contrainte était jusqu'à présent plus attribué à un renforcement des contacts [22] qu'à une réorganisation globale du réseau d'actine à courte et moyenne portée (jusqu'à 3,5 fois la taille de la bille, comme on l'a montré précédemment).

Le tableau 4.1 résume l'ensemble des valeurs minimales, maximales, moyennes et médianes obtenues sur 11 cellules C2C12 pour les grandeurs G_0 (mesurées en début ($t = 0$) et fin ($t = t_N$) d'expérience), et pour les temps τ_G , τ_Q et τ'_Q (à partir des ajustements sigmoïdaux des croissances temporelles de g , q et q').

| Grandeur | min | max | moyenne | médiane |
|---------------------|-----|------|---------|---------|
| $G_0(t = 0)$ (Pa) | 100 | 1000 | 245 | 235 |
| $G_0(t = t_N)$ (Pa) | 420 | 2100 | 905 | 1000 |
| τ_G (s) | 90 | 2000 | 630 | 430 |
| τ_Q (s) | 115 | 835 | 370 | 280 |
| τ'_Q (s) | 230 | 875 | 510 | 540 |

TAB. 4.1 – Grandeurs mesurées sur 11 C2C12 transfectées à l'actine GFP : modules élastiques en début ($G_0(t = 0)$) et fin ($G_0(t = t_N)$) d'expérience, et paramètres des ajustements sigmoïdaux sur les évolutions temporelles de g (τ_G), q (τ_Q) et q' (τ'_Q).

4.2.2 Influence de divers paramètres

4.2.2.1 Effet de la transfection

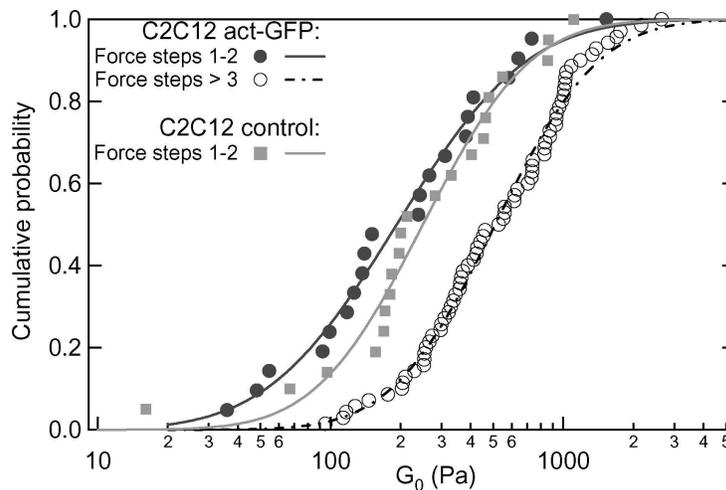


FIG. 4.11 – Répartition statistique des valeurs de G_0 mesurées sur C2C12 transfectées à l'actine GFP, pendant le premier ou le deuxième palier de force (disques gris pleins) et pendant les suivants (cercles noirs vides) ; mesures contrôles sur C2C12 non transfectées pendant le premier ou deuxième palier de force (carrés gris clair).

Transfecter des cellules à l'aide d'un plasmide codant pour une protéine signifie que l'on force la cellule à exprimer cette protéine. Dans notre cas, la transfection a pour effet de faire exprimer de l'actine fluorescente en plus de l'actine exprimée à la base par la cellule. On peut donc se demander si cette surexpression d'actine ne risque pas de modifier les propriétés mécaniques des cellules. C'est pourquoi il est important de comparer la valeur de la rigidité des cellules transfectées avec les valeurs obtenues sur les mêmes cellules sans transfection. C'est aussi la raison pour laquelle on choisit toujours, pour la manipulation, des cellules peu fluorescentes : on évite ainsi les cellules dans lesquelles l'actine risque d'être trop surexprimée. Les répartitions statistiques représentées sur la figure 4.11 confirment que la transfection n'altère pas la rigidité des cellules. Les ajustements par des fonctions erreur des probabilités cumulatives donnent :

- pour les C2C12 actine-GFP, paliers de force 1 et 2 (21 mesures) : $\langle \log G_0 \rangle = 2,28 \pm 0,10$, soit $G_{0,\text{med}} = 190 \text{ Pa}$ ($-40/+45$)
- pour les C2C12 non transfectées, paliers de force 1 et 2 (21 mesures) : $\langle \log G_0 \rangle = 2,40 \pm 0,08$, soit $G_{0,\text{med}} = 250 \text{ Pa}$ ($-40/+50$)
- pour les C2C12 actine-GFP, paliers de force ≥ 3 (70 mesures) : $\langle \log G_0 \rangle = 2,71 \pm 0,04$, soit $G_{0,\text{med}} = 510 \text{ Pa}$ ($-45/+50$)

On obtient même un module G_0 légèrement plus faible sur cellules transfectées que sur cellules non transfectées : cela est probablement dû au fait que le protocole de transfection est relativement agressif pour les cellules (on force l'entrée de corps étrangers dans la cellule, et on modifie son expression génétique).

On remarque encore une fois, sur ces courbes, l'importance du phénomène de rigidification : l'ensemble des modules élastiques des cellules augmente très nettement entre les deux premiers paliers de force et les suivants.

4.2.2.2 Dépendance en force

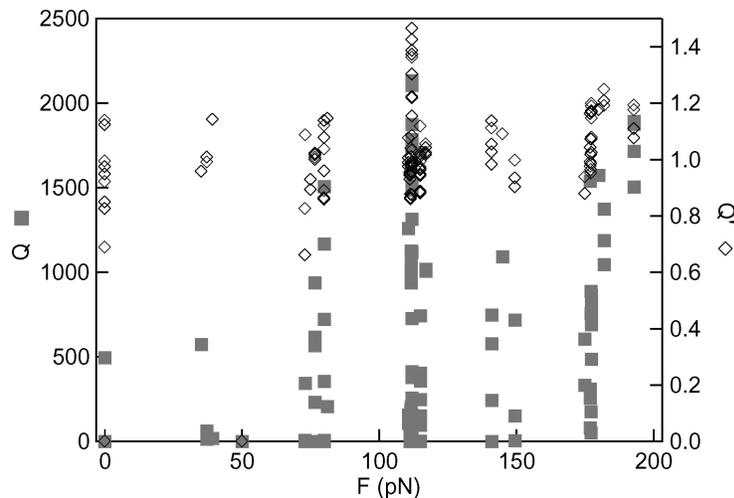


FIG. 4.12 – Quantité d'actine dans les contacts (Q , carrés gris pleins) et densité de fluorescence dans le réseau (Q' , losanges noirs vides) en fonction de l'amplitude de la force appliquée. Q et Q' sont exprimés en unités arbitraires.

On a évoqué le fait que, souvent, au cours d'une expérience de renforcement, on est obligé d'augmenter la force appliquée de façon à s'adapter à la rigidité cellulaire qui augmente. On ne peut donc pas facilement déceler d'éventuelles tendances de variation des paramètres (τ_Q , τ'_Q et τ_G par exemple) en fonction de la force appliquée. Ce que l'on peut tout de même constater, c'est

que l'amplitude de la force appliquée semble avoir un effet sur le recrutement, ou non, d'actine dans les contacts.

La figure 4.12 représente l'ensemble des valeurs de Q et Q' mesurées sur toutes les C2C12, en fonction de F . On constate que la quantité d'actine dans les contacts Q est presque complètement nulle tant que la force appliquée est inférieure à une valeur seuil, qui vaut ici $F_{\text{seuil}} \sim 75$ pN. Bien sûr, cette valeur est spécifique à nos conditions expérimentales (type de cellules, taille et coating de la bille, etc), et ne revêt aucun caractère absolu, mais cette observation d'une valeur de force minimale nécessaire à l'apparition des adhésions focales confirme, là encore, ce qui est présenté dans la littérature ([7] et, plus généralement, cf. 1.2.4). On peut aussi noter que la densité d'actine dans le réseau Q' a une tendance à l'augmentation avec la force, mais n'est bien entendu pas nulle à $F < F_{\text{seuil}}$ (le réseau d'actine est présent même sans force extérieure appliquée à la bille).

4.2.2.3 Relaxation de la fluorescence ?

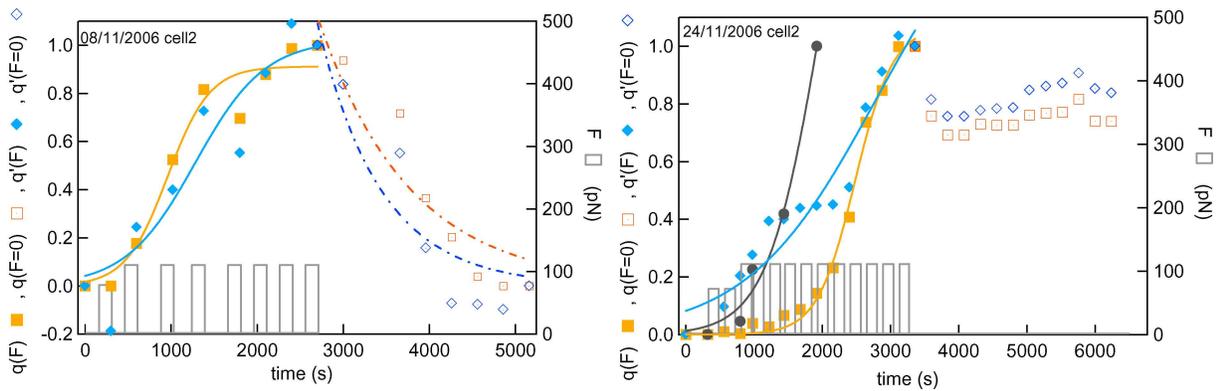


FIG. 4.13 – Evolution de la densité d'actine dans les contacts (carrés oranges) et dans le réseau (losanges bleus) ainsi que du module élastique (disques gris, à droite seulement) en fonction du temps d'application de la force (symboles pleins) puis pendant la relaxation (symboles pointés), pour deux expériences différentes. L'ajustement des courbes à $F \neq 0$ est fait par une sigmoïde, celui des courbes à $F = 0$ par une exponentielle décroissante.

Quand on l'a pu, après les expériences au cours desquelles on a observé du recrutement, on a laissé la cellule relaxer en l'absence de force tout en continuant à mesurer la quantité d'actine présente dans le réseau et dans les contacts. Les types de comportement observés sont très disparates, comme illustré par les deux exemples de la figure 4.13. Dans certains cas, comme sur le graphe de gauche, la fluorescence diminue au cours du temps. La décroissance est alors ajustée par une monoexponentielle $f(t) = f_{\text{rel}} + \exp(-(t - t_{\text{rel}})/\tau_{\text{rel}})$ (la croissance est ajustée, comme précédemment, par une sigmoïde).

| Grandeur f | f_{max} | t_0 (s) | τ (s) | f_{rel} | t_{rel} (s) | τ_{rel} (s) |
|--------------|------------------|-----------|------------|------------------|----------------------|-------------------------|
| q | 0,91 | 960 | 245 | 0 | 2820 | 1055 |
| q' | 1,02 | 1280 | 405 | 0 | 2765 | 735 |

Les temps de décroissance τ_{rel} semblent tout de même plus grands que les temps de montée τ des sigmoïdes. Mais le nombre d'expériences où la quantité d'actine décroît après arrêt de la force est trop faible pour donner un ordre de grandeur de ces temps de relaxation.

Dans d'autres cas, comme sur le graphe de droite, on ne constate pas de décroissance notable sur un temps de l'ordre du temps laissé à la montée (plusieurs milliers de secondes soit plus d'une demi-heure).

Cette disparité de situations observées ne permet donc pas de conclure sur l'existence ou non d'un phénomène de relaxation de la densité d'actine dans le réseau ou dans les contacts après arrêt de la force appliquée.

4.2.2.4 Temps mesuré et temps effectif

Dans notre protocole expérimental, on applique des paliers de force suivis de temps de latence d'une durée à peu près égale. On peut donc supposer que la cellule n'a pas la même réponse que si on lui appliquait une force constante de façon continue. Les temps de réponse mesurés lors de nos expériences de renforcement sont de ce fait à prendre avec précaution.

L'hypothèse la plus simple est que l'on mesure des temps doubles des temps "effectifs", qui correspondraient à une situation où la cellule est soumise à une force constante continue : $\tau_{\text{eff}} \simeq \tau_{\text{mes}}/2$.

Cependant, s'il y a relaxation (de G_0 , Q et Q') pendant le temps de latence, on mesure certainement des temps $\tau_{\text{mes}} > 2\tau_{\text{eff}}$.

4.3 Un modèle pour le couplage renforcement/recrutement ?

Jusqu'à présent, pour analyser nos résultats de dynamique du recrutement d'actine et du renforcement, on s'est contenté d'utiliser des ajustements sigmoïdaux, sans justifier le choix de cette fonction (outre le fait qu'une sigmoïde croît après un certain temps de latence puis sature à une valeur seuil, ce qui correspond à nos observations).

Afin d'interpréter plus en profondeur nos résultats, on souhaite utiliser un modèle comportemental, permettant de décrire les dynamiques observées en terme de paramètres mécaniques ou biologiques de la cellule.

Afin de comprendre quels phénomènes peuvent régir la viscoélasticité d'un milieu aussi complexe que la cellule, on commence par s'intéresser à un système modèle : un gel. Et plus spécifiquement un gel d'actine, étant donné le rôle des microfilaments dans les propriétés mécaniques des cellules (cf. 1.1.3).

4.3.1 Elasticité des gels d'actine *in vitro*

Les gels d'actine assemblés *in vitro* constituent un intermédiaire utile pour comprendre les propriétés viscoélastiques des cellules. En effet, dans ces systèmes, on peut contrôler la concentration en actine, en agents réticulants (cross-linkers) et en moteurs moléculaires, de façon à isoler les contributions de chaque type de molécules à la viscoélasticité cellulaire.

4.3.1.1 Solutions de polymères semi-flexibles

Des modèles de polymères semi-flexibles ont été développés [63] pour décrire le comportement des filaments tels que l'actine, pour lesquels la résistance à la courbure est forte [72]. Ces filaments sont caractérisés, comme évoqué au 1.1.3, par leur longueur de persistance ou leur rigidité de courbure (les deux grandeurs étant reliées par : $l_p \sim \frac{\kappa}{k_B T}$).

Pour une solution de filaments d'actine, en concentration c_A (supérieure à la concentration critique d'enchevêtrement), on voit apparaître deux longueurs caractéristiques : la distance ξ entre mailles de ce réseau de polymères, qui dépend de la concentration et de la taille transverse a du filament $\xi^2 = 1/ac_A$; et la longueur d'enchevêtrement L_e , longueur moyenne entre deux points de contact successifs d'un filament avec les filaments voisins ($L_e \geq \xi$).

On prévoit, pour le module élastique G d'une telle solution de chaînes polymères enchevêtrées [80] :

$$G \sim \frac{\kappa^2}{k_B T \xi^2 L_e^3} \quad (4.6)$$

Or, en prenant en compte les fluctuations transverses d'un polymère au sein du réseau, on obtient pour L_e une dépendance en fonction de la concentration en actine [62] :

$$L_e \sim \left(\frac{\kappa}{k_B T} \right)^{1/5} (ac_A)^{-2/5} \quad , \quad (4.7)$$

ce qui donne une dépendance du module élastique G de ce gel [80], de la forme :

$$G \sim \kappa \left(\frac{\kappa}{k_B T} \right)^{2/5} (ac_A)^{11/5} \quad . \quad (4.8)$$

4.3.1.2 Effet des agents réticulants : gels de polymères

La présence d'agents réticulants branchant les filaments d'actine les uns avec les autres, ou les organisant sous forme de fibres épaisses transforme le système de liquide en gel, ce qui peut avoir un effet sur ses propriétés rhéologiques.

A faible concentration c_c de réticulants, le réseau se comporte encore comme la solution décrite précédemment. A plus forte densité cependant, il faut prendre en compte une distance entre crosslinks L_c à la place de la distance d'enchevêtrement L_e . Une hypothèse simple est que cette distance varie comme $L_c \sim c_c^y L_e$ ce qui donne alors une dépendance [115] :

$$G \sim \frac{\kappa^{7/5}}{(k_B T)^{2/5}} (c_c^y)^3 c_A^{11/5} \quad . \quad (4.9)$$

Les valeurs de y mesurées diffèrent selon les types d'agents réticulants : par exemple, Tharmann et coll. [115] mesurent une dépendance en $c_c^{1,2}$ (soit $y = 0,4$) pour un gel réticulé à l'aide de fragments de myosines (meromyosines) dans un état passif (ce qui donne un gel réticulé de façon relativement isotrope) alors que Gardel et al. [46] obtiennent $G \sim c_c^2$ pour un gel réticulé par des scruiines (ce qui forme un réseau contenant à la fois des fibres et des enchevêtrements ("cross-linked and bundled")).

A très forte concentration c_c en réticulants, L_c devient même égale à la taille des mailles du réseau ξ , et la dépendance du module élastique en fonction de la concentration d'actine devient un peu plus marquée [80] :

$$G \sim \frac{\kappa^2}{k_B T} (ac_A)^{5/2} \quad . \quad (4.10)$$

4.3.1.3 Effet des moteurs moléculaires

Les myosines jouent, au sein du réseau d'actine, le double rôle d'agents réticulants (rôle passif) et de moteurs permettant de faire coulisser les filaments entre eux (rôle actif).

En leur présence, des tensions internes apparaissent dans le gel, augmentant énormément sa rigidité. En fonction de la concentration en ATP (car les myosines ont besoin de consommer cette énergie chimique pour se déplacer le long des filaments), on peut observer jusqu'à une multiplication par un facteur 100 de G [87]. De plus, leur effet va se manifester très nettement dans la réponse dynamique $G(\omega)$: la rhéologie des gels dits "actifs" diffère notamment de celle des gels "passifs" par l'augmentation des phénomènes dissipatifs [76, 87].

4.3.1.4 Effet de la précontrainte

L'application d'une précontrainte modifie aussi la rigidité des gels d'actine réticulés. Cela semble avoir le même effet que la présence de moteurs de type myosine [G. Koenderink, communication privée]. Cette propriété contribue à rapprocher grandement les systèmes modèles du comportement des cellules vivantes.

4.3.1.5 Lien avec nos mesures

On peut comparer les prévisions dérivées de ces systèmes modèles avec nos mesures de rigidité cellulaire et de quantité d'actine. Les graphes de la figure 4.14 représentent G_0 en fonction de la quantité d'actine Q dans les contacts (gauche) ou Q' dans le réseau (droite). L'ajustement par une loi de puissance $G_0(x) = \Lambda x^\lambda$ est impossible pour $G_0(Q)$, il faut rajouter une ordonnée à l'origine f_0 car G_0 est à peu près indépendant de la valeur de Q (on obtient $f_0 = 457$ Pa, $\Lambda = 1,4 \cdot 10^{-3}$ Pa et $\lambda = 1,7$). En revanche, pour $G_0(Q')$, l'ajustement donne : $\Lambda = 545 \pm 55$ Pa

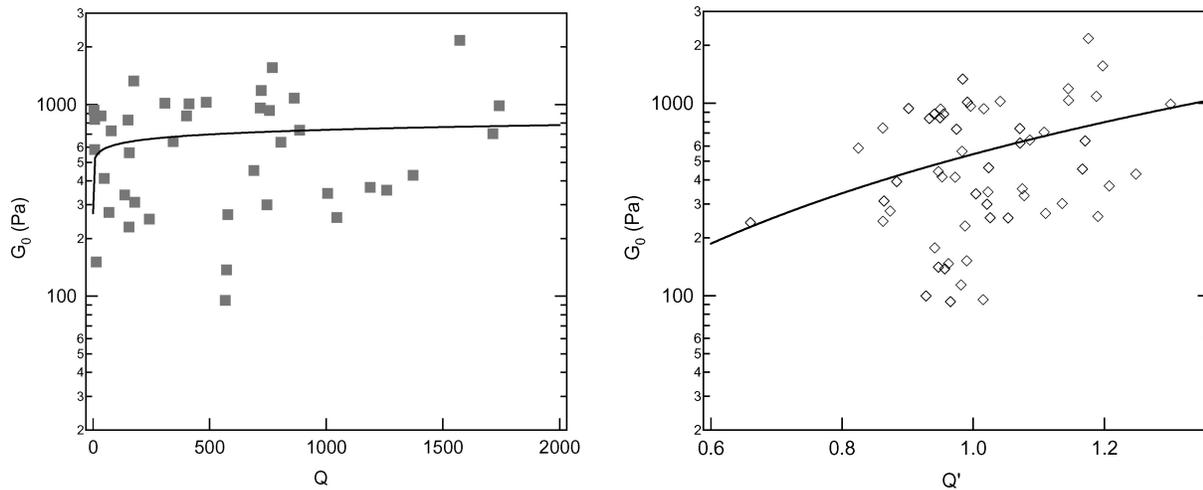


FIG. 4.14 – Valeurs mesurées pour la rigidité G_0 en fonction de la quantité d’actine au niveau des contacts (Q , à gauche, pour lequel on a enlevé les valeurs $Q = 0$) ou dans le réseau (Q' , à droite). Les ajustements sont réalisés par des lois de puissance : $G_0(x) = \Lambda x^\lambda$: pour Q' on obtient $\Lambda = 545 \pm 55$ Pa et $\lambda = 2,10 \pm 0,85$.

et $\lambda = 2,10 \pm 0,85$. Or cette valeur de λ est très proche de celles prévues sur les gels modèles, que ce soit $11/5 = 2,2$ ou $5/2 = 2,5$. Cela confirme l’idée que la valeur du module élastique G_0 est due en grande partie à la densité d’actine dans le réseau, et cela justifie notre utilisation de Q' comme évaluation de la densité d’actine dans le réseau du cytosquelette. De plus, ces deux graphes montrent que par nos expériences de fluage, on mesure bien la contribution viscoélastique du cytosquelette et non des liens bille-cellule.

4.3.2 Actine intracellulaire : agrégation dans les contacts et densité du réseau

4.3.2.1 Modélisations de l’agrégation de molécules de contact

Plusieurs études se sont récemment penchées sur une modélisation de la façon dont les protéines de contact sont recrutées au niveau des adhésions focales sous l’action d’une force.

Il a été montré, tout d’abord, que l’incorporation de molécules au sein des contacts devait être un processus exothermique, pour pouvoir observer le phénomène de croissance des FA sous l’effet d’une force [89]. Alors, le modèle prévoit une croissance des adhésions focales à vitesse v_0 , dont le comportement en fonction de la force est représenté sur la figure 4.15 [14]. Il existe notamment une force critique en-dessous de laquelle les adhésions rétrécissent, et au-delà de laquelle elles croissent.

Dans cette étude, la force considérée est en fait une force par unité de surface de la plaque d’adhésion. En effet, à force extérieure F donnée, plus la plaque d’adhésion est grande, moins chaque molécule est étirée (on peut penser à un ensemble de N ressorts de même rigidité k , mis en parallèle : chaque ressort est étiré de $F/(Nk)$. C’est comme s’il ressentait une force effective de F/N). On notera par la suite cette force par unité de surface, ou contrainte :

$$\sigma = \frac{F}{S} \quad (4.11)$$

où S est la surface de la plaque d’adhésion.

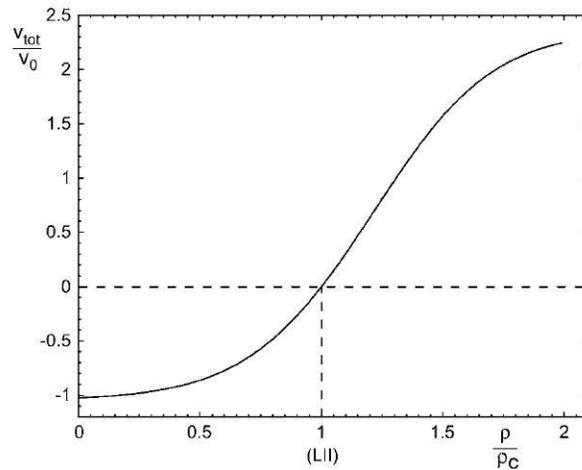


FIG. 4.15 – Vitesse de croissance des adhésions focales en fonction de la force adimensionnée par la force critique (valeur minimale pour passer de la décroissance à la croissance des FA sous force) [D’après [14]].

4.3.2.2 Lien avec nos expériences de recrutement

Pour analyser nos expériences de recrutement sous force, on souhaite décrire la dynamique observée à la fois au niveau de la réponse mécanique et au niveau de la réponse physiologique. On cherche donc à relier, par un système d’équations couplées, la dynamique d’évolution des FA avec celle de la rigidité cellulaire, *via* la force transmise au réseau d’actine au niveau des contacts.

Pour cette description empirique, on souhaite tenir compte des diverses études décrivant que l’application d’une force provoque l’activation de molécules signalisantes (par exemple la kinase Src dans l’étude de Wang et coll. [132] : cf. figure 1.18). On ne considérera ici qu’une seule voie de signalisation, sachant qu’il en existe de multiples, mais que l’on souhaite seulement décrire ce phénomène dans le principe. On désignera par la variable $u(t)$ le degré d’activation de la molécule au cours du temps : $u = 0$ signifie que la molécule n’est pas activée, et $u = 1$ est le niveau d’activation maximal. C’est cette activation que l’on considère comme étant sensible à la contrainte ressentie au niveau d’une molécule du contact.

On considère que l’on est dans le régime proche de la force critique, car les forces que l’on applique (~ 100 pN) sont relativement faibles par rapport aux forces que peuvent développer les cellules sur un substrat (des nN voire des dizaines de nN). On peut donc approximer l’activation en réponse à la force par une loi linéaire. On suppose de plus que l’activation connaît une saturation lorsqu’elle atteint le niveau $u = 1$. On écrit alors son évolution comme :

$$\frac{du}{dt} = A \sigma (1 - u) = A \frac{F}{S} (1 - u) \quad . \quad (4.12)$$

Afin de relier F/S à la quantité d’actine détectée dans les contacts autour de la bille, $Q(t)$, on va considérer que ces contacts croissent de façon isotrope dans les trois directions² : $Q \propto l^3$ où l

²Les études de Besser et coll. [14] ou Nicolas et coll. [89] s’inspirent entre autres des expériences de Riveline et coll. [102] pour considérer une croissance à 1 ou 2 dimensions, dans le cas où la force est appliquée parallèlement à la plaque d’adhésion. Mais dans notre cas, le champ de contrainte est probablement trop compliqué pour que l’on puisse faire cette hypothèse, et on a vu au 4.1.3.2, sur la figure 4.4, que les patches sont de forme elliptique mais pas aussi allongée que sur les images de Riveline et coll. C’est pourquoi on fait cette hypothèse de croissance isotrope. Cependant, que la dépendance finale de du/dt soit en $1/Q$ ou $1/Q^{2/3}$ ne change globalement pas l’allure des courbes de recrutement et de renforcement.

est la taille de la plaque d'adhésion. Donc la surface S de cette plaque vaut : $S = l^2 = Q^{2/3}$ et on écrit finalement :

$$\frac{du}{dt} = A \frac{F}{Q^{2/3}} (1 - u) \quad . \quad (4.13)$$

On considère ensuite que les contacts croissent en réponse à l'activation u , tout en connaissant aussi une saturation à $Q = Q_{max} = 1$:

$$\frac{dQ}{dt} = B u (1 - Q) \quad . \quad (4.14)$$

La description de l'évolution de la quantité d'actine dans le réseau, $Q'(t)$, part d'un principe similaire. Les molécules impliquées dans les voies de signalisation liées à l'adhérence et à la mécanotransduction agissent principalement sur la contractilité *via* les myosines³. En supposant que ces molécules activées aient pour effet de réorganiser le réseau en faisant coulisser les filaments d'actine les uns par rapport aux autres, on peut considérer que l'accroissement de la densité d'actine autour de la zone d'application de force est proportionnelle à l'activation de ces molécules et à la densité du réseau déjà présent. On peut aussi supposer qu'il existe une certaine saturation ralentissant ce phénomène quand la densité d'actine devient très importante. C'est pourquoi on écrit :

$$\frac{dQ'}{dt} = C u Q' (1 - u Q') \quad . \quad (4.15)$$

Finalement, on écrit le module élastique en fonction de Q' et u comme :

$$G_0(t) = G_0(0) + D u^y Q'^{11/5} \quad (4.16)$$

où y est l'exposant décrit au 4.3.1.2. On considère pour cela, de façon simple, que la concentration en protéines réticulant les filaments entre eux est proportionnelle à l'activation u .

La résolution de ce jeu de quatre équations couplées donne, pour $u(t)$, $Q(t)$, $Q'(t)$ et $G_0(t)$ les graphes de la figure 4.16. On réussit donc bien à modéliser un comportement de croissance sigmoïdale, avec des paramètres A , B , C et D pris de façon à obtenir des temps de montée de l'ordre de la centaine de secondes. On peut constater l'influence de la force appliquée : plus F est grande, plus la croissance des contacts et de la densité du réseau est rapide. Mais alors la densité d'actine du réseau et le module élastique semblent saturer plus rapidement, et à des valeurs légèrement plus faibles. Ce résultat est un peu étonnant, et pourrait être dû au fait que l'on n'a pas introduit de dépendance en force dans la saturation de ces grandeurs.

Ce petit modèle descriptif n'est qu'une ébauche de l'interprétation des phénomènes que l'on observe, mais permet tout de même de comprendre l'allure des dynamiques observées pour la rigidité cellulaire et les recrutements d'actine. De nombreuses améliorations pourraient y être apportées : on pourrait, par exemple, prendre en compte la diffusion ou la propagation sous forme d'onde des molécules activées ($u(r, t)$), pour mieux rendre compte du phénomène décrit dans l'article de Wang et coll. [132].

L'approfondissement de ce développement théorique serait intéressant pour envisager des expériences futures, dans le but d'élucider toujours un peu plus le lien entre propriétés mécaniques et caractères biologiques des cellules.

³Il est souvent question de l'activation des chaînes légères de myosines par phosphorylation.

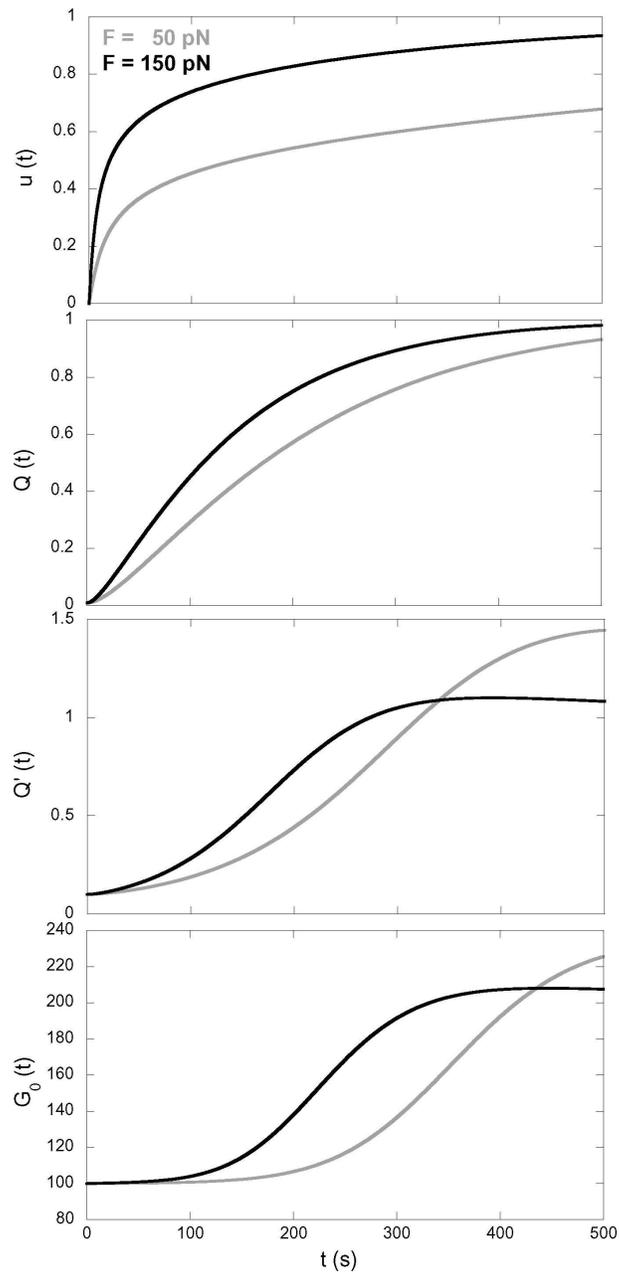


FIG. 4.16 – Evolutions temporelles de $u(t)$, $Q(t)$, $Q'(t)$ et $G_0(t)$ obtenues par résolution d'équations différentielles couplées. Les paramètres valent, sur cet exemple : $A = 2.10^{-5}$, $B = 10^{-2}$, $C = 2.10^{-2}$, $D = 100$, et $y = 1, 5$. L'influence de la force est examinée en prenant $F = 50$ (courbes grises) et $F = 150$ pN (courbes noires).

Conclusion et perspectives

Au cours de ce travail, nous avons caractérisé certains des phénomènes mécaniques et physiologiques intervenant dans l'adaptation d'une cellule en réponse à l'application prolongée d'une force. Les outils développés pour cette étude ont englobé plusieurs champs.

Tout d'abord, pour appliquer à chaque cellule une force locale à l'aide de microbilles, nous avons tiré parti du dispositif de pinces optiques existant au laboratoire. Ensuite, pour effectuer des mesures de mécanique en régime de fluage, nous avons mis en place un système de rétroaction permettant de maintenir la force constante sur des temps de l'ordre de la centaine de secondes. Pour cela, nous avons utilisé un détecteur à quadrant, dont le signal analogique amplifié donne une mesure précise et rapide de la force appliquée. Le traitement numérique de ce signal asservit la force (en module et en direction) sur une valeur de commande. Les mesures de viscoélasticité ainsi réalisées sur plusieurs types cellulaires ont confirmé un comportement rhéologique "universel" : la fonction de fluage d'une cellule unique obéit à une loi de puissance du temps, du type $J(t) = At^\alpha$, sur la gamme 0,02–50 s. Le préfacteur A et l'exposant α conduisent respectivement à des estimations de la rigidité de la cellule, et de son caractère dissipatif.

Une fois munis de cet asservissement, nous avons pu observer l'effet à long terme d'une répétition de l'application de la force sur la viscoélasticité cellulaire. Nous avons alors constaté que la cellule s'adapte à cette contrainte externe en augmentant sa rigidité. Ce renforcement sous contrainte est une manifestation du caractère actif des cellules, et de leur capacité à intégrer les signaux mécaniques ressentis afin de les traduire en terme de modifications physiologiques.

Parallèlement à cette caractérisation mécanique, et afin de corrélérer ces modifications physiologiques avec des événements biochimiques intracellulaires, nous avons mis en place un dispositif de détection de fluorescence. Des mesures semi-quantitatives de la densité d'actine au sein du cytoplasme et au niveau des contacts ont mis en évidence un recrutement d'actine venant à la fois densifier le réseau et renforcer les adhésions focales autour du point d'application de la force. La dynamique de ce recrutement est ici caractérisée pour la première fois, et comparée à celle de la rigidification cellulaire concomitante. Un petit modèle cinétique permet de comprendre l'allure de ces évolutions en réponse à la force extérieure.

De nombreuses pistes restent toutefois à explorer pour continuer à élucider l'ensemble des phénomènes intervenant dans l'adaptation d'une cellule aux contraintes mécaniques exercées par son environnement.

Une première piste consiste à approfondir le modèle théorique succinctement développé ici pour interpréter nos observations. L'objectif serait de prédire ainsi à la fois les résultats de nos expériences de recrutement/renforcement sous force constante, et les observations faites dans le cadre, différent et complémentaire, des expériences de multipliégeage en rigidité variable réalisées à l'Institut Jacques-Monod.

Une deuxième piste, suite directe de nos expériences, serait de déterminer la nature de la réorganisation du cytosquelette d'actine observée. Observe-t-on une polymérisation de l'actine globulaire déjà présente autour de la zone d'adhésion ? Ou bien est-elle recrutée depuis d'autres zones de la cellule ? Ou encore la cellule enclenche-t-elle une synthèse supplémentaire d'actine en

réponse à une des voies de signalisation liées à la mécanotransduction ? Enfin, le renforcement du réseau se fait-il uniquement par densification du cortex (gel réticulé) ou aussi par apparition de fibres de stress (structures sous tension et contractiles) ? Pour répondre à ces interrogations, il faudrait imager de façon globale et différentielle le cytosquelette cellulaire : par exemple, en se focalisant sur les points d'ancrage de la face basale, on pourrait voir la naissance ou le grossissement de fibres de stress. Des dispositifs plus pointus de détection de fluorescence, comme l'imagerie confocale ou le traitement d'images par déconvolution, seraient alors utiles.

Une troisième piste consiste à modifier le type d'ancrage entre la cellule et l'extérieur : nous avons utilisé un peptide mimant l'adhésion cellule-matrice, mais on peut aussi s'intéresser aux protéines assurant le lien cellule-cellule (les cadhérines) de façon à mieux comprendre, par exemple, la transmission des forces au sein d'un tapis épithélial. Nous avons utilisé aussi, pour des expériences de microrhéologie en régime dynamique, des molécules (les ICAM1) intervenant dans les liaisons entre cellules de types différents, par exemple pour le déplacement de cellules immunitaires évoluant sur une couche de cellules épithéliales. Il serait intéressant de voir si ces liens sont susceptibles de se renforcer en réponse à une force appliquée, ou si les fonctions physiologiques qu'elles remplissent, très différentes de celles des adhésions cellule-matrice, conduisent à une réponse différente.

Une quatrième piste consiste à explorer certaines des voies de signalisation intervenant dans le renforcement sous contrainte. La façon usuelle de procéder est en général d'inhiber une de ces voies, par des signaux biochimiques (drogues) ou par modification génétique (souches mutantes), et de regarder quel est le comportement résultant de la cellule. On peut penser par exemple à la kinase Src, à la GTPase Rho ou à une de leurs cibles.

Une dernière piste, enfin, serait de caractériser ce phénomène en fonction des diverses zones existant au sein même de la cellule. En effet, nous avons déjà constaté qualitativement, au cours de nos expériences, que selon la forme de la cellule et l'endroit où se trouve la bille, la réponse à une force appliquée semble différente. La réponse semble plus active sur le front "avant" de la cellule (une sorte de lamellipode) que sur ses côtés ou à l'arrière, comme si elle était "préparée" à ne pas répondre aux mêmes types de phénomènes mécano-chimiques en ces différents endroits. La polarisation naturelle d'une cellule faisant intervenir une organisation spatiale complexe d'un très grand nombre de molécules, il semble difficile de répondre à cette question. Mais l'utilisation de patrons adhésifs confinant la cellule dans une géométrie donnée peut permettre d'isoler des zones cellulaires différentes tant au niveau biologique (présence de fibres de stress ou non) qu'au niveau topologique (zone allongée dans une direction ou une autre), et de regarder comment la force, selon sa direction notamment, agit en ces différentes régions.

Bibliographie

- [1] Alberts et al., Biologie moléculaire de la cellule (Troisième édition), *Flammarion Médecine-Sciences pour l'édition française* (1995).
- [2] Abraham et al., The actin-based nanomachine at the leading edge of migrating cells, *Biophys. J.* **77**, 1721-1732 (1999).
- [3] Allaway et al., Optical traps : shedding light on biological processes, *Biotechno. Let.* **22**, 887-892 (2000).
- [4] Alcaraz et al., Microrheology of human lung epithelial cells measured by atomic force microscopy, *Biophys. J.* **84**, 2071-2079 (2003).
- [5] An et al., Stiffness changes in cultured airway smooth muscle cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **283**, C792-C801 (2002).
- [6] Ashkin et al., Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles, *Optics Letters* **11**, 288-290 (1986).
- [7] Balaban et al., Force and focal adhesion assembly : a close relationship studied using elastic micropatterned substrates, *Nature Cell Biol.* **3**, 466-473 (2001).
- [8] Balland et al., The dissipative contribution of myosin II in the cytoskeleton dynamics of myoblasts, *Eur. Biophys. J.* **34**, 255-61 (2005).
- [9] Balland M., Etude microrhéologique du réseau d'actine des cellules en culture en présence de facteurs biochimique modifiant sa dynamique, *thèse de doctorat de l'Université Paris 7 - Denis Diderot* (2004).
- [10] Balland et al., Power laws in microrheology experiments on living cells : Comparative analysis and modelling, *Phys. Rev. E* **74**, 021911 (2006).
- [11] Bausch et al., Local measurements of viscoelastic parameters of adherent cell surfaces by magnetic bead microrheometry, *Biophys. J* **75**, 2038-2049 (1998).
- [12] Bausch et al., Measurements of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers, *Biophys. J* **76**, 573-579 (1999).
- [13] Bausch et al., A bottom-up approach to cell mechanics, *Nature Phys.* **2**, 231-238 (2006).
- [14] Besser et al., Force-induced adsorption and anisotropic growth of focal adhesions, *Biophys. J.* **90**, 3469-3484 (2006).
- [15] Bockelmann et al., DNA strand separation studied by single molecule force measurement, *Phys. Rev. E* **58**, 2386-2394 (1998).
- [16] Boukellal et al., Soft *Listeria* : actin-based propulsion of liquid drops, *Phys. Rev. E* **69**, 061906 (2004).
- [17] Brakebusch et al., The integrin-actin connection, an eternal love affair, *EMBO J.* **22**, 2324-2333 (2003).
- [18] Bursac et al., Cytoskeletal remodelling and slow dynamics in the living cell, *Nat. Mat.* **4**, 557-561 (2005).

- [19] Bursac et al., Cytoskeleton dynamics : fluctuations within the network, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* doi :10.1016/j.bbrc.2007.01.191 (2007).
- [20] Chen et al., Geometric control of cell life and death, *Science* **276**, 1425 (1997).
- [21] Chen et al., Mechanotransduction at cell-matrix and cell-cell contacts, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **6**, 275-302 (2004).
- [22] Choquet et al., Extracellular matrix rigidity causes strengthening of the integrin-cytoskeleton linkages, *Cell* **88**, 39-48 (1997).
- [23] Cukierman et al., Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension, *Science* **294**, 1708-1712 (2001).
- [24] Daumas et al., Confined diffusion without fences of a G-Protein Coupled Receptor as revealed by Single Particule Tracking, *Biophys. J.* **84**, 356-366 (2003).
- [25] Delanoë-Ayari et al., Membrane and acto-myosin tension promote clustering of adhesion proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 2229-2234 (2004).
- [26] Dembo et al., Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts, *Biophys. J.* **76**, 2307-2316 (1999).
- [27] Deng et al., Localized mechanical stress induces time-dependent actin cytoskeletal remodeling and stiffening in cultured airway smooth muscle cells, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **287**, C440-C448 (2004).
- [28] Deng et al., Airway smooth muscle tone modulates mechanically induced cytoskeletal stiffening and remodeling, *J. Appl. Physiol.* **99**, 634-641 (2005).
- [29] Desai et al. Microtubule polymerization dynamics, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 83-117 (1997).
- [30] Desprat et al., Creep function of a single living cell, *Biophys. J.* **88**, 2224-2233 (2005).
- [31] Desprat et al., Alignment of fibroblasts on grooved surfaces described by a simple geometric transformation, *J. Cell Sci.* **83**, 313-340 (1986).
- [32] du Roure et al., Force mapping in epithelial cell migration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 2390-2395 (2005).
- [33] Emiliani et al., Multi force optical tweezers to generate gradients of forces, *Opt. Expr.* **12**, 3906-3910 (2004).
- [34] Engler et al., Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses, *Biophys. J.* **86**, 617-628 (2004).
- [35] Engler et al., Matrix elasticity directs stem cell lineage specification, *Cell* **126**, 645-647 (2006).
- [36] Evans et al., Forces and bond dynamics in cell adhesion, *Science* **316**, 1148-1153 (2007).
- [37] Fabry et al., Scaling the microrheology of living cells, *Phys. Rev. Lett.* **87**, 148102 (2001).
- [38] Fabry et al., Selected contribution : time course and heterogeneity of contractile responses in cultured human airway smooth muscle cells, *J. Appl. Physiol.*, **91**, 986-994 (2001).
- [39] Fabry et al., Time scale and other invariants of integrative mechanical behavior in living cells, *Phys. Rev. E* **68**, 041914 (2003).
- [40] Felsenfeld et al., Ligand binding regulates the directed movement of $\beta 1$ integrins on fibroblasts, *Nature* **383**, 438-440 (1996).
- [41] Felsenfeld et al., Selective regulation of integrin-cytoskeleton interactions by the tyrosine kinase Src, *Nature Cell Biol.* **1**, 200-206 (1999).

-
- [42] Fortin et al., Magnetic targeting of magnetoliposomes in solid tumors with MRI monitoring in mice-feasibility, *Radiology* **239**, 415-24 (2006).
- [43] Fredberg et al., Friction in airway smooth muscle : mechanism, latch and implications in asthma, *J. Appl. Physiol.* **81**, 2703-2712 (1996).
- [44] Fygenson et al., Mechanics of microtubule-based extension, *Phys. Rev. Lett.* **79**, 4497-4500 (1997).
- [45] Galbraith et al., The relationship between force and focal complex development, *J. Cell Biol.* **159**, 695-705 (2002).
- [46] Gardel et al., Elastic behavior of cross-linked and bundled actin networks, *Science* **304**, 1301-1305 (2004).
- [47] Gardel et al., Prestressed F-actin networks cross-linked by hinged filamins replicate mechanical properties of cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 1762-1767 (2006).
- [48] Gardel et al., Stress dependent elasticity of composite actin networks as a model for cell behavior, *Phys. Rev. Lett.* **96**, 088102 (2006).
- [49] Gautam et al., Flow-activated chloride channels in vascular endothelium. Shear stress sensitivity, desensitization dynamics, and physiological implications, *J Biol Chem.*, **281**, 492-500(2006).
- [50] Geiger et al., Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk, *Nature Review Mol. Cell Biol.* **2**, 793-805 (2001).
- [51] Gerbal et al., Measuring the elasticity of the actin tail of *Listeria monocytogenes*, *Eur. Biophys. J.* **29**, 134-140 (2000).
- [52] Giancotti et al., Integrin signaling, *Science* **285**, 1028-1032 (1999).
- [53] Gittes et al., Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape, *J. Cell Biol.* **120**, 923-934 (1993).
- [54] E. Guyon, J-P. Hulin et L. Petit, *Hydrodynamique physique*(Nouvelle édition) , *EDP Sciences/CNRS Editions* (2001).
- [55] Harris et al., Silicone Rubber substrata : a new wrinkle in the study of cell locomotion, *Science* **208**, 177-179 (1980).
- [56] Head et al., Deformation of cross-linked semi-flexible polymer networks, *Phys. Rev. Lett.* **91**, 108102 (2003).
- [57] Heidemann et al., Towards a regional approach to cell mechanics, *Trends Cell Biol.* **14**, 160-166 (2004).
- [58] Helfer et al., Viscoelastic properties of actin-coated membranes, *Phys. Rev. E* **63**, 021904 (2001).
- [59] Holy et al., Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 5682-5685 (1994).
- [60] Hoffman et al., The consensus mechanics of cultured mammalian cells, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 10259-10264 (2006).
- [61] Humphrey et al., Active fluidization of polymer networks through molecular motors, *Nature* **416**, 413-416 (2002).
- [62] Isambert et al., Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations, *J. Biol. Chem.* **270**, 11437-11444 (1995).
- [63] Isambert et al., Dynamics and rheology of actin solutions, *Macromolecules* **29**, 1036-1040 (1996).

- [64] Janmey et al., The resemblance of actin-binding proteins /actin gels to covalently crosslinked networks, *Nature* **345**, 89-92 (1986)
- [65] Janmey et al., Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks, *J. Cell Biol.* **113**, 155-160 (1991)
- [66] R. L. Juliano, Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton : functions of integrins, cadherins, selectins and immunoglobulin-superfamily members, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**, 283-323 (2002)
- [67] Karcher et al., A 3D viscoelastic model for cell deformation with experimental verification, *Biophys. J.* **85**, 3336-3349 (2003).
- [68] Katsumi et al., Integrins in mechanotransduction, *J. Biol. Chem* **279**, 12001-12004 (2004).
- [69] Katz et al., Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions, *Mol. Biol. Cell* **11**, 1047-1060 (2000).
- [70] Kruse et al., Generic theory of active polar gels : a paradigm for cytoskeletal dynamics, *Eur. Phys. J. E* **16**, 5-16 (2005).
- [71] Kusumi et al., Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (Nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells, *Biophys. J.* **65**, 2021-2040 (1993).
- [72] Landau and Lifshitz, Theory of elasticity, *Pergamon Press : Oxford U.K.* (1986).
- [73] Lau et al., Microrheology, stress fluctuations and active behavior of living cells, *Phys. Rev. Lett.* **91**, 198101 (2003).
- [74] Laurent et al., Assessment of mechanical properties of adherent living cells by bead micromanipulation : comparison of magnetic twisting cytometry vs optical tweezers, *J. Biomech. Eng.* **124**, 408-421 (2002).
- [75] Lee et al., Ballistic intracellular nanorheology reveals Rock-hard cytoplasmic stiffening response to fluid flow, *J. Cell Sci.* **119**, 1760-1768 (2006).
- [76] Le Goff et al., Motor-driven dynamics in actin-myosin networks, *Phys. Rev. Lett.* **88**, 018101 (2002).
- [77] Lenormand et al., Linearity and time scale invariance of the creep function in living cells, *J. R. Soc. Lond. Interface* (2004).
- [78] Levine et al., One- and two-particle microrheology, *Phys. Rev. Lett.* **85**, 1774 (2000).
- [79] Lo et al., Cell movement is guided by the rigidity of the substrate, *Biophys. J.* **79**, 144-152 (2000).
- [80] MacKintosh et al., Elasticity of Semiflexible Biopolymer Networks, *Phys. Rev. Lett.* **75**, 4425 (1995).
- [81] Maksym et al., Mechanical properties of cultured human airway smooth muscle cells from 0.05 Hz to 0.4 Hz, *J. Appl. Physiol.* **89**, 1619-1632 (2000).
- [82] Maniotis et al., Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 849-854 (1997).
- [83] Marcy et al., Force generated during actin-based propulsion : a direct measurement by micromanipulation, *Proc. Natl Acad. Sci* **101**, 5592-5597 (2004).
- [84] Mathur et al., Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy , *J. Biomech.* **34**, 1545-1553 (2001).

- [85] Matthews et al., Cellular adaptation to mechanical stress : role of integrins, Rho, cytoskeletal tension and mechanosensitive ion channels, *J. Cell Sci.* **119**, 508-519 (2006).
- [86] Griffin et al., Patterning, Prestress, and Peeling Dynamics of Myocytes *Biophys. J.* **86**, 1209-1222 (2004).
- [87] Mizuno et al., Nonequilibrium mechanics of active cytoskeletal networks, *Science* **315**, 370-373 (2007).
- [88] Neuman et al., Optical trapping, *Rev. Sci. Instr.* **75**, 2787-2809 (2004).
- [89] Nicolas et al., Cell mechanosensitivity controls the anisotropy of focal adhesions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 12520-12525 (2004).
- [90] Nicolas et al., Limitation of cell adhesion by the elasticity of the extracellular matrix, *Biophys. J.* **91**, 61-73 (2006).
- [91] Nishizaka et al., Position-dependent linkages of fibronectin-integrin-cytoskeleton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 692-697 (2000).
- [92] Ohayon et al., Analysis of nonlinear responses of adherent epithelial cells probed by magnetic bead twisting : a finite element model based on a homogenization approach, *J. Biomech. Eng.* **126**, 685-698 (2004).
- [93] Paszek et al., Tensional homeostasis and the malignant phenotype, *Cancer Cell*, **8**, 241-254 (2005).
- [94] Pelham and Wang, Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13661-13665 (1997).
- [95] Puig-de-Morales et al., Cytoskeletal mechanics in adherent human airway smooth muscle cells : probe specificity and scaling of protein-protein dynamics, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**, 643-654 (2004).
- [96] Rand and Burton, Mechanical properties of the red cell membrane, *Biophys. J.* **4**, 116-135 (1964).
- [97] Revenu et al., The co-workers of actin filaments : from cell structures to signals, *Nature Review Mol. Cell Biol.* **5**, 1-12 (2004).
- [98] Ren et al., Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton, *EMBO J.* **18**, 578-585 (1999).
- [99] Rico et al., Probing mechanical properties of living cells by atomic force microscopy with blunted pyramidal cantilever tips, *Phys. Rev. E* **72**, 021914 (2005).
- [100] Ridley et al., The small GTP-binding protein Rho regulates assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors, *Cell* **70**, 389-399 (1992).
- [101] Ridley et al., The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling, *Cell* **70**, 401-410 (1992).
- [102] Rivelino et al., Focal contacts as mechanosensors : externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts in an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism, *J. Cell. Biol.* **153**, 1175-1185 (2001).
- [103] Saez et al., Is the mechanical activity of epithelial cells controlled by deformations or forces ?, *Biophys. J.* **89**, L52-54 (2005).
- [104] Saez et al., Rigidity driven growth and differentiation of epithelial cells on microstructured anisotropic substrates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 8281-8286 (2007).
- [105] Salomé et al., Characterization of membrane domains by FRAP experiments at variable observation areas, *Eur. Biophys. J.* **27**, 391-402 (1998).

- [106] Sawada et al., Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas , *Cell*, **127**, 1015-1026 (2006).
- [107] M. Sheetz, Laser tweezers in cell biology, *Academic Press* (1998).
- [108] Shemesh et al., Focal adhesions as mechanosensors : a physical mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 12383-12388 (2005).
- [109] Simmons et al., Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap, *Biophys. J.* **70**, 1813-1822 (1996).
- [110] Smith et al., Probing the viscoelastic behavior of cultured airway smooth muscle cells with atomic force microscopy : stiffening induced by contractile agonist, *Biophys. J.* **88**, 2994-3007 (2005).
- [111] Stephens et al., The biophysics of asthmatic airway smooth muscle, *Respir. Physiol. Neurobiol.* **137**,125-40 (2003).
- [112] Svoboda et al., Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry, *Nature* **265**, 721-727 (1993).
- [113] Svoboda and Block, Biological Applications of Optical Forces, *Annu. Rev. Biomol. Struct.* **23**, 247-285 (1994).
- [114] Tan et al., Cells lying on a bed of microneedles : an approach to isolate mechanical force, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 1484-1489 (2003).
- [115] Tharmann et al., Viscoelasticity of Isotropically Cross-Linked Actin Network, *Phys. Rev. Lett.* **98**, 088103 (2007).
- [116] Théry et al., The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis, *Nature Cell Biol.* **7**, 947-953 (2005).
- [117] Théry M., Contrôle de la polarité des cellules adhérentes, *thèse de doctorat de l'Université Paris 7 - Denis Diderot* (2006).
- [118] Thomen et al., Unravelling the mechanism of RNA-polymerase forward motion by using mechanical force, *PRL* **94**, 128102 (2005).
- [119] Thoumine et al., Elongation of Confluent Endothelial Cells in Culture : The Importance of Fields of Force in the Associated Alterations of Their Cytoskeletal Structure, *Exp. Cell Res.* **219**, 427-441 (1995).
- [120] Thoumine et al., Microplates : a new tool for manipulation and mechanical perturbation of individual cells, *J Biochem Biophys Methods.* **39**, 47-62 (1999).
- [121] Trepate et al., Thrombin and histamine induce stiffening of alveolar epithelial cells, *J. Appl. Physiol.* **98**, 1567-1574 (2005).
- [122] Trepate et al., Universal physical responses to stretch in the living cell, *Nature* **447**, 592-595 (2007).
- [123] Vallotton et al., Simultaneous mapping of filamentous actin flow and turnover in migrating cells by quantitative fluorescent speckle microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 9660-9665 (2004).
- [124] Van Citters et al., The role of F-actin in epithelial cell rheology, *Biophys. J.* **91**, 3946-3956 (2006).
- [125] Verkhovsky et al., Self-polarization and directional motility of cytoplasm, *Curr. Biol.* **9**, 11-20 (1999).
- [126] Wachsstock et al., Cross-linker dynamics determine the mechanical properties of actin gels, *Biophys. J.* **66**, 801-809 (1994)

-
- [127] Wang et al., Mechanotransduction Across the Cell Surface and Through the Cytoskeleton, *Science* **260**, 1124-1127 (1993).
- [128] Wang and Ingber, Control of Cytoskeletal Mechanics by Extracellular Matrix, Cell Shape and Mechanical Tension, *Biophys. J.* **66**, 2181-2189 (1994).
- [129] Wang et al., Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells, *AJP Cell Physiol.* **52**, 97-106 (2002).
- [130] Wang et al., Mechanical behavior in living cells consistent with the tensegrity model, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7765-7770 (2001).
- [131] Wang et al., Micropatterning Tractional Forces in living cells, *Cell Motil Cytoskeleton* **279**, C1345-C1350 (2000).
- [132] Wang et al., Visualizing the mechanical activation of Src, *Nature* **434**, 1040-1045 (2005).
- [133] Wiesner et al., A biomimetic motility assay provides insight into the mechanism of actin-based motility, *J. Cell Biol.* **160**, 387-398 (2003).
- [134] Yamada et al., Integrin signalling, *Signalling networks and cell cycle control* (Ed. Gutkind, J.S.), 1-25 (Humana Press, Totowa, NJ, 2000).
- [135] Yamada et al., Integrin regulation of growth factor receptors, *Nature Cell Biol.* **4**, E75 (2002).
- [136] Yildiz et al., Kinesin walks hand-over-hand, *Science* **303**, 676-678 (2004)
- [137] Zamir et al., Molecular diversity of cell-matrix adhesions, *J. Cell Sci.* **112**, 1155-1669 (1999).
- [138] Zamir et al., Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts, *Nature Cell Biol.* **2**, 191-196 (2000).
- [139] Zamir and Geiger, Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions, *J. Cell Sci.* **114**, 3583-3590 (2001).

Annexe A

Tableau récapitulatif des agents biochimiques diminuant la contractilité cellulaire

| Nom | Effet, C_{agent} | Mode d'action | Référence |
|----------------|---------------------------|--|---|
| Cytochalasin D | ↘ 2 μM | dépolymérise les filaments d'actine (se lie au bout + et aux monomères) | Peterson et al., Small molecules, big impact, <i>Chem. Biol.</i> 9 (2002) Fabry et al., Scaling the micro-rheology of the cell, <i>PRL</i> 87 (2001) |
| Latrunculin A | ↘ 2 μM | détruit les filaments d'actine (séquestre les monomères) | Zamir et al., Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions, <i>Nat. Cell Biol.</i> 2 (2000) |
| ADF (cofilin) | ↘ 2 μM | dépolymérise les filaments d'actine (se lie au bout +) | Svitkina et al., Arp2/3 complex and ADF cofilin..., <i>J. Cell Biol.</i> 145 (1999) |
| Blebbistatin | ↘ 50 μM | inhibe la non-muscle myosin II (empêche activité ATPase et glissement sur les filaments) | Straight et al., Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor, <i>Science</i> 299 (2003) Cai et al., 2006 |
| H-7 | ↘ 60 μM | bloque l'activité de la MLCK et PKC en empêchant phosphorylation sur serine; action réversible | Zamir et al., Molecular diversity of cell-matrix adhesions, <i>J. Cell Sci.</i> 112 (1999) Zamir et al., 2000 |
| ML-7 | ↘ 100 μM | idem (phosphorylation sur thréonine) | Zamir et al., 2000 |

| Nom | Effet, C_{agent} | Mode d'action | Référence |
|--------------------------|------------------------------|--|---|
| BDM | ↘ 10 mM | inhibe la fonction ATP-ase des myosines \Rightarrow diminue la tension cellulaire | Matthews et al., Cellular adaptation to mech. stress : role of integrins, Rho, CSK tension and mechanosensitive channels, <i>J. Cell Sci.</i> 119 (2006) |
| Y-27632 | ↘ 20 μ M | inhibe ROCK \Rightarrow diminue la tension cellulaire | Matthews et al., 2006 |
| C3 transferase | ↘ protocole complexe | inhibe Rho \Rightarrow diminue la tension cellulaire (détruit fibres de stress et FA) | Matthews et al., 2006 |
| PP2 | ↘ 25 μ M | inhibe tyrosines kinases de la famille Src \Rightarrow diminue la tension cellulaire | Matthews et al., 2006 |
| Galdolinium Chloride | \emptyset | bloque les canaux ioniques mécanosensibles mais pas d'effet sur la rigidité à moyen terme | Matthews et al., 2006 |
| W-7 | ↘ 100 μ M | se lie à la calmoduline \Rightarrow empêche la contractilité myosique | An et al., Stiffness changes in cultured airway smooth muscle cells, <i>Am. J. Physiol. Cell Physiol.</i> 183 (2002) |
| KT5926 | ↘ | inhibe MLCK (empêche de phosphoryler MLC) \Rightarrow inhibe contractilité actomyosique | Chrzanowska et al., Rho-stimulated contractility drives the formation of SF and FA, <i>J. Cell Biol.</i> 133 (1996) |
| BTS | ↘ | inhibe muscle myosin II (diminue son affinité pour l'actine et inhibe son activité ATPase) | Cheung et al., A small molecule inhibitor of skeletal muscle myosin II, <i>Nat. Cell Biol.</i> 4 (2002) |
| Staurosporine | ↘ | inhibe toutes les kinases \Rightarrow inhibe notamment la contractilité actomyosique | , () |
| 187-1 Wiskostatin | ↘ | inhibe l'activation de N-WASP \Rightarrow bloque l'assemblée de filaments à la membrane | Peterson et al., 2002 |
| Wortmanin | ↘ 1 μ M | inhibe MLCK (empêche de phosphoryler MLC) \Rightarrow inhibe contractilité actomyosique | Smith et al., Probing the viscoel behavior of cultured ASM cells : stiffening induced by a contractile agonist, <i>J. Cell Biol.</i> 133 (1996) |
| PAO (phenylarsine oxyde) | ↘ | inhibe tyrosine phosphatases \Rightarrow empêche renforcement du lien intégrines -CSK et maturation des FA | Felsenfeld et al., Selective regulation of integrin-CSK linkages by the tyrosine kinase Src, <i>Nat. Cell Biol</i> 1 (1999) |

Annexe B

Tableau récapitulatif des agents biochimiques augmentant la contractilité cellulaire

| Nom | Effet, C_{agent} | Mode d'action | Référence |
|----------------|------------------------------|--|--|
| Histamine | ↗ 10 μM | active phosphorylation de MLC ⇒ augmente contractilité actomyosique | Moy et al., Histamine and thrombin modulate endothelial FA through ceteripetal and centrifugal forces, <i>J. Clinic. Invest.</i> 97 (1996) Trepate et al., Thrombin and histamin induce stiffening of alveolar epithelial cells, <i>J. Appl. Physiol.</i> 98 (2005) |
| | 100 μM | | |
| Thrombin | ↗ 0.1 U/mL | idem, mais action plus forte | Moy et al., 1996 Trepate et al., 2005 |
| | 0.5 U/mL | | |
| Jasplakinolide | ↗ 0.5 μM | stabilise les filaments d'actine | Bubb et al., Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin, <i>J Biol. Chem.</i> 269 (1994) |

| Nom | Effet, C_{agent} | Mode d'action | Référence |
|-----------------------------|--|---|--|
| Bombesin | ↗ 10 nM | ? ⇒ augmente les fibres de stress et l'actine dans les protrusions membranaires | Ridley and Hall, The small GTP-binding prot. Rho regulates the assembly of FA and actin SF, <i>Cell</i> 70 (1992) |
| LPA (contenu ds SVF) | ↗ 10 µg/mL 10 ng/mL 10 µM | active Rho ⇒ augmente fibres de stress et FA | Den et al., Regulation of the small GTP-binding prot. Rho by cell adhesion and the CSK, <i>EMBO</i> 19 (1999) Ridley and Hall, 1992 Cai et al., Non-muscle myosin IIA-dependent force inhibits cell spreading and drives F-actin flow, <i>Biophys J.</i> (2006) |
| Calyculin A | ↗ 10 nM 20 nM | inhibe les protéines phosphatases ⇒ MLC reste phosphorylée, et la contraction augmente | Venema et al., Role of PKC in the phosphorylation of MLC2, <i>Biochem J.</i> 294 (1993) Valloton et al., <i>PNAS</i> 101 (2004) |
| 5-HT (Serotonin) | ↗ 10 µM | augmente l'activité des tyrosine kinases ⇒ augmente la contractilité actomyosique | Smith et al., 2005 |
| PDGF | ↗ 3 ng/mL | augmente la quantité d'actine dans les membrane ruffles ⇒ augmente la motilité, plus que les FA et la contractilité | Ridley and Hall, 1992 |
| EGF | ↗ 10 ng/mL | idem | Ridley and Hall, 1992 |
| Nocodazole | indirect ↗ 2 µg/mL | empêche polymérisation des microtubules, car lie les monomères (effet réversible) ⇒ permet une plus forte contractilité | Peterson et al., 2002 |
| Taxol | | stabilise les microtubules | Peterson et al., 2002 |
| Colchicin | indirect ↗? | empêche polymérisation des microtubules, car lie les monomères (effet non réversible) | Peterson et al., 2002 |
| Phalloïdin | indirect ↗? | augmente polymérisation de l'actine | Peterson et al., 2002 |

Annexe C

Expériences préliminaires de recrutement d'actine en présence de force

Nous présentons ici les résultats préliminaires obtenus lors d'expériences réalisées dans l'équipe "Complexes macromoléculaires en cellules vivantes" de l'Institut Jacques-Monod. Ces expériences avaient pour but d'observer le recrutement d'actine en réponse à l'application locale d'un gradient de rigidité.

Le dispositif utilisé est globalement le même que celui décrit au chapitre 2 : il s'agit de pinces optiques couplées à une observation en épifluorescence. L'originalité de ce système réside dans la génération de pièges multiples, dont on peut contrôler les positions dans le plan d'observation ainsi que la raideur [33]. Ceci est réalisé grâce à des déflecteurs acousto-optiques pilotés par ordinateur : les déflecteurs font commuter le laser entre les positions voulues pour les différents pièges à fréquence suffisamment élevée (de l'ordre de quelques centaines de kHz à 1 MHz) pour que la bille reste piégée entre deux passages successifs du laser. La fraction de puissance dans chaque piège est alors proportionnelle au temps passé par le laser dans chaque position (entre une dizaine et une centaine de μs , selon la fraction de puissance voulue). Et la raideur de chaque piège est elle-même proportionnelle à cette fraction de puissance, le temps de passage entre les pièges étant négligeable par rapport au temps passé dans chaque piège.

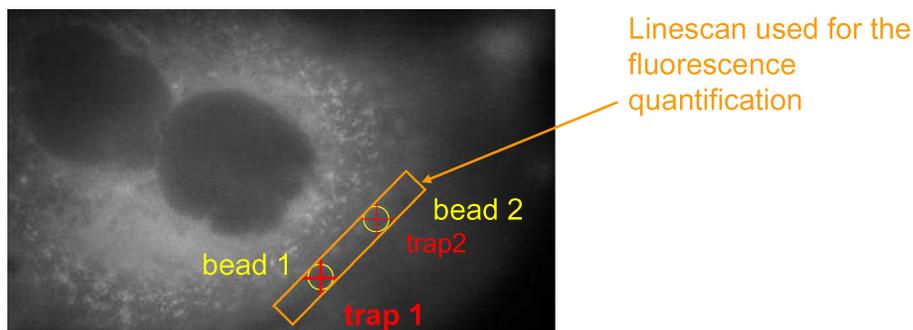


FIG. C.1 – Image en épifluorescence d'une cellule épithéliale MDCK avec le schéma résumant les caractéristiques des pièges, ainsi que l'allure de la ligne de coupe utilisée pour mesurer l'intensité de fluorescence au cours du temps.

Pour ces expériences, on utilise un double piège : la raideur du piège n°1 vaut $k_1 = 100 \text{ pN}/\mu\text{m}$, celle du piège n°2 $k_2 \simeq k_1/2 \simeq 50 \text{ pN}/\mu\text{m}$. On étudie ici des cellules épithéliales de rein de chien de la lignée MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), exprimant de façon stable de l'actine-YFP¹.

¹La YFP, Yellow Fluorescent Protein, est une protéine fluorescente de la même famille que la GFP. Par rapport à la GFP, son spectre d'absorption est légèrement décalé vers le vert, et son spectre d'émission vers le jaune.

On utilise des billes de latex de diamètre $2\ \mu\text{m}$, recouvertes du tripeptide RGD².

Contrairement au protocole expérimental décrit au chapitre 2, les billes sont déposées sur une cellule à l'aide du double piège au début de l'expérience. En effet, on souhaite disposer de deux billes côte à côte sur la même cellule afin d'observer la réponse cellulaire en fonction de la raideur du piège maintenant chaque bille. On fixe donc la raideur du premier piège à la valeur k_1 , et la raideur du second à k_2 . On mesure, au cours du temps, l'intensité de fluorescence le long d'une ligne, représentée sur la figure C.1 en orange. On effectue donc, en quelque sorte, une coupe dans la cellule, afin de mesurer la répartition de l'intensité de fluorescence de part et d'autre des billes piégées.

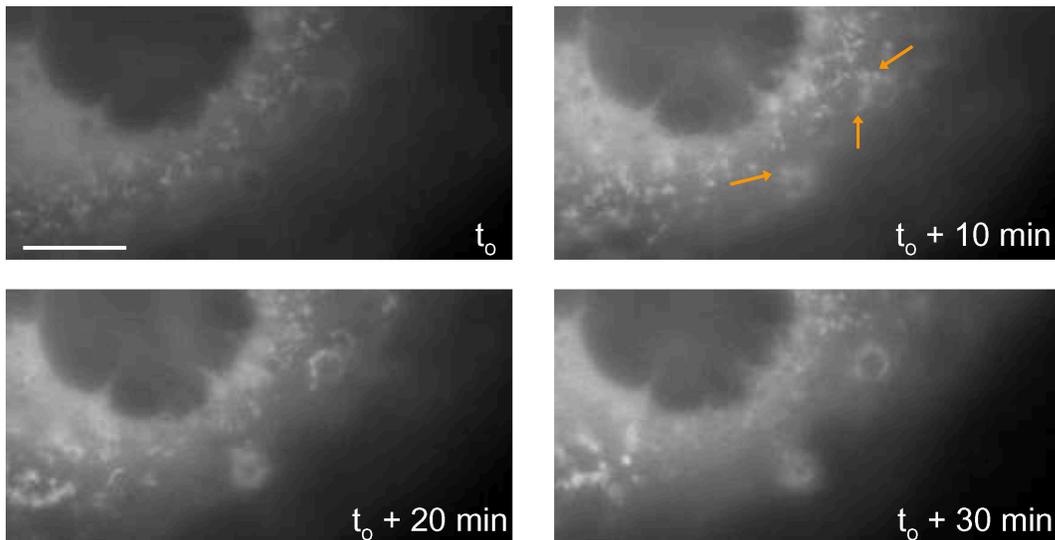


FIG. C.2 – Images en épifluorescence de l'actine-YFP contenue dans une cellule MDCK en fonction du temps d'application des pièges optiques : au début de l'expérience (t_0), et après 10, 20 et 30 minutes de maintien des billes dans leurs pièges. Les flèches pointent vers des patches de recrutement d'actine (barre : $5\ \mu\text{m}$).

Les images de la figure C.2 montrent la répartition d'actine-YFP autour des billes piégées³ au cours du temps : on voit apparaître autour des billes des points fluorescents, similaires aux patches décrits au chapitre 4. Ces patches fusionnent peu à peu, jusqu'à former, autour de chaque bille, un anneau d'actine plus ou moins dense. On voit nettement que la bille de gauche, située dans le piège de plus grande rigidité (k_1) est entourée d'un anneau d'actine beaucoup plus dense que la bille du piège de raideur deux fois plus faible k_2 .

L'analyse de la densité de fluorescence le long de la ligne précédemment décrite donne le graphe de la figure C.3. Les positions des pièges 1 et 2 sont respectivement aux alentours des pixels n° 35 et 90. On constate que la quantité d'actine augmente très nettement autour des billes piégées, et que l'augmentation est plus marquée autour de la bille de gauche, maintenue dans le piège de plus grande raideur k_1 . Le recrutement d'actine au niveau du contact bille-cellule est

²Il ne s'agit cependant pas exactement du même peptide que celui utilisé dans nos expériences de fluage ("Peptide 2000"). En effet, pour ces expériences préliminaires, on a utilisé une molécule correspondant strictement au tripeptide RGD, sans l'adaptateur moléculaire de 20 acides aminés supplémentaires, et qui a pour but de rendre la séquence RGD plus disponible car plus éloignée de la surface de la bille.

³Même sur la première image, on voit se détacher les billes : cela est dû à leur très légère fluorescence. C'est pourquoi on considère la répartition d'intensité à $t=0$ comme étant la répartition de base $I_0(x)$, x étant la position le long de la ligne de coupe. On s'affranchit de cette répartition en divisant l'intensité des images suivantes par I_0 .

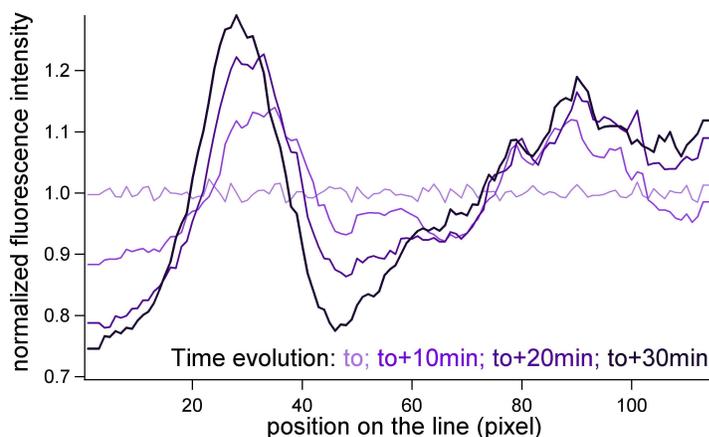


FIG. C.3 – Intensité de fluorescence mesurée le long de la ligne passant par les deux billes piégées, aux différents instants t_0 , $t_0+10min$, $t_0+20min$, $t_0+30min$. Les pièges 1 et 2 sont respectivement centrés sur les pixels 35 et 90. (échelle : 10 pixels $\approx 1 \mu m$)

d'autant plus important que la raideur du piège maintenant la bille est grande.

L'avantage de ces expériences est de pouvoir observer la différence de comportement de l'actine cellulaire autour de chacune des billes, en fonction de la raideur du piège, qui mime la rigidité qu'exercerait la matrice extracellulaire au niveau des contacts cellule-matrice.

On obtient aussi un ordre de grandeur du temps nécessaire à la mise en place du recrutement d'actine autour des billes coatées RGD : dès les 10 premières minutes, on constate une répartition d'actine largement modifiée. Les premiers patches d'adhésion apparaissent en 5 à 10 minutes autour des billes piégées.

Cependant, au cours de ces expériences, chaque bille bouge un peu dans son piège. En effet, on ne mesure pas en temps réel la position exacte de chaque bille : bien que celle-ci soit maintenue par la pince optique, les forces exercées par la cellule sont suffisantes pour la déplacer un peu du centre du piège. On ne peut donc pas connaître précisément la force à laquelle est soumise chaque bille. Il est alors délicat de pouvoir discerner l'effet de la rigidité de chaque piège, et l'effet de la force que ressent chaque bille⁴. De plus, la proportion d'expériences où le recrutement s'est effectivement mis en place est assez faible : seules 5 expériences positives ont été obtenues sur 23 tentatives. Cela peut être dû au manque de contrôle sur la force effectivement appliquée à chaque bille, comme décrit ci-dessus⁵.

C'est pourquoi on a mis en place notre dispositif de rétroaction permettant de maintenir, sur une seule bille cette fois, une force constante.

Ce système est cependant très utilisé, entre autres, pour des expériences sur lamellipodes de fibroblastes (expériences actuellement réalisées par Myriam Allieux, en thèse sous la direction de Maïté Coppey). La mesure des vitesses d'échappement de billes emportées par le flux d'actine sous-membranaire, ainsi que de la quantité d'actine recrutée autour des billes, en fonction de la raideur du piège qui les maintient, constitue une approche complémentaire à celle que nous avons

⁴la bille piégée dans le piège de raideur k_2 plus faible sera plus facilement déplacée par la cellule, et risque de s'éloigner d'une distance x_2 plus grande que la distance x_1 dont est déplacée la bille piégée plus fortement ($x_2 > x_1$). Or la force de rappel est proportionnelle à la distance au centre et à la rigidité : on a alors $F_1 = k_1 x_1$ et $F_2 = k_2 x_2$. Si on a $k_1 > k_2$ mais $x_1 < x_2$, on ne peut prévoir la valeur de F_1 par rapport à F_2 .

⁵Cela peut aussi être dû au coating utilisé pour ces expériences : le seul tripeptide RGD est certainement moins susceptible d'enclencher une réponse cellulaire que le long polypeptide "Peptide 2000", car trop petit pour pouvoir être correctement lié aux intégrines.

suivie pour cette thèse. Les recoupements entre ces deux types d'expériences pourraient s'avérer utiles à l'élucidation des phénomènes intervenant dans la mécanostransduction.

Annexe D

Articles publiés ou en cours de publication

❶ M. Balland, N. Desprat, D. Icard, S. Féréol, A. Asnacios, J. Browaeys, S. Hénon et F. Gallet
Power laws in microrheology experiments on living cells : Comparative analysis and modelling
Phys. Rev. E **74** : 021911 (2006).

Ce premier article concerne la comparaison de résultats de rhéologie cellulaire obtenus par différentes méthodes : déformation locale par pinces optiques en régime sinusoïdal et fluage sur cellule entière par étirement uniaxial, sur différents types cellulaires et à l'aide de différents coatings. Un modèle comportemental est proposé afin de rendre compte des lois de puissance observées pour les comportements du module viscoélastique $G(\omega)$ et de la fonction de fluage $J(t)$.

Les travaux qui y sont publiés comprennent les expériences effectuées pendant mon stage de DEA au laboratoire : il s'agissait d'étudier, par pinces optiques en régime dynamique, la différence de réponse mécanique de cellules A549, selon qu'elles sont sondées *via* leurs récepteurs ICAM-1 ou intégrines. Cet article est reproduit ci-après.

❷ M. Balland, N. Desprat, D. Icard, S. Féréol, A. Asnacios, J. Browaeys, S. Hénon and F. Gallet
Comparing Microrheology Experiments on Living Cells
5th World Congress of Biomechanics Medimond International Proceedings **G729C2110** : 285-294 (2006).

❸ S. Hénon, D. Icard, M. Balland and F. Gallet
Mechanically induced effects on the cytoskeleton of epithelial cells
Journal of Biomechanics Volume 39, Supplement 1 : S582 (2006).

Ces deux articles sont des publications dans des revues sans comité de lecture, qui reprennent tout ou une partie des données publiées dans l'article du *Phys. Rev. E*. Ils ne sont donc pas mis en annexe.

❹ S. Féréol, R. Fodil, V.M. Laurent, M. Balland, D. Icard-Arcizet, E. Planus, B. Louis, G. Pelle, S. Hénon and D. Isabey
Unlike responsiveness of alveolar macrophages and epithelial cells to external loading, prestress and substrate stiffness reveals the variety of cellular adaptation mechanisms
soumis à *J. Biomech. Eng.*

Cet article reprend une partie des expériences sur cellules A549 décrites dans l'article du *Phys. Rev. E.*, afin de les comparer avec des mesures effectuées par magnétocytométrie et pinces optiques sur des macrophages alvéolaires. Il ne sera pas mis en annexe.

⑤ D. Icard-Arcizet, O. Cardoso, A. Richert and S. Hénon
Cell stiffening under stress is correlated to actin recruitment
soumis à *Biophys. J.*

Cet article, résumant l'essentiel du travail de la thèse, est reporté ci-après, dans l'état de sa première soumission au Biophysical Journal.

Power laws in microrheology experiments on living cells: Comparative analysis and modeling

Martial Balland,¹ Nicolas Desprat,¹ Delphine Icard,¹ Sophie Féréol,² Atef Asnacios,¹ Julien Browaeys,¹ Sylvie Hénon,¹ and François Gallet¹

¹*Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, UMR 7057 associée au CNRS et à l'Université Paris7—Denis Diderot, Case courrier 7056, 2, place Jussieu, 75251 Paris, Cedex 05, France*

²*Physiopathologie et Thérapeutique Respiratoires, INSERM U492, Faculté de Médecine et Faculté des Sciences et Technologie, 8, rue du Général Sarrail, 94010 Creteil Cedex, France*

(Received 24 March 2006; revised manuscript received 2 June 2006; published 9 August 2006)

We compare and synthesize the results of two microrheological experiments on the cytoskeleton of single cells. In the first one, the creep function $J(t)$ of a cell stretched between two glass plates is measured after applying a constant force step. In the second one, a microbead specifically bound to transmembrane receptors is driven by an oscillating optical trap, and the viscoelastic coefficient $G_e(\omega)$ is retrieved. Both $J(t)$ and $G_e(\omega)$ exhibit power law behaviors: $J(t)=A_0(t/t_0)^\alpha$ and $|G_e(\omega)|=G_0(\omega/\omega_0)^\alpha$, with the same exponent $\alpha\approx 0.2$. This power law behavior is very robust; α is distributed over a narrow range, and shows almost no dependence on the cell type, on the nature of the protein complex which transmits the mechanical stress, nor on the typical length scale of the experiment. On the contrary, the prefactors A_0 and G_0 appear very sensitive to these parameters. Whereas the exponents α are normally distributed over the cell population, the prefactors A_0 and G_0 follow a log-normal repartition. These results are compared with other data published in the literature. We propose a global interpretation, based on a semiphenomenological model, which involves a broad distribution of relaxation times in the system. The model predicts the power law behavior and the statistical repartition of the mechanical parameters, as experimentally observed for the cells. Moreover, it leads to an estimate of the largest response time in the cytoskeletal network: $\tau_m\sim 1000$ s.

DOI: 10.1103/PhysRevE.74.021911

PACS number(s): 87.17.-d, 87.16.Ka, 87.17.Aa, 83.85.Cg

I. INTRODUCTION

To perform their functions, living cells must adapt to external stresses and to varying mechanical properties of their environment. Thus, rheological properties (i.e., stress-strain relationships) are key features of living cells. Actually, mechanics play a major role in many biological processes such as cell crawling, wound healing, protein regulation and even apoptosis [1]. Conversely, several pathologies, such as metastasis, asthma, or sickle cell anemia, involve alteration of the mechanical properties of a given cell type. All these processes are mainly controlled by the structure and mechanical properties of the cytoskeletal network. This network is a dynamical assembly of macromolecules, principally made of actin filaments, intermediate filaments and microtubules, and interacting with a variety of associated proteins, crosslinkers, and molecular motors. The mechanical properties of the cytoskeletal network are therefore the subject of many experimental studies.

These studies have been made possible by the development of numerous quantitative micromanipulation techniques, such as micropipettes [2], cell poking [3], shear flow cytometry [4,5], atomic force microscopy (AFM) [6–8], microplates [9–11], optical tweezers [12–14], optical stretchers [15,16], magnetic tweezers [17,18], magnetic twistors [12,19], and particle tracking [20–22]. These techniques are complementary, in the sense that they probe the behavior of the intracellular medium at different length scales and time scales, and that they implement stresses and strains in different geometries and with different orders of magnitude.

Most recent results in microrheology of the intracellular medium have demonstrated that it is a complex viscoelastic

medium which cannot be simply modeled by associating a finite, small number of elastic and viscous elements. Indeed, the viscoelastic complex modulus of the cell medium exhibits a power law behavior on a wide frequency range [13,23]. Similarly the creep function behaves as a power law of elapsed time [11,24]. This clearly indicates that there is a broad and dense distribution of dissipation times in the cell, and that the mechanisms responsible for the storage of elastic energy and its dissipation are strongly correlated. Such behavior, characteristic of structural damping, is found in other complex viscoelastic systems, like colloids, gels, pastes, and more generally the class of so-called “soft glassy materials.” However, a detailed interpretation of the origin of structural damping behavior in the cytoskeletal network has still to be built.

One of the objectives of this paper is to propose a global description of the mechanics of the cytoskeletal network, consistent with the whole set of data gathered from numerous experiments performed up to now. It aims at contributing to answer several of the following questions: How might one compare the results of experiments performed with different microrheological techniques and/or in various experimental conditions? Is there a unified behavior at the nanoscale and microscale level and at the scale of the whole cell? How does this behavior depend on the cell type, and on the nature of the receptor through which the stress is applied? Is it possible to build a phenomenological model which predicts the power law response functions and also the peculiar dispersion of results obtained from a set of cells of the same type?

The paper is organized as follows: Sec. II presents the experimental protocols and the two techniques used here to measure either the local dynamical response of the actin network to an oscillatory force (optical tweezers) or the creep

function at the scale of the whole cell (uniaxial stretching). The results of the two experiments are reported in Sec. III. The power laws measured for the viscoelastic modulus vs frequency and for the creep function vs time are fully consistent. The prefactor G_0 of the power law, i.e., the elastic modulus measured for the same cell type at the reference frequency $f=1$ Hz, follows a log-normal distribution. A comparison between different cell types and receptors shows that the value of the exponent α in the power law is remarkably homogeneous: $\alpha \approx 0.2$. Section IV presents a review of other data collected in the literature. The common features emerging from the different cell types, probed by different techniques and in various experimental conditions are underlined. The possible origins for some discrepancies, mainly in the prefactor of the power laws, are discussed. An original, semiphenomenological model for the cell mechanical behavior is set out in Sec. V. We assume that the cell is built of a random infinite series of elementary mechanical units, following on average a scaling law repartition. It leads to correct predictions for the response functions, including power law behaviors, normal and log-normal distributions, respectively, for the exponent α and the prefactor G_0 . Section VI details the quantitative comparison with experimental data, leading to an estimate for the largest relaxation time in the cell τ_m .

II. EXPERIMENTAL SETUPS AND PROTOCOLS

A. Cell culture

We studied the microrheology of two primary cell cultures, mouse ear fibroblasts and rat alveolar macrophages, and four different cell lines: C2 and C2-7 myogenic cells, A549 human alveolar epithelial cells, Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) epithelial cells, and mouse fibroblasts L929.

The C2 myogenic cell line is derived from the skeletal muscle of adult CH3 mice. The C2-7 cell line is a subclone of the C2 cell line. They were kindly provided by Lambert and Mège (INSERM U440, Institut du Fer à Moulin, Paris) and by Paulin (Biologie Moléculaire de la Différentiation EA 300, Université Paris VII, Paris). A549 are human lung carcinoma cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD). MDCK cells were kindly provided by Chavrier (Membrane and Cytoskeleton Dynamics, CNRS, Institut Curie, Paris). Alveolar macrophages were isolated from Sprague-Dawley rats by broncho-alveolar lavages and resuspended in RPMI medium supplemented with 0.1% BSA [25]. Other cells were grown at 37 °C in a humidified 5% CO₂-95% air atmosphere, in Dulbecco's modified essential medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, and 50 mg/ml streptomycin.

For creep experiments, the cells were detached from culture flasks (1% trypsin and 1 mM EDTA), centrifugated at 900 rpm for 3 min, diluted in DMEM supplemented with 15 mM HEPES, and maintained under smooth agitation for 2 h at 37 °C.

For optical tweezers experiments, the cells were detached from culture flasks 24 h before experiments and plated at a

density of about 300 cells/mm², in complete culture medium with serum, on glass coverslips (22 mm × 22 mm) coated with fibronectin (5 μg/mL for 3 h at room temperature). For optical tweezers experiments on A549 via ICAM-1, 10 ng/ml of recombinant human Tumor Necrosis Factor- α was added to this medium to induce the expression of ICAM-1.

B. Microplates preparation

Glass microplates were cleaned for 10 min in a Piranha mixture—2/3 pure sulfuric acid, 1/3 hydrogen peroxide 30%, and rinsed in water.

For nonspecific binding, microplates were dipped in a bath of 90% ethanol, 8% water, 2% 3-aminopropyltriethoxysilane for 2 h, rinsed in ethanol, and finally incubated in 98% water, 2% glutaraldehyde 1 h before the experiment.

For specific binding to integrins, microplates were dipped in a bath of 5 mL DMEM at 1 mg/mL fibronectine F-1141 (Sigma), 2 h before the experiment.

For specific binding to cadherins, microplates were directly coated in the experimental chamber to avoid drying of the proteins. The microplates tips, previously coated with organopolysiloxane (Sigmacote, Sigma) [26], were first dipped, for 2 h, in a 150 μL drop of borate buffer containing 2 μL of a 2 μg/μL Fc γ antibody solution (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) [27]. After rinsing with borate buffer, microplates were dipped for 2 h in a 200 μL borate buffer containing 25 μg of NCad-Fc "chimeric" protein. Then the plates tips were rinsed and finally dipped in a 2 mL borate buffer containing 10 mg/mL BSA (Sigma-Aldrich, France), to ensure saturation of residual nonspecific adhesion sites.

C. Bead coatings and specific attachment to the cells

For a specific binding to integrins, carboxylated silica microbeads (3.47 μm diameter, Bangs Laboratories Inc., IN, USA) were coated with a polypeptide containing the arginine-glycine-aspartic (RGD) sequence (PepTite-2000, Telios pharmaceuticals, CA, USA), according to the manufacturer's procedure.

For specific binding to ICAM-1 (CD54), the same silica beads were first coated with goat antimouse IgG (BD Biosciences, 5 μg of monoclonal antibody for 100 μg of beads, in PBS for 30 min at 4 °C under gentle agitation), and second with mouse antihuman CD54 (BD Biosciences, same protocol).

Before use, coated beads were incubated in DMEM supplemented with 1% BSA for 30 min at 37 °C, to block nonspecific binding. Beads were then added to the cells (~5 μg of beads per coverslip) and further incubated for 30 min at 37 °C. Unbound beads were washed away with medium.

D. Measurements of the creep function $J(t)$

The creep function of a single living cell is measured by means of a home-made stretching rheometer, which has been

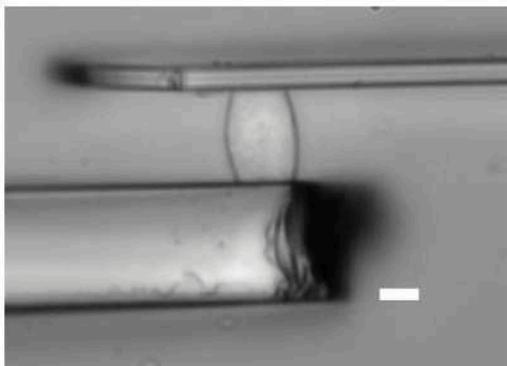


FIG. 1. View of the uniaxial stretching rheometer. A single cell is attached by specific or nonspecific binding to a rigid glass microplate (bottom) and a flexible one (top). The bar length is $10\ \mu\text{m}$. The stiffness of the flexible plate is calibrated, so that one simultaneously measures the force applied to the cell, and its deformation. A feedback loop allows us to apply a constant stress to the cell, and thus to retrieve its creep function $J(t)$.

described in detail elsewhere [11,28]. This setup takes advantage of a simple uniaxial geometry, since the cell is stretched between two glass microplates, a rigid one and a flexible one [9]. The two arms bearing the microplates are set up on each side of the inverted microscope, perpendicularly to the optical axis. An XYZ piezoelectric stage, interfaced with a computer, allows to accurately control the gap between the plates. The stiffness of the flexible plate is independently calibrated, therefore it is possible to simultaneously measure the force applied to the cell, and its deformation. A real time detection and an efficient feedback loop were implemented, in order to monitor and control the flexible plate deflection. Thus the setup can be used as a constant stress micro-rheometer. The whole setup is isolated from vibrations and is maintained at $37 \pm 0.2\ ^\circ\text{C}$.

Each cell stretched in the gap between the microplates is visualized under bright light illumination and its image is recorded with a digital charge-coupled device (CCD) camera, as shown for instance in Fig. 1. The position of the tip of the thin flexible plate is held constant to ensure that the plate deflection and therefore the applied force remain constant. The strain $\varepsilon(t)$ is defined as $[L(t) - L_0]/L_0$, where $L(t)$ represents the cell length at time t and $L_0 = L(0)$ its initial length when the force step is applied. The applied stress σ_0 is taken as the ratio between the constant applied force F_0 and an effective area A of the cell section. An estimate of this effective area is given by the mean value of the measured contact areas of the cell at each microplate, assumed to be circular. For each cell, the creep function $J(t)$ is derived from

$$J(t) = \varepsilon(t) / \sigma_0. \tag{1}$$

E. Measurement of the complex viscoelastic modulus $G_e(\omega)$

An optical tweezers setup is used to measure the viscoelastic modulus of the cytoskeletal network, by applying

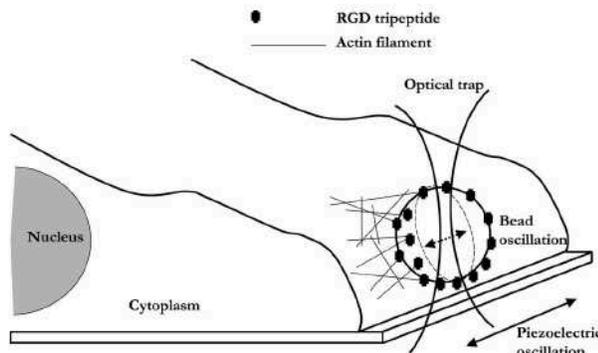


FIG. 2. Principle of the measurements of the complex viscoelastic modulus $G(\omega)$, using the optical tweezers setup. A silica microbead, specifically bound to given membrane receptors, is trapped in the focused laser beam, and is used as a handle to apply a force to the cytoskeleton. The experimental chamber is submitted to a sinusoidal displacement at frequency $f = \omega / 2\pi$, while the optical trap is kept at a fixed position. The applied force and the cell deformation are deduced from the displacements of the bead x_b and of the chamber x_c .

an oscillating force to a microbead specifically bound to transmembrane receptors (see cell culture and coating). The setup and force calibration have been previously described [13,29]. The experimental chamber is mounted on a piezoelectric stage and is submitted to a sinusoidal displacement at frequency $f = \omega / 2\pi$, while the trap is kept at a fixed position (Fig. 2). The displacements of the chamber $x_c(t)$ and of the bead $x_b(t)$ are recorded with a fast (500 Hz) CCD camera. At any time, the force $F(t) = \hat{F}(\omega) \exp(j\omega t)$ exerted on the bead is calculated from the bead-trap distance x_b according to the calibration curves, while the cellular deformation is related to the relative displacement $x(t) = x_c(t) - x_b(t) = \hat{x}(\omega) \exp(j\omega t)$ between the chamber and the bead. Here $\hat{F}(\omega)$ and $\hat{x}(\omega)$ are complex numbers, with a relative nonzero phase. Using Labview®, we generate a sequence of successive sinusoidal signals at given frequencies (from 0.05 to 50 Hz), which control the piezoelectric ceramic motion $x_c(t)$, and a synchronous sequence of pulses to trigger the image acquisition. In order to minimize a possible actin remodeling at the bead periphery, or the effect of a slow drift of the bead on the cell surface, the total duration of a measurement on the same single cell never exceeds 2.5 min, a time short as compared to the 30 min incubation time for the adherence of the bead to the cell.

The derivation of the complex modulus $G_e(\omega)$ from $\hat{F}(\omega)$ and $\hat{x}(\omega)$ is described in Appendix B, and requires formula (B5):

$$\hat{F}(\omega) = 2\pi R G_e(\omega) f(\Theta) \hat{x}(\omega). \tag{2}$$

Here the cell is considered as an elastic homogeneous medium. The dimensionless factor $f(\Theta)$, for which we calculated an analytic expression [formula (B3)] [12], accounts for the actual immersion of the bead into the cell. The parameter Θ is defined as half the angle of the immersion cone

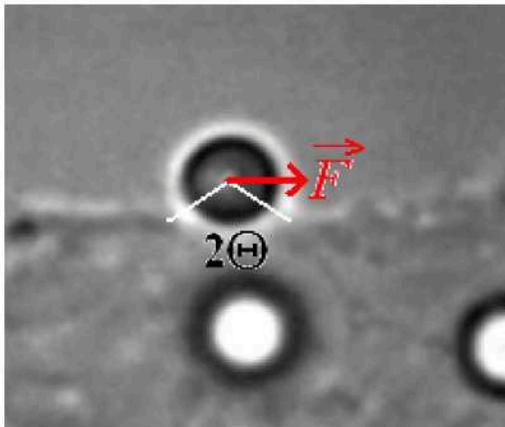


FIG. 3. (Color online) Axial view of a bead ($3.47 \mu\text{m}$ in diameter) partially embedded into the cell edge, and trapped in the optical tweezers. The force F is applied tangentially to the cell membrane. The derivation of the complex viscoelastic modulus $G(\omega)$ takes into account the value of the immersion angle Θ of the bead into the cell, estimated from the image.

of the bead (of radius R) into the medium. Since we restrict our measurements to the beads bound to the side of the cells, Θ is estimated from axial image recordings in the vertical direction (Fig. 3).

III. MEASUREMENTS OF THE VISCOELASTIC PARAMETERS FOR DIFFERENT CELL TYPES

A. Creep function and viscoelastic modulus of premuscular C2 cells

A typical recording of the creep function $J(t)$, obtained for a single C2 cell with the stretching rheometer, is shown in

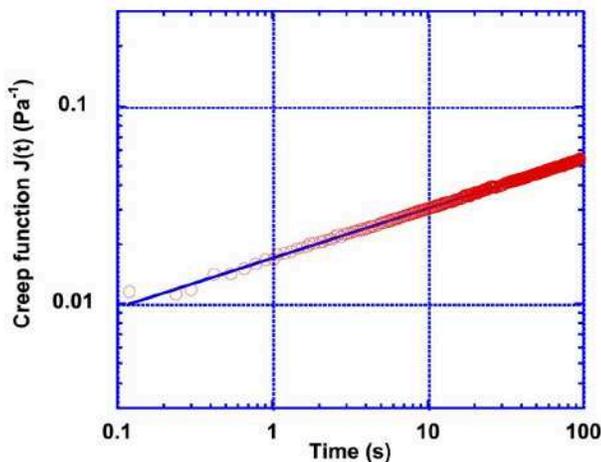


FIG. 4. (Color online) Plot of the creep function $J(t)$, measured for a single C2 myoblast with the stretching rheometer. Here the cell is attached to the glass plates through glutaraldehyde coating. Over three decades in time, $J(t)$ is very well fitted by a power law $J(t) = A_0(t/t_0)^\alpha$. For this particular cell, the exponent α is found equal to 0.25.

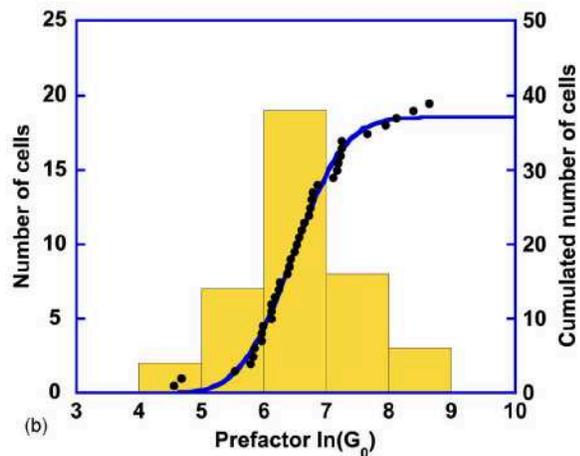
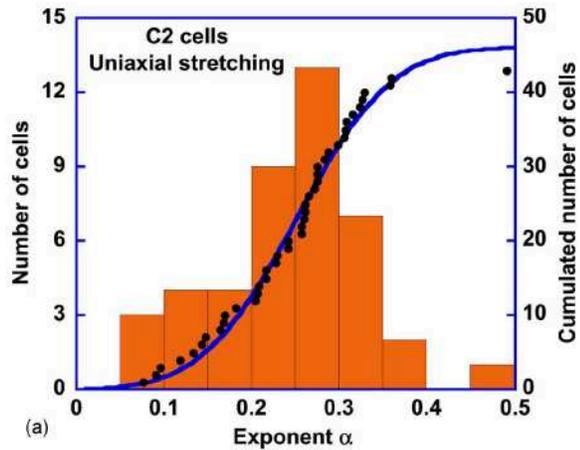


FIG. 5. (Color online) Histograms of the distributions of the exponents α (a) and of the logarithms of the prefactors $\ln(G_0)$ (b), measured with the stretching rheometer on a set of 43 C2 myoblasts, attached to the plates through glutaraldehyde coating. The cumulative distributions of α and $\ln(G_0)$ are also plotted (black dots). They are correctly fitted by an error function $1 + \text{erf}[(x - x_0)/\sqrt{2}\sigma]$ (blue lines). This indicates that the distribution of the exponents α is a normal distribution, and that the distribution of the prefactors G_0 is log-normal. The fits give the best estimates for the average exponent $\langle \alpha \rangle = 0.242 \pm 0.013$, and for the median value of the prefactor $G_{0M} = \exp(\langle \ln(G_0) \rangle) = 640(+80/-70) \text{Pa}$.

Fig. 4. Over three orders of magnitude in time ($0.1 < t < 100 \text{ s}$), $J(t)$ is remarkably well fitted by a power law $J(t) = A_0(t/t_0)^\alpha$, with $\alpha = 0.25$ and $A_0 = 0.017 \text{ Pa}^{-1}$. We stress the fact that t_0 is not a parameter of the fit, but an arbitrary reference time, for which $J(t)$ takes the value A_0 . The dimension of A_0 is therefore the same as J . For all the measurements, we chose for convenience $t_0 = 1 \text{ s}$. As already shown in [11], any attempt to adjust $J(t)$ by a sum of a few exponential functions in the full time range leads to a much poorer agreement. There is an exact equivalence between a power law behavior of $J(t)$ as a function of time t , and a power law behavior of the complex viscoelastic modulus $G_s(\omega)$ as a function of the frequency ω [Eqs. (A5)–(A7) in

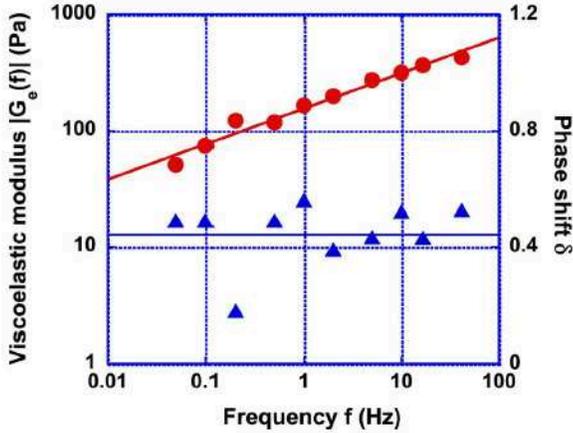


FIG. 6. (Color online) Plot of the modulus $|G_e|$ and of the phase δ of the complex viscoelastic coefficient $G_e(\omega)$ measured with optical tweezers, as a function of the frequency $f = \omega/2\pi$, for a single C2 myoblast. The bead is coated with RGD peptides and binds to integrins. $|G_e|$ behaves as a power law of f over three frequency decades, with an exponent α here found equal to 0.30. The phase shift δ remains constant in the studied frequency range. This is consistent with the power law behavior of the creep function $J(t)$ measured with the stretching rheometer for the same C2 cell type.

Appendix A]. Consequently, the value of $|G_e(\omega)|$ derived from this experiment may be expressed as

$$|G_e(\omega)| = \frac{\omega^{\alpha} t_0^{\alpha}}{A_0 \Gamma(1 + \alpha)} = G_0 \left(\frac{\omega}{\omega_0} \right)^{\alpha}, \quad (3)$$

where Γ represents the Euler function (defined in Appendix A). From Fig. 4, one can calculate a typical value $G_0 = |G_e(\omega_0)| = 103$ Pa for this particular curve at the chosen reference frequency $\omega_0/2\pi = 1/t_0 = 1$ Hz.

A remarkable feature is that all the tested cells belonging to the same C2 population exhibit a similar power law behavior. Figures 5(a) and 5(b) show, respectively, the measured distributions of the exponent α and of the logarithm $\ln(G_0)$ from a set of 43 different C2 cells, glued to the glass plate through a glutaraldehyde coating. On the same Figs. 5(a) and 5(b) are also plotted the cumulative distributions of α and $\ln(G_0)$. The cumulative distributions are well adjusted by an error function

$$E(x) = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \operatorname{erf} \left(\frac{x - x_0}{\sqrt{2}\sigma} \right) \\ = \frac{1}{2} + \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \int_0^x \exp \left(-\frac{(x' - x_0)^2}{2\sigma^2} \right) dx'. \quad (4)$$

One notices that the distribution of exponents α closely follows a normal law, while the distribution of prefactors G_0 appears log normal. From the erf fits one retrieves the best estimates of the average exponent of the power law $\langle \alpha \rangle = 0.242$, of the standard deviation $\sigma_{\alpha} = 0.082$, and of the standard error $\Delta_{\alpha} = 0.013$ (see Table I). Similarly, for $\ln(G_0)$, the estimated averaged value is $\langle \ln(G_0) \rangle = 6.46$, the standard deviation is $\sigma_G = 0.82$, and the standard error is $\Delta_G = 0.12$. Ac-

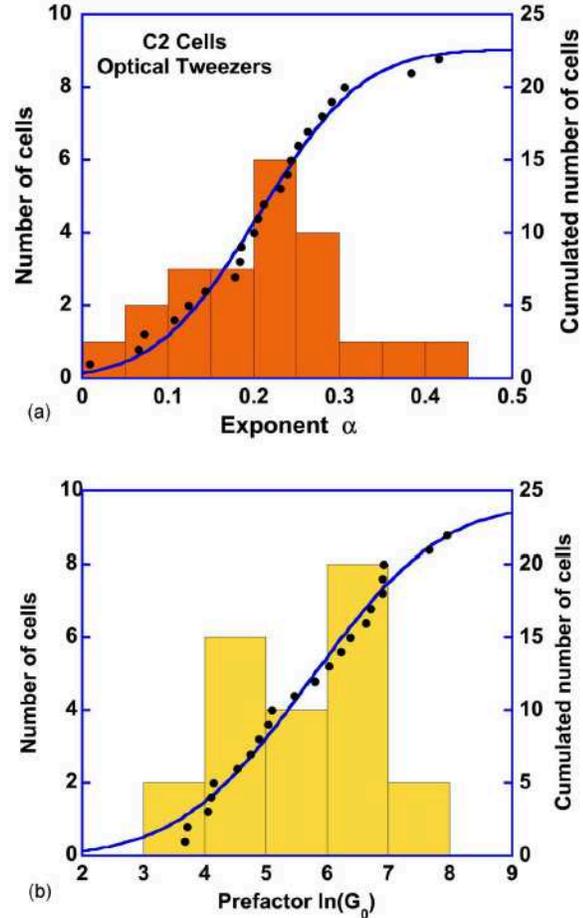


FIG. 7. (Color online) Histograms of the distributions of the exponents α (a) and of the logarithms of the prefactors $\ln(G_0)$ (b), measured with the optical tweezers on a set of 22 C2 myoblasts. The beads bind to integrins via RGD coating. The cumulative distributions (black dots) are well adjusted by an error (erf) function (blue line). The best estimate for the average exponent is $\langle \alpha \rangle = 0.208 \pm 0.021$, and for the median value of the prefactor is $G_{0M} = 310(+130/-100)$ Pa.

cordingly, for $|G_e(\omega)|$ at 1 Hz, one infers the median value $G_{0M} = \exp(\langle \ln(G_0) \rangle) = 640(+80/-70)$ Pa. Notice that the mean value $\langle G_0 \rangle = 1060 \pm 190$ Pa is higher than G_{0M} , which is consistent with a log-normal, nonsymmetric distribution of G_0 .

A parallel analysis was performed on the same C2 cell type studied with the optical tweezers setup. In this case, by applying a sequence of oscillating stresses to a single cell at different frequencies, one directly measures the complex viscoelastic coefficient $G_e(\omega)$ as a function of ω . In the experiments described below, all the beads are RGD coated and bind to the cells through integrins. In Fig. 6 the measured values of the modulus $|G_e|$ and of the phase δ of $G_e(\omega)$ are shown for a single C2 cell, as a function of the frequency $f = \omega/2\pi$, in the range 0.05–50 Hz. As in the cell stretching experiment, $|G_e|$ behaves as a power law of f over three frequency decades. For this particular cell, the exponent α is

TABLE I. Comparison of exponents α and prefactors G_0 measured for different cell types, using two microrheological techniques (uniaxial stretching or optical tweezers), and through different adhesion receptors.

| Cell type | $\langle \alpha \rangle$ | σ_α (std. deviation) | Δ_α (std. error) | $\langle \ln G_0 \rangle$ | σ_G (std. deviation) | Δ_G (std. error) | G_{0M} (Pa) (median value) | $\langle G_0 \rangle$ (Pa) (mean value) | No. of cells | Technique/coating |
|---------------------------|--------------------------|----------------------------------|------------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------------|---|--------------|------------------------------------|
| Myoblasts C2 | 0.242 | 0.082 | 0.013 | 6.46 | 0.82 | 0.12 | 640 (+80/-70) | 1060±190 | 43 | Uniaxial stretching/ glutaraldehyd |
| Myoblasts C2 | 0.29 | 0.07 | 0.02 | 6.75 | 0.26 | 0.08 | 850 (+75/-65) | | 12 | Uniaxial stretching/ cadherin |
| Myoblasts C2-7 | 0.208 | 0.098 | 0.021 | 5.73 | 1.68 | 0.36 | 310 (+130/-100) | 570±150 | 22 | Optical tweezers/ RGD |
| Alveolar epithelial A549 | 0.219 | 0.067 | 0.014 | 6.04 | 0.82 | 0.17 | 420 (+80/-70) | 705±155 | 23 | Optical tweezers/ RGD |
| Alveolar epithelial A549 | 0.181 | 0.06 | 0.014 | 4.41 | 1.43 | 0.33 | 80 (+25/-20) | 160±40 | 19 | Optical tweezers/ anti-ICAM-1 |
| Macrophages | 0.25 | 0.11 | 0.04 | 7.70 | 0.46 | 0.16 | 2210 (+390/-330) | | 8 | Uniaxial stretching/ glutaraldehyd |
| Macrophages | 0.20 | 0.08 | 0.03 | 7.55 | 0.73 | 0.27 | 1910 (+600/-460) | | 7 | Uniaxial stretching/ fibronectin |
| Fibroblasts L929 | 0.15 | 0.06 | 0.02 | 4.16 | 1.14 | 0.36 | 65 (+25/-20) | 170±90 | 10 | Optical tweezers/ RGD |
| Fibroblasts primary cells | 0.26 | 0.07 | 0.02 | 6.61 | 1.48 | 0.41 | 750 (+380/-250) | | 13 | Uniaxial stretching/ glutaraldehyd |
| Canin kidney MDCK | 0.18 | 0.10 | 0.03 | 7.58 | 1.24 | 0.39 | 1950 (+950/-600) | 3660±1150 | 10 | Optical tweezers/ RGD |

found equal to 0.30, and the value G_0 of $|\mathcal{G}_e|$ at 1 Hz is found equal to 155 Pa. Moreover, the measured phase shift δ remains constant, within a good approximation, in the studied frequency range. Its average value is equal to 0.45, very close to the theoretically expected value $\alpha\pi/2=0.47$ [see formula (A7) in Appendix A].

For a whole set of C2 cells tested with optical tweezers, $\mathcal{G}_e(\omega)$ present similar power law behaviors. Figures 7(a) and 7(b) show the distributions of the exponent α and of the logarithm $\ln(G_0)$ of $|\mathcal{G}_e|$ at 1 Hz, measured for 22 different C2 cells, together with the cumulative distributions of α and $\ln(G_0)$. As in Figs. 5(a) and 5(b), the α distribution follows a normal law, while the distribution of G_0 appears log normal. We have obtained the best estimates: $\langle \alpha \rangle = 0.208 \pm 0.021$, $G_{0M} = 310 (+130/-100)$ Pa (median value), and $\langle G_0 \rangle = 570 \pm 150$ Pa (mean value).

It is remarkable that the two experiments (uniform stretching and local oscillating force), performed in quite different conditions, lead to the same power law behavior, with approximately the same exponent $\alpha \approx 0.22$ (within experimental error). However, one notices that the prefactor G_0 differs in the two cases. Several possible origins of this difference will be discussed in Sec. IV.

B. Viscoelastic modulus of cells excited through different receptors

With the optical tweezers setup, we have also performed oscillating force experiments with alveolar epithelial cells (A549). Here we compared the results obtained by using two

different mechanical receptors on which the stress is applied: integrins and ICAM-1. ICAM (intercellular adhesion molecules) are transmembrane proteins which allow, for instance, the macrophages to adhere and to migrate over the pulmonary epithelium [30]. The beads are either coated with RGD peptide or anti-ICAM-1 ligands. Except for the nature of the receptor, the experimental protocols are identical in the two cases. For each single cell, the observed behavior of the elastic modulus $\mathcal{G}_e(\omega)$ is very similar in both series of experiments. It is also similar to the one described above for C2 cells: $|\mathcal{G}_e(\omega)|$ behaves as a power law of the excitation frequency, while the phase δ remains approximately constant. The exponent α of the power law is close to 0.2 in both cases. The results are summarized in Table I and in Figs. 8 and 9. Over two sets of cells ($N=23$ and 19, respectively), one observes normal distributions for the exponent α : $\langle \alpha \rangle = 0.219 \pm 0.014$ for RGD coating and $\langle \alpha \rangle = 0.181 \pm 0.014$ for anti-ICAM-1 coating. The prefactor G_0 at $f=1$ Hz follows a log-normal distribution, with median values $G_{0M} = 420 (+80/-70)$ Pa (RGD coating) and $G_{0M} = 80 (+25/-20)$ Pa (anti-ICAM-1 coating). While the mean values $\langle \alpha \rangle$ of the exponent appear very close to each other for both coatings, the median value G_{0M} is found appreciably lower when the stress is applied through ICAM-1 than when it is applied through integrins.

Using the uniaxial rheometer we also compared the creep functions of C2 myoblasts stretched (i) through nonspecific mechanical receptors (plates coated with glutaraldehyde that binds any protein of the cell surface—data already detailed in the previous section) and (ii) through cadherins, the spe-

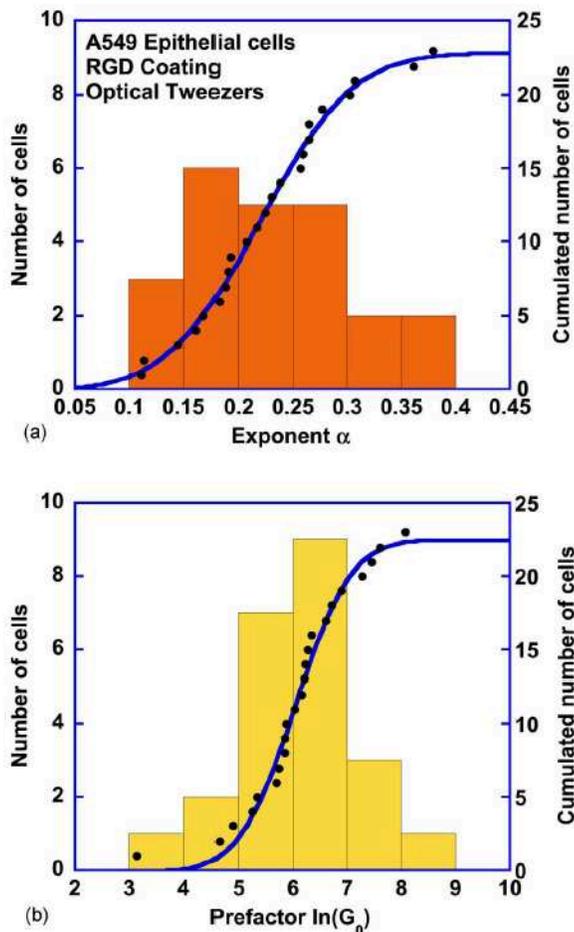


FIG. 8. (Color online) Histograms of the distributions of the exponents α (a) and of the logarithms of the prefactors $\ln(G_0)$ (b), measured with the optical tweezers on a set of 23 epithelial alveolar cells A549. The beads bind to integrins via RGD coating. The distributions of α and G_0 are normal and log-normal, respectively. From the erf fits of the cumulated distributions, the best estimate for the average exponent is $\langle \alpha \rangle = 0.219 \pm 0.014$, and for the median value of the prefactor is $G_{0M} = 420(+80/-70)$ Pa.

cific proteins of cell-cell adhesion. In both cases, the creep function is a weak power law of the time. The two sets of cells ($N_{glu}=43$ and $N_{cad}=13$) shows normal distributions for the exponent α , with $\langle \alpha_{glu} \rangle = 0.242 \pm 0.013$ and $\langle \alpha_{cad} \rangle = 0.29 \pm 0.02$. The prefactor G_0 at $f=1$ Hz follows a log-normal distribution, with median values $G_{0M} = 640(+80/-70)$ Pa (glutaraldehyde) and $G_{0M} = 850(+75/-65)$ Pa (cadherin). Unlike the Integrin/ICAM-1 comparison in the previous paragraph, here the median values G_{0M} are very close to each other for both coatings, while the mean value $\langle \alpha \rangle$ of the exponent is found appreciably higher when the stress is applied through cadherins than through glutaraldehyde. However, in both Integrin/ICAM-1 and Cadherin/Glutaraldehyde comparisons, an increase of $\langle \alpha \rangle$ is related to an increase of G_{0M} . Such a correlation between $\langle \alpha \rangle$ and G_{0M} values can be understood by considering molecular motor activity for in-

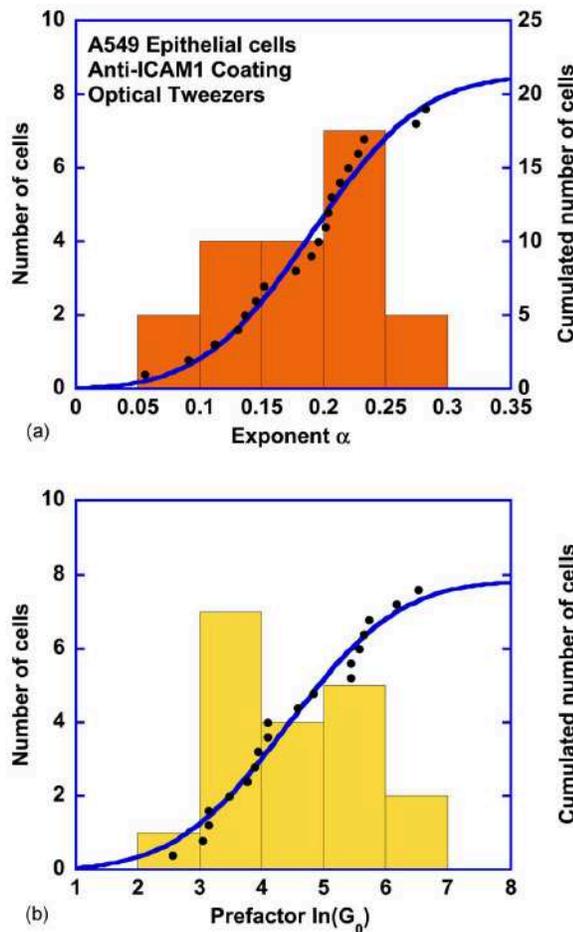


FIG. 9. (Color online) Histograms of the distributions of the exponents α (a) and of the logarithms of the prefactors $\ln(G_0)$ (b), measured with the optical tweezers on a set of 19 epithelial alveolar cells A549. The beads bind to integrins via anti-ICAM1 coating. From the erf fit of the cumulated distributions, the best estimate for the average exponent is $\langle \alpha \rangle = 0.181 \pm 0.014$, and for the median value of the prefactor is $G_{0M} = 80(+25/-20)$ Pa.

stance [13], and is correctly taken into account by the mechanical model presented in Sec. V.

C. Other cell types

As reported in Table I, we have performed microrheological experiments on several other cell types, using either uniaxial stretching or optical tweezers, and in various coating conditions. The individual cell behavior appears strikingly independent of the cell type and of the experimental conditions. When stretching the whole cell, the creep function $J(t)$ is accurately adjusted by a power law function of time t . Similarly, in oscillating force experiments, the viscoelastic modulus $G_s(\omega)$ behaves as a power law of the excitation frequency. As seen in Table I, the average exponent $\langle \alpha \rangle$ of the power law always remains in the range 0.15–0.25, whatever the cell type and function: this holds for premuscular cells (C2 myoblasts), epithelial cells (alveolar A549 and

MDCK), fibroblasts (primary and L929), and macrophages (primary). Although the number of cells tested may not always be high enough to yield an accurate statistic, the prefactor G_0 of the complex modulus at 1 Hz seems to follow a log-normal distribution. Contrary to what is observed for the exponent α , the median value G_{0M} of G_0 appears to depend on the cell type and on the experimental conditions (see discussion in following section).

IV. COMPARISON WITH OTHER EXPERIMENTAL RESULTS

The most prominent feature emerging from the experiments is the robustness of the power law behavior, independent of cells types and experimental conditions, as summarized in Table I. The average values $\langle\alpha\rangle$ of the exponent remain very close to 0.2. This result is independent of the biological cell function, the length scale of the experiment, and the nature of the complex transmitting the stress. Other experiments performed on other cell types, and with different techniques, confirm such universal features of the cell mechanical behavior.

A. Optical Magnetic Twisting Cytometry experiments

First, Fabry and co-workers [19] have performed optical magnetic twisting cytometry (OMTC) on human airway smooth muscle cells (HASM). The experiment consists of applying an oscillatory torque to a magnetic bead bound to the cell membrane, and optically tracking its displacement. They have shown that the viscoelastic modulus G_s follows a power law of the driving frequency, in the range 10^{-2} –100 Hz. They measured an exponent $\langle\alpha\rangle = 0.204 \pm 0.002$ in control conditions, at a temperature $T = 37^\circ\text{C}$. This exponent only varies when the cells are treated with stiffening or depolymerizing agents of the cytoskeleton. Still in control conditions, and assuming that the magnetic beads are, on average, embedded by 10% into the cell ($\langle\Theta\rangle \approx 37^\circ$), they compute a median value of G_s at 1 Hz approximately equal to 2000 Pa [31]. However their definition of the viscoelastic coefficient G_s , which reduces to a static shear modulus μ at low frequency, is different from ours, G_θ , which is defined from the Young modulus E . Assuming that the cell medium is incompressible ($E/\mu=3$), this leads to $G_{0M} \approx 6000$ Pa for HASM cells. Lenormand *et al.* [24] have adapted the OMTC technique, and measured the creep function $J_c(t)$ on the same HASM cell type as Fabry and co-workers [19], by applying a constant step torque on a magnetic bead bound to the cell. As expected, they found that $J_c(t)$ is proportional to t^α , with $\langle\alpha\rangle = 0.209 \pm 0.003$. Converted into elastic coefficient, the prefactor has the same order of magnitude as in the oscillatory experiment.

For other cell types studied by OMTC [23], power laws were again observed, with quite identical exponents: $\langle\alpha\rangle = 0.195 \pm 0.005$ for mouse embryonic carcinoma cells (F9), $\langle\alpha\rangle = 0.173 \pm 0.005$ for human bronchial epithelial cells J(HBE), $\langle\alpha\rangle = 0.200 \pm 0.009$ for mouse macrophages (J744.A) and $\langle\alpha\rangle = 0.186 \pm 0.008$ for human neutrophils. The associated prefactors G_{0M} at 1 Hz could not be easily retrieved, since

they depend on the exact angle of immersion Θ of the bead into the cells, which is not reported. Assuming that the height of immersion is comprised between 10% and 30% of the bead diameter ($37^\circ < \Theta < 66^\circ$), and following the simulations of Mijailovitch *et al.* [31], G_{0M} falls in the range 130–900 Pa (F9), 1000–8000 Pa (HBE), 1500–10 000 Pa (J744.A), and 500–3600 Pa (neutrophils).

B. Atomic Force Microscopy experiments

By probing cells with the oscillating tip of an atomic force microscope (AFM), Alcaraz *et al.* [8] were also able to measure the frequency dependant viscoelastic modulus $G_s(\omega) = G'(\omega) + G''(\omega)$ for epithelial alveolar cells (A549), in the range 0.1–100 Hz, at room temperature ($T \approx 20^\circ\text{C}$). Consistently with the present work and Fabry's work, they observe that both G' and G'' are proportional to ω^α with $\langle\alpha\rangle = 0.22$. The corresponding mean value of $G_0 = G_s(\omega) = 3G_s(\omega)$ at 1 Hz is $\langle G_0 \rangle \approx 2200$ Pa. Probing the same cell type (A549) by magnetic twisting cytometry (MTC), in the same frequency range, Trepas *et al.* [32] found power laws with an exponent $\langle\alpha\rangle = 0.214$ and a median value of the prefactor G_0 : $G_{0M} \approx 2000$ Pa (this value is highly dependent on the bead immersion, here taken equal to 30% on average). Notice that we have measured the same exponent $\langle\alpha\rangle$ in our experiments on A549 cells (Table I). However the values of G_{0M} (or $\langle G_0 \rangle$) are about threefold to fivefold higher in AFM and MTC than the values measured by optical tweezers and stretching rheometer (see Table I). Possible origins of these disagreements are discussed below.

The same AFM technique was applied to human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) [8], which should not noticeably differ from the HBE cells probed by Fabry *et al.* Their results are very similar, leading to $\langle\alpha\rangle = 0.20$ and $\langle G_0 \rangle = 2400$ Pa. Independently, Puig-de-Morales *et al.* probed the same BEAS-2B cell with MTC, at $T = 37^\circ\text{C}$ [33]. They retrieved values of $\langle\alpha\rangle = 0.27$ and of $\langle G_0 \rangle$ about one order of magnitude lower than in Ref. [32].

C. Active and passive microrheology on embedded probes

It is of great interest to mention the results of some passive microrheology experiments, consisting in measuring the viscoelastic coefficients of the intracellular medium by following the motion of submicron particles embedded in the cytoplasm. Yamada and co-workers [20] measured the mean square displacement $\langle\Delta r^2(t)\rangle$, as a function of time, of spherical endogenous granules present in kidney epithelial cells COS7, from which they inferred the frequency dependent viscoelastic modulus $G_s(\omega)$. The motion of the granules is clearly subdiffusive, and, although the authors do not explicitly mention this interpretation, the variations of $G_s(\omega)$ are consistent with a power law $|G_s(\omega)| = G_{0s}\omega^\alpha$ in the range $1 < \omega < 10^4$ rad/s. The exponent α is of the order of 0.5 in the perinuclear region, and 0.33 in the lamellar region, where the density of actin is higher. The average value of $|G_s(\omega)| = 3|G'_s(\omega)|$ at 1 Hz ($\omega = 2\pi$ rad/s) is $\langle G_0 \rangle \approx 70$ Pa in the perinuclear region and $\langle G_0 \rangle \approx 210$ Pa in the lamellar region. In a

similar way, Tseng *et al.* [21] recorded the motion of carboxylated microspheres microinjected in 3T3 fibroblasts. It is harder in this case to characterize their subdiffusive motion by a single exponent. However, the measured average compliance of the cytoplasm at a time scale $\tau=0.1$ s is in the range $0.01\text{--}0.03$ Pa $^{-1}$, which leads to $\langle G_0 \rangle$ around 100–300 Pa at 1 Hz. More recently, Yanai *et al.* [14] used optical tweezers to apply step forces on endogenous granules embedded in human neutrophils, and showed that the response is well represented by a power law of exponent about 0.5. Besides, Lau *et al.* [22] measured the two-point correlation function of the mean-square displacement of embedded particles. They found a power law, consistent with an exponent α close to 0.25 for the complex shear modulus. Actually, a two-point microrheology experiment is expected to be more sensitive to the cytoskeletal deformations than one-point microrheology. This indicates at least that one must be cautious when comparing the results of experiments performed on embedded particles and on probes specifically bound to transmembrane receptors.

In an attempt to synthesize this large amount of experimental work, one observes enough common properties to bring out some general features in the cell mechanical behavior:

(a) The microrheological behavior of the cell is quite accurately described by power laws. This holds either for active microrheology (viscoelastic modulus, creep function) or for passive microrheology (diffusion of particles). This clearly states that the cell mechanics involve a broad distribution of response times.

(b) Except in particle tracking microrheology experiments, in which the probes are not directly attached to the cytoskeleton, the average exponent of the power law lies in a narrow range: $0.15 < \alpha < 0.25$. This result is independent of the experimental technique, of the probe lengthscale, of the cell type and of the nature of the complex transmitting the stress. Adding drugs which induce the stiffening (contractile agents like thrombin, histamin), or the softening (disrupting agents like cytochalasin D or latrunculin) of the cytoskeleton [23,32,34], does not induce a dramatic change of this exponent. Only the inhibition of the actomyosin activity by blebbistatin may cause α to lower down to about 0.10 [13]. The very robust feature of the cell response can only be explained by some common structural organization of the cytoskeletal network, independent of the length scale and of the biological cell function. In Sec. V we propose to model this by a self-similar assembly of elementary mechanical units.

(c) Within a set of cells of the same type, probed by the same technique, we observe that the repartition of the viscoelastic modulus $G_0 = |G_e(\omega)|$ at 1 Hz is asymmetric and clearly follows a log-normal distribution. This distribution is characterized by its median value $G_{0M} = \exp(\langle \ln(G_0) \rangle)$. Other authors also reported such log-normal repartitions [23,32,34]. The model developed in Sec. V provides an interpretation of this log-normal distribution.

(d) from one cell type to another, but also within a same cell type from one experimental technique to another, measurements of G_{0M} —or of $\langle G_0 \rangle$ for the authors who do not

make the distinction between G_{0M} and $\langle G_0 \rangle$ —present a wide dispersity (from about 10^2 to about 10^4 Pa). A global and consistent interpretation of the origin of this dispersion appears much more difficult to elaborate. Indeed, several competing factors can be invoked to explain the observed differences, some of them being related to intrinsic biological mechanisms, others to experimental conditions or possible artifacts. We enumerate below some of them.

(i) The cell type, associated to a given function, is expected to have a relevant influence on the cell average stiffness. The density of actin in the cell, but also the structure of the actin network should indeed largely determine the cell rigidity. Moreover, the activity of molecular motors and their spatial distribution are known to contribute to the cytoskeleton dynamics, and thus to its mechanical behavior. Actually, it appears difficult to bring out from existing data some mechanical characteristics associated to a given cell type, all the more difficult as other factors do also influence the cell stiffness.

(ii) In both OMTc and optical tweezers (OT) experiments, the determination of G_0 is very sensitive to the precise knowledge of the bead immersion angle Θ . This parameter is difficult to measure with a good accuracy from the images of single cells. Besides, taking an average value for $\langle \Theta \rangle$ may lead to overestimate the contribution of weakly bound beads, and thus to underestimate $\langle G_0 \rangle$ [12,35]. Moreover, G_0 is not calculated in the same manner according to different authors. In this work, $G_e(\omega)$ is derived from formula (B5), where the analytical function $f(\Theta)$ accounts for the Θ dependence [formula (B3)]. In OMTc experiments [19,23,24,32,34], the Θ dependence is included in the factor β [formula (B6)] numerically computed in a finite element model [31]. A comparison limited to the bead rotation contributions in both cases shows that the numerical prefactor in Eq. (B5) is about twice the one in Eq. (B7). This may partly explain why, for the same cell type, the reported values of G_{0M} are smaller in OT experiments than in OMTc experiments.

(iii) It is known that the mechanical properties are not homogeneous inside a same cell, and also depend on the cell activity. For fibroblasts, Kole *et al.* [36] have measured that the stiffness in the lamellipodium, where the actin network is denser, is about four times higher than in the perinuclear region. This difference almost vanishes for quiescent fibroblasts. Besides, for migrating neutrophils, Yanai *et al.* showed that $\langle G_0 \rangle$ is almost 10 times smaller in the leading edge than in the cell body or tail [14]. In this case the relative fluidity of the pseudopod may be related to a cytoplasmic flow, driven by a pressure gradient. For spread cells like HeLa, the viscosity experienced by magnetic endosomes embedded in the cytoplasm is found on average eight times higher in the perinuclear region than further away from the cell center [18]. In this last case the correlation to the cell rigidity is not discussed. Other authors [37] have reported that the average cellular medium rigidity decreases by several orders of magnitude when the size of the mechanical probe increases from a few tens nanometers (AFM tip) to a few microns (micropipettes). Although such observations may depend on the cellular type, and consequently general

trends are not easy to derive, these different factors may contribute to the dispersion reported above.

(iv) Cell viscoelastic properties are also sensitive to the temperature. Lo and Ferrier [38] performed mechanical tests on osteosarcoma cells, and observed that the average stiffness, estimated from a Kelvin-Voigt model, decreases by a factor 1.5 when the temperature increases from 22 °C to 37 °C. This effect probably contributes to explain the difference between the high G_{OM} (or $\langle G_0 \rangle$) values measured on A549 and BEAS-2B cells with AFM at 20 °C [8,32] and the lower ones measured by OT or MTC techniques at 37 °C [this work, [23,33]].

(v) Comparing the transmission of the mechanical signals through different kinds of receptors remains largely an open question. On HASM cells probed by MTC, it has been shown that the power law exponent does not significantly vary when the bead is covered by RGD (binding to $\beta 1$ integrin), vitronectin (VN) (preferentially binding to $\beta 3$ integrin), uPA urokinase (indirectly binding to the cytoskeleton via caveolin), or AcLDL (which binds to a nonadhesive site, not linked to the cytoskeleton) [34]. However, in the same conditions, the relative value of G_{OM} decreases by a factor of 4 from RGD to VN, and a factor of 10 from RGD to uPA or AcLDL. In this work, we report a difference in the viscoelastic coefficients measured on the same A549 cells through integrin and ICAM-1 receptors on the one hand, on the same C2 cells through glutaraldehyde and cadherin on the other hand (Table I). However, in all these studies, the amount of coating was never precisely controlled, which may also bias the results [see below point (vi)]. Further works are necessary before drawing conclusions about the influence of the receptor and/or ligand couple.

(vi) Finally, this analysis must include questioning about the structure of the contact itself, which depends on the amount of molecular bonds, and on the dynamical evolution due to cytoskeletal remodeling. Concerning this last point, it is known that applying a constant stress at a focal contact induces within a few minutes local recruitment of integrin, actin and other proteins involved in the contact assembly, which reinforces the contact [39–41]. A similar effect was observed on adherent junctions [42]. Bursac *et al.* [43] have observed that applying a high amplitude oscillating stress to a magnetic bead bound to the cell makes immediately the contact more compliant, and that the contact strengthens again within a few minutes after releasing the stress. But to our knowledge, there is no report of the evolution of G_0 during the spontaneous formation of a bead-cell contact, nor during its reinforcement under a continuous stress. A related concern is to determine how the initial number of molecular bonds at the bead-cell contact affects the mechanical response. The coating protocol of the bead by the ligand is obviously a key step, but no method has been yet reported to quantify the amount of ligand in a reliable way.

The above discussion points out the existence of numerous physical and biological parameters, which may interfere in opposite ways, and probably induce the large dispersion of the measured values of the parameter G_0 . In the absence of more selective experiments focusing on the influence of each parameter, it is yet not possible to go further into a detailed interpretation of the observed differences.

V. A MODEL FOR THE RHEOLOGICAL BEHAVIOR OF A SINGLE CELL

There are numerous examples in the literature of complex viscoelastic systems showing power law rheological behaviors. This is for instance the case of colloidal systems close to the sol/gel transition [44], or of “soft glassy materials,” which includes foams, pastes, emulsions, and slurries [45,46]. A common feature of all these systems is that, due to their structural complexity, their dynamics cannot be described by a small, finite number of relaxation times. In these systems, the mechanical dissipation must take into account multiscale dynamical processes, so that their response to an external mechanical stress involves a broad and dense distribution of relaxation times. Soft glassy materials are systems dominated by structural disorder, metastability, and rearrangements, and a general description of their mechanical properties has been developed [47,48]. This model might appear as a good candidate to describe the cell medium. Indeed, it is an out-of-equilibrium and disordered system, in which the rearrangements (through dynamical crosslinking, actin polymerization, and molecular motors activity) are made possible by an external supply of chemical energy.

However, at the present stage, the analogy between the general description of soft glassy materials and the cytoskeleton network dynamics remains quite formal, since the elementary biophysical and biochemical mechanisms which govern the cytoskeleton rearrangements are not explained in this description. Some authors have developed a more phenomenological approach, where the cytoskeletal network is seen as a polarized liquid crystal, and its dynamics is coupled to the activity of molecular motors [49]. Quantitative predictions about the microrheological behavior of the cellular medium has yet to be obtained from this model.

Here we propose another description, intermediate between formal comportemental approaches and more phenomenological structural models. We consider that the cytoskeleton is made of many interconnected units of different length scales (from actin individual filaments to actin bundles and stress fibers). Their size continuously spread from the nanometer scale to the scale of the whole cell. We describe the mechanical response of each unit, labelled by the index i , by a simple Kelvin-Voigt model with a response time τ_i . Given the cytoskeleton structure, it is reasonable to assume that the characteristic response times τ_i are widely and densely distributed. The elementary creep function $j_i(t)$ associated to each unit i is such that $\frac{dj_i}{dt} = \exp(-t/\tau_i)$.

The description in terms of Kelvin-Voigt units may appear oversimplified, since it does not seem to take into account the active molecular mechanisms related to the molecular motors activity or to the filaments remodeling. However, a precise description of the elastic and dissipation processes at the molecular level may not be necessary to derive macroscopic mechanical behaviors: the spring and the dashpot associated in each unit schematically represent the storage of the elastic energy in actin filaments, bundles, and stress fibers, and its dissipation. This dissipation may include several processes, like cytoskeleton remodeling, molecular motors activity, and passive viscosity.

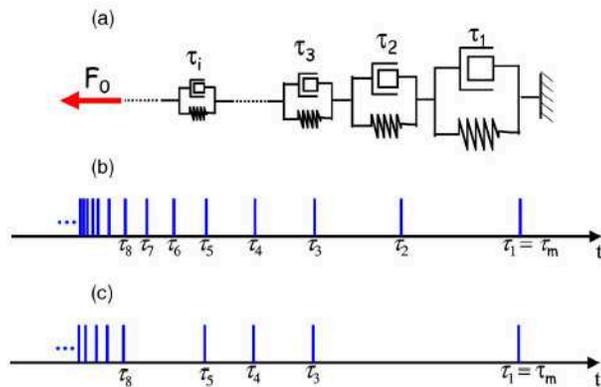


FIG. 10. (Color online) The cytoskeleton network is modelled as an infinite assembly of elementary units labelled by the index i , each of them showing a simple Kelvin-Voigt behavior with a response time τ_i (a) In the ideal case, the relaxation times τ_i are assumed to be exactly distributed according to a power law $\tau_i = \tau_m i^{-1/(1-\alpha)}$, where τ_m represents the largest relaxation time in the cell. This distribution P_0 is represented in (b). To take into account some natural dispersion, a given cell k is modelled by a proportion $p < 1$ of relaxation times, randomly selected from P_0 . An example of distribution P_k is represented in (c).

The choice of a generalized Kelvin-Voigt model, where the units are associated in a series [Fig. 10(a)], is based on convenience, and is adapted to describe creep experiments. The choice of the dual representation, namely, the generalized Wiechert-Maxwell model (in which Maxwell elements are placed in parallel), would have yielded the same results. Those two representations are equivalent, since any given model can be reduced to an equivalent series or parallel model [55]. It should be clear that it is not because we consider viscoelastic elements in series that the complex filament network of the cytoplasm is organized in such a way.

The next important ingredient of this model is the distribution $P(\tau_i)$ of relaxation times τ_i . We assume in the following that the cytoskeletal structure in the cell is close to a self-similar one. This assumption is especially supported by fluorescent images of the actin cytoskeleton, showing similarities between the large stress fibers structures at the scale of the cell and the structure of individual filaments at the nanometer scale. This implies that the elementary units introduced above are distributed according to a power law: the number of units having a given size l is taken proportional to $l^{-\xi}$, where $\xi > 0$ represents the fractal dimension of the network. Concerning the dependence of the response time τ_i with the size l_i of elementary units, it is reasonable to assume that it is depicted by a simple power law: $\tau_i \propto l_i^\beta$. As a consequence the distribution of times τ_i in the cell will itself be a power law of τ_i : $P(\tau_i) \propto \tau_i^{\alpha-2}$, with $\alpha = 1 - \xi/\beta$. Actually, such a power law distribution is a commonly used assumption in several models of complex viscoelastic solids [50]. This multiscale coupling between elasticity and dissipation processes is a main characteristic of structural damping.

Assuming first that the relaxation times are continuously distributed according to a power law $P(\tau) = B\tau^{\alpha-2}$, it is straightforward to show that the creep function response $J(t)$

of the system also follows a power law of time. Indeed the resulting time derivative of the creep function may be calculated as

$$\dot{j}(t) = \frac{dJ(t)}{dt} = \int P(\tau) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) d\tau = B\Gamma(\alpha-1)t^{\alpha-1}, \quad (5)$$

where Γ represents the Euler function (defined in Appendix A). By integrating this relation over the time t , one finds

$$J(t) = \frac{B\Gamma(\alpha-1)}{\alpha} t^\alpha = A_0 \left(\frac{t}{t_0}\right)^\alpha. \quad (6)$$

According to Eq. (3), the viscoelastic complex modulus $G_s(\omega)$ may then be expressed as a power law of frequency: $|G_s(\omega)| = G_0(\omega/\omega_0)^\alpha$.

In our model, the exponent α of the power law is related to the fractal dimension ξ of the network and to the exponent β characterizing the dependence of the response time τ with the scale l . Lacking more information about ξ and β , it is not possible at this stage to make a quantitative prediction for α .

Now we turn to the case of a discrete distribution of relaxation times τ_i . The calculations will be developed in two steps:

(1) In a first step (i) we assume an ideal power law repartition P_0 of the response time τ_i , and we show indeed that the resulting creep function $J_0(t)$ is a power law of time.

(2) In a second one (ii) we use a set of distributions P_k , extracted from P_0 by randomly deleting a given fraction of the response times τ_i . We calculate for each distribution P_k the new creep function $J_k(t)$, and analyze the distribution of $J_k(t)$ over different P_k . As will be shown in the discussion, this distribution mimics the distribution of experimental $J(t)$ measured for a set of cells belonging to the same cell type.

(i) Let us first assume that the relaxation times τ_i of elementary units are exactly distributed along the time axis according to $\tau_i = \tau_m i^{-1/(1-\alpha)}$, with $0 < \alpha < 1$. The label i varies from 1 to ∞ , so that τ_m represents the largest relaxation time in the system. Figure 10(b) shows a schematic drawing of this distribution P_0 . The particular form of this repartition has been chosen to reduce in the continuum limit to a power law distribution $P(\tau) = dl/d\tau \propto \tau^{\alpha-2}$. In this limit, one recovers an exact power law for the corresponding creep function $J_0(t)$, as obtained by integrating

$$\begin{aligned} \dot{j}_0(t) &= \sum_i \frac{dj_i}{dt} \equiv \int_1^\infty \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) di \\ &= \int_0^{\tau_m} (1-\alpha) \left(\frac{\tau}{\tau_m}\right)^{\alpha-2} \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \frac{d\tau}{\tau_m} = B_0 t^{\alpha-1}. \end{aligned} \quad (7)$$

To take into account the actual discrete character of the τ_i distribution, we have performed numerical simulations, where we calculated the exact value of $\dot{j}_0(t)$, as a function of the reduced time $\theta = t/\tau_m$. The resulting function, shown in Fig. 11 (top curve) for a typical value $\alpha = 0.20$ of the exponent, was obtained by summing 10^5 elementary units ($i = 1$ to 10^5). This covers six orders of magnitude (from 1 to 10^{-6}) for the reduced response times τ_i/τ_m . As expected, $\dot{j}_0(t)$ is perfectly adjusted by a power law of exponent $\alpha - 1 = -0.8$, in

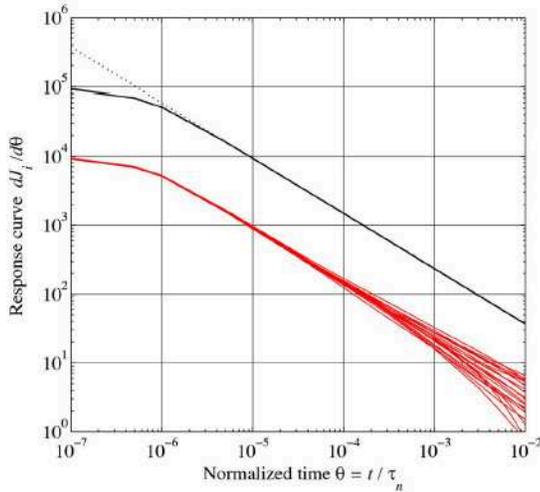


FIG. 11. (Color online) Plot of the time derivative of the creep function $dJ/d\theta$, numerically calculated for the ideal power law distribution P_0 (top curve), and for 20 more realistic distributions P_k (bottom curves) randomly extracted from P_0 as explained in the text. The time scale is normalized by the largest time relaxation in the cell τ_m . The simulations involve 10^5 elementary units, and the reference exponent in the distribution P_0 is equal to 0.20. As expected, the response function $dJ_0/d\theta$ corresponding to the distribution P_0 exactly merges into a power law (dashed curve) of exponent $\alpha-1=-0.8$, in the range $10^{-6} < \theta < 1$. For the distributions P_k , the response functions $dJ_k/d\theta$ are well adjusted by power laws in the range $10^{-6} < \theta < 10^{-2}$, with a distribution of exponents α_k close to α .

the range $10^{-6} < \theta < 1$. An increased number of elementary units would only extend the range of validity of the power law at the smallest times; it is therefore unnecessary.

(ii) In order to build a more realistic picture of the cytoskeleton dynamics, we assume now that only a proportion p of the elementary Kelvin-Voigt units are actually present in a given cell. Indeed, the response times τ_i are very unlikely to follow the smooth distribution P_0 in a real cell. One has to take into account the dispersion of results actually observed from one cell to the other. A given cell should then be represented by its actual distribution P_k of time constants, constructed by selecting, with a given probability p , a random set of relaxation times τ_i from the distribution P_0 . An example of P_k distribution is schematically represented in Fig. 10(c), together with the original P_0 distribution. Under these assumptions, the creep function $J_k(t)$ of the k cell will be calculated from $\dot{J}_k(t) = \sum_i p_i (d_j/dt)$, where p_i is a random variable equal to 1 with a probability p and to 0 with a probability $1-p$. The underlying response times τ_i remain distributed according to $\tau_i = \tau_m t^{[-1/(1-\alpha)]}$.

Numerical calculations of $\dot{J}_k(\theta)$ vs the reduced time $\theta = t/\tau_m$ were done for 500 different realizations of P_k distributions ($k=1$ to 500), with the same probability $p=0.1$. A set of 20 of them is shown in Fig. 11 (lower curves). These curves show that, at least in the range $10^{-6} < \theta < 10^{-2}$, all the $\dot{J}_k(\theta)$ functions roughly behave as power laws of θ , and exhibit approximately the same exponent $\alpha-1=-0.8$ than $\dot{J}_0(\theta)$.

Each curve $\dot{J}_k(\theta)$ was fitted by a power law $\dot{J}_k(\theta) = b_k \theta^{\alpha_k - 1}$ in the range $10^{-6} < \theta < 10^{-2}$, leading to an exponent α_k and a prefactor b_k for each realization k . The histograms of α_k and b_k are presented in Figs. 12(a) and 12(b). The distribution of α_k is symmetric, and is well fitted by a Gaussian curve centered on the value $\alpha=0.20$. On the contrary, the histogram of b_k is clearly asymmetric, but one recovers the symmetry by plotting the histogram of $\ln(b_k)$ [Fig. 12(c)]. A first prediction of these simulations is that, over several realizations mimicking the natural dispersion over different cells, the exponents α_k and prefactors b_k are, respectively, normally and log-normally distributed. As shown in Sec. VI, this is quite consistent with the normal and log-normal distributions of α and G_0 experimentally measured on a given set of cells. The width of the distributions calculated in the simulations depends on the drawing probability p . In the following, the particular value $p=0.1$ has been chosen to match the standard deviations of experimental data.

Another important feature emerging from these simulations is that the exponent α_k and prefactor b_k of the power law $\dot{J}_k(\theta)$ are not independent parameters. Figure 13 represents a plot of $\ln(b_k)$ vs α_k for 500 different realizations ($k=1$ to 500): $\ln(b_k)$ and α_k appear strongly correlated through a linear relationship. The slope $s = d[\ln(b_k)]/d\alpha_k$ is found to be equal to 9.8 for the choice of drawing probability $p=0.1$. Other numerical tests (not shown here), indicate that this slope s is almost independent of the choice of p in a wide range: $0.01 < p < 0.8$. We will use $s=10 \pm 0.5$ to compare this result with experiments in the next section.

VI. DISCUSSION

We have noticed in Sec. III that, for a given set of cells belonging to the same cell type and submitted to the same experimental protocol, the measured exponents α and prefactors G_0 at $f=1$ Hz, respectively, follow a normal and a log-normal distribution (Figs. 5 and 7–9). In the model presented in Sec. V, the variability from one cell to another is simulated by the choice of a particular distribution P_k of response times τ_i , randomly selected among a general power law distribution P_0 . We have already pointed out that this model also leads to normal and log-normal distributions for the exponents α_k and prefactors b_k determining the creep function $J_k(t)$. Introducing a dimensionless time $\theta = t/\tau_m$ normalized by the largest time relaxation τ_m of the cell, we have shown that $dJ_k/dt = \dot{J}_k(\theta) = b_k \theta^{\alpha_k - 1}$, and consequently $J_k(\theta) = (b_k/\alpha_k) \theta^{\alpha_k}$. Using Eq. (A6), we predicted the relationship between the exponent α_k and the viscoelastic modulus at $\omega/2\pi=1$ Hz:

$$G_{0k} = |\sigma_e(\omega=2\pi)| = \frac{\alpha_k \tau_m^{\alpha_k - 1} (2\pi)^{\alpha_k} 1}{\Gamma(1 + \alpha_k) b_k}. \quad (8)$$

As far as the exponents α_k remain close to the averaged value α , a log-normal distribution for b_k corresponds to a log-normal distribution for $G_{0k} \propto 1/b_k$. This demonstrates that so far the model predictions are consistent with experimental data.

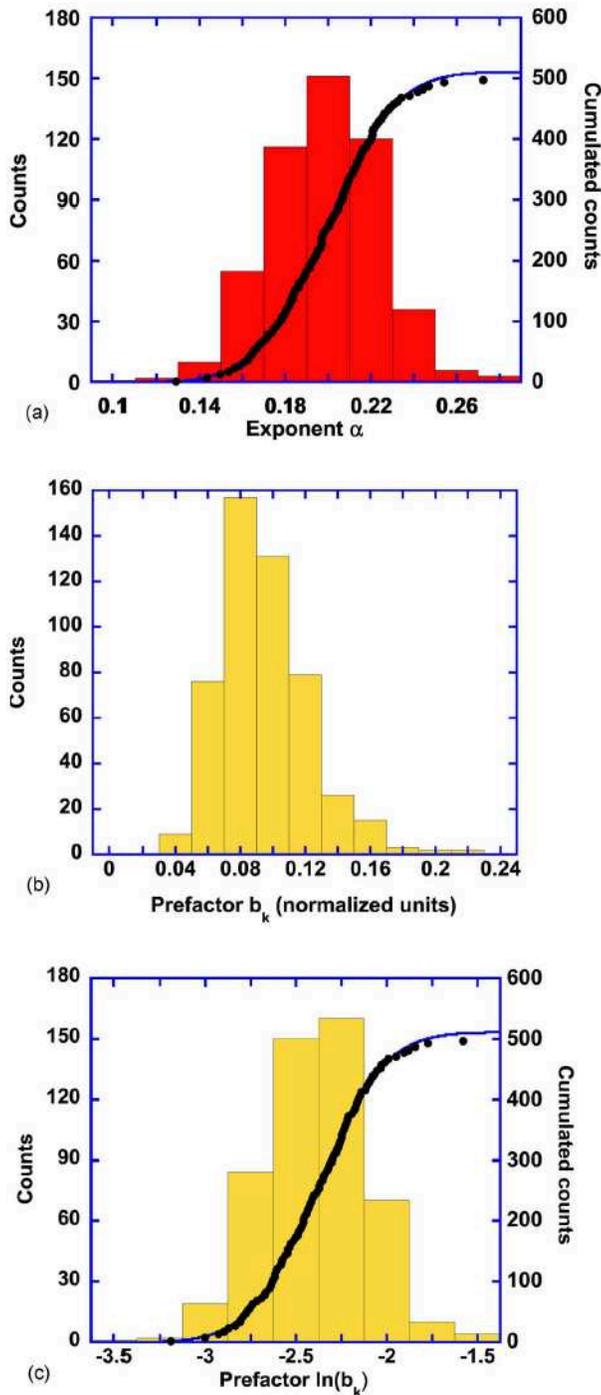


FIG. 12. (Color online) Histograms of the distributions of the exponents α_k (a), of the prefactors b_k (b), and of their logarithms $\ln(b_k)$ (c). These quantities are measured from the numerically calculated curves $dJ_0/d\theta$ for 500 different realizations of P_k distribution. While the distribution of exponents α_k is symmetrical, the distribution of prefactors b_k is clearly asymmetric. The cumulated distributions and their best fits by erf functions are also represented [(a) and (c)]. They show that, according to this model, α_k and b_k are, respectively, normally and log-normally distributed.

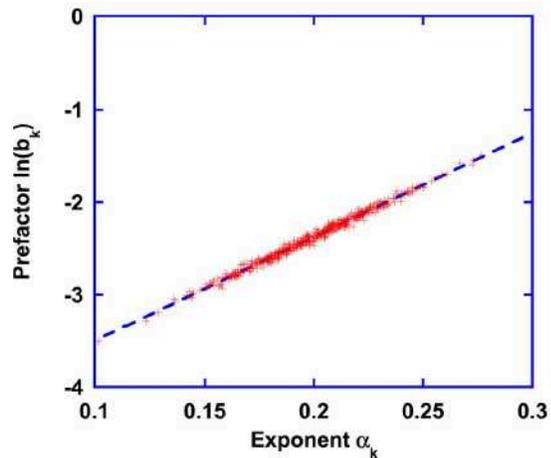


FIG. 13. (Color online) Plot of the prefactors $\ln(b_k)$ vs exponents α_k for 500 different realizations of P_k distribution. As can be seen, the model predicts a strong linear correlation between these two quantities.

To step further into the comparison between the model and the data, it is noteworthy to focus on the correlations between exponents α_k and prefactors G_{0k} . Figure 14 gathers the experimental data of $\ln(G_0)$ vs α for all the C2 cells, as determined either in optical tweezers or uniaxial stretching experiments. Despite a noticeable dispersion of the results, $\ln(G_0)$ appears to be an increasing function of the exponent α . This is consistent with the model presented in Sec. V, which predicts a correlation between $\ln(b_k)$ and α_k . Imposing a linear relationship between $\ln(G_0)$ and α in Fig. 14, one measures a slope $s' = d[\ln(G_{0k})]/d\alpha_k = 5.2$. A quantitative comparison with the model is then possible, since s and s' are related through:

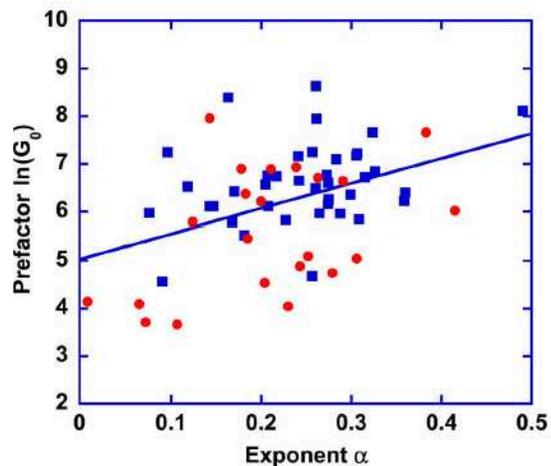


FIG. 14. (Color online) Plot of the experimental values of the prefactors $\ln(G_0)$ vs exponents α , measured for C2 myoblasts. The data from optical tweezers experiments (disks) and stretching rheometer experiments (squares) are plotted together. Despite the dispersion of the results, $\ln(G_0)$ appears to be an increasing function of the exponent α . This is consistent with the prediction of the model.

$$s' = \frac{d[\ln(G_{0k})]}{d\alpha_k} \Big|_{\alpha_k=\langle\alpha\rangle} = -s + \ln(\tau_m) + \ln(2\pi) + \frac{1}{\langle\alpha\rangle} - \psi(\alpha+1), \quad (9)$$

where $\psi(\alpha) = d[\ln(\Gamma(\alpha))] / d\alpha$ is the digamma function [51]. It is possible to make the measured value $s' = 5.2$ consistent with the predicted value $s = 10$ by adjusting the only unknown parameter in our model τ_m , which represents the longest relaxation time in the cell. This adjustment leads to $\tau_m \sim 3200$ s for the C2 cell type. Since $\theta = t / \tau_m$, the reduced time range $10^{-6} < \theta < 10^{-2}$ then corresponds to a real time range $0.003 < t < 30$ s, which exactly matches the experimental range of our measurements. This reinforces the validity of our approach.

The same analysis, performed on our data on alveolar epithelial cells A549, also showed a correlation between the measured exponents α_k and prefactors G_{0k} (data not shown). From the slope $s' = d[\ln(G_{0k})] / d\alpha_k = 2.8$ we infer that the highest response time is $\tau_m \sim 300$ s for this type of cells. Other experiments [23] also depicted a linear relationship between the viscoelastic modulus G_1 (measured at 1 kHz) and the exponent α for HASM cells. In their case, the slope $s'' = d[\ln(G_{1k})] / d\alpha_k \sim 12$, measured at 1 kHz (Fig. 10 in [23]), yields a typical time $\tau_m \sim 3200$ s.

It is remarkable that these estimates of the longest time response in different cell types, derived from different experiments, are roughly consistent with each other and lie in the range 5 min to 1 h. Moreover, we emphasize that their common order of magnitude is quite reasonable, as far as it effectively corresponds to a typical relaxation time at the scale of the whole cell. Indeed, an independent rough evaluation of τ_m may be obtained by dividing a typical value of the cytoplasm viscosity at long time scale (~ 10 kPa s) [3,9] by a typical Young modulus ($\sim 10^2$ Pa) measured at the cell scale in quasistatic experiments. Beyond this time range, some macroscopic remodeling processes (treadmilling, signalization cascades) are known to take place and to interfere with the cell mechanical properties.

VII. SUMMARY AND CONCLUSIONS

This study makes a parallel analysis of the results obtained by two different microrheological experiments on single living cells, and compares them with other data gathered from various works in the literature. It allows to bring out some striking common features in the mechanical properties of the cytoskeleton network.

The mechanical response function presents a quasiuniversal power law behavior, whatever the experimental technique and the cellular type: the viscoelastic complex modulus of the cell is a power law function of the exciting mechanical frequency f . Correlatively the creep function of the intracellular medium is a power law of elapsed time, with the same exponent α . The value of this exponent $\alpha \approx 0.2$ is remarkably homogeneous throughout the large panel of studied cell types, whatever the experimental techniques and conditions. It does not seem to either depend on the probe size, nor on

the typical length scale on which the experiment is performed. This clearly demonstrates that there is no characteristic dissipation time in the cellular response, or more precisely that these relaxation times are broadly distributed over a wide time interval, extending at least from 0.01 s to 100 s. This is a characteristic of structural damping, where the mechanisms responsible for the storage of elastic energy and its dissipation are strongly correlated.

Moreover, the prefactor of the response function, which represents the value of the elastic modulus at a given reference frequency, varies by almost two orders of magnitude, according to the cellular type and to the experimental conditions. Interestingly, for a set of cells of a given type, probed in the same experiment, the prefactor distribution found is log-normal. The possible influence of several physical or biological parameters on the average value of this prefactor is discussed: temperature, probe size, nature of the mechanical receptor, and cell inhomogeneities. Further studies should concentrate on systematic comparisons between different cell types, probed in identical experimental conditions: this is the only way to—perhaps—associate a given cell function with a characteristic viscoelastic behavior.

The semiphenomenological model presented here is able to accurately predict the mechanical response of a living cell submitted to a controlled stress, in a wide range of time scales. The mechanical behavior of the cell is modelled by associating a large number of elementary Kelvin-Voigt units, which account for the different scales of the cytoskeletal network. Assuming a self-similar structure of the network and a power law distribution of time constants, one recovers all the features of the macroscopic behavior observed on different cell types. This approach quantitatively accounts for the power law responses measured in different rheological experiments, and also for the normal and log-normal distributions retrieved for the exponents and prefactors. The largest relaxation time in the cell, which is the only adjustable parameter of the model, is consistent with other independent estimates. A further step will consist in interpreting the dissipative elements in term of elementary biological mechanisms, such as molecular motors activity and crosslinkers dynamics, which play a crucial role in the cytoskeleton remodeling.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mireille Lambert for kindly providing C2 cells and cadherin protocols. This work was partly supported by grants from Université Paris 7 (Bonus Qualité Recherche), from the French Ministère de la Recherche (ACI jeune chercheur), from the French Centre National de la Recherche Scientifique (programme Physique et Chimie du Vivant), and from the Association pour la Recherche sur le Cancer (subvention libre No. 3115).

APPENDIX A: RELATION BETWEEN THE CREEP FUNCTION $J(t)$ AND THE COMPLEX MODULUS $G_c(\omega)$

When submitting a given material to a varying stress $\sigma(t)$, the induced strain $\varepsilon(t)$ is related to $\sigma(t)$, in the linear regime, by

$$\varepsilon(t) = J(t)\sigma(0) + \int_0^t J(t-t')\dot{\sigma}(t')dt', \quad (\text{A1})$$

where $J(t)$ is the creep function (i.e., the strain generated by a step stress, normalized by the constant stress value). Defining the Laplace transform by $L_T[f(t)] = \tilde{f}(s) = \int_0^{+\infty} e^{-st}f(t)dt$, Eq. (A1) leads¹

$$\tilde{\varepsilon}(s) = s\tilde{J}(s)\tilde{\sigma}(s). \quad (\text{A2})$$

On the other hand, in response to an oscillating stress $\sigma = \sigma(\omega)\exp(j\omega t)$, the induced strain can be written $\varepsilon = \varepsilon(\omega)\exp(j\omega t)$, which allows to define a viscoelastic complex modulus $G_e(\omega)$ as $G_e(\omega) = \sigma(\omega)/\varepsilon(\omega)$. In the limit $\omega \rightarrow 0$, $G_e(\omega)$ reduces to the Young modulus E of the material.

Since the Fourier transform $F_T[f(t)] = \hat{f}(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} e^{-j\omega t}f(t)dt$ is related to the Laplace transform by $\hat{f}(\omega) = \tilde{f}(j\omega)$, one can rewrite Eq. (A2) as $\hat{\varepsilon}(\omega) = j\omega\hat{J}(\omega)\hat{\sigma}(\omega)$. Consequently, a general relation exists between the viscoelastic modulus $G_e(\omega)$ and the creep function J :

$$G_e(\omega) = \frac{1}{j\omega\hat{J}(j\omega)} = \frac{1}{j\omega\hat{J}(\omega)}. \quad (\text{A3})$$

Now we restrict ourself to the particular case where $J(t)$ behaves as a power law of time: $J(t) = A_0(t/t_0)^\alpha$. Here t_0 is an arbitrary reference time, chosen for convenience equal to 1 s. The Laplace transform of $J(t)$ is equal to

$$\tilde{J}(s) = \frac{A_0\Gamma(1+\alpha)}{s(st_0)^\alpha}, \quad (\text{A4})$$

where $\Gamma(1+\alpha) = \int_0^{+\infty} e^{-x}x^\alpha dx$ is the Γ Euler function. In this case the corresponding viscoelastic complex modulus takes the form

$$G_e(\omega) = |G_e|e^{j\delta} = \frac{(j\omega t_0)^\alpha}{A_0\Gamma(1+\alpha)}, \quad (\text{A5})$$

with a complex norm

$$|G_e| = \frac{\omega^\alpha t_0^\alpha}{A_0\Gamma(1+\alpha)} \quad (\text{A6})$$

and a phase

$$\delta = \frac{\alpha\pi}{2}, \quad (\text{A7})$$

which is independent of the frequency ω .

APPENDIX B: FORCE-DISPLACEMENT RELATIONSHIP FOR A BEAD PARTIALLY IMMERSSED IN AN ELASTIC MEDIUM

We recall here the main results of the analytic calculation of the displacement of a rigid spherical bead, immersed in a

¹According to the usual definition of the compliance J^* , one has $J^*(s) = s\tilde{J}(s)$.

semi-infinite homogeneous medium, and submitted to a force \vec{F} tangential to the medium boundary (see Fig. 3) [12]. We assume that the medium is incompressible, so that the static Young modulus E and the shear modulus μ are related by $E = 3\mu$.

(i) *Bead immersed in an infinite medium.* In the simple case of an infinite incompressible medium, the displacement x of the center of the bead submitted to a force F is given by [52,53]

$$F = 2\pi REx = 6\pi R\mu x, \quad (\text{B1})$$

where R represents the bead radius.

(ii) *Bead in contact by a small area with a semi-infinite medium.* This case corresponds to a bead weakly immersed in the medium, i.e., where the half-angle Θ of the immersion cone is small. We have shown [12] that in this limit the displacement x of the bead center results of the combination of a translation of the bead and a rotation around the region of contact, and that F and x are related through

$$F = 2\pi REf(\Theta)x, \quad (\text{B2})$$

where $f(\Theta)$ is a purely geometrical factor approximately given by

$$f(\Theta) = 1/\left(\frac{9}{4\sin\Theta} + \frac{3\cos\Theta}{2\sin^3\Theta}\right). \quad (\text{B3})$$

In the denominator, the first term stands for the contribution of the bead translation, the second one for its rotation. This analytic expression is consistent with other numerical studies describing the pure rotation of a magnetic bead submitted to a torque [31,54]. In particular, all the works agree on the fact that the bead rotation is proportional to $\sin^3\Theta$. Only the numerical prefactor differs by approximatively a factor of 2 between the analytical and numerical approaches. We have shown in [12] that Eq. (B3) can be extrapolated to the full range of angle Θ accessible to experiment, typically $20^\circ < \Theta < 70^\circ$. As a consequence, we use this equation to interpret our data in the main course of this paper.

Equations (B1)–(B3) describe the force-displacement relationship in the static case where F (and x) are kept constant with time. When the bead is submitted to an oscillatory force $F = \hat{F}(\omega)\exp(j\omega t)$, they can be generalized to define the viscoelastic complex modulus G_e as

$$\hat{F}(\omega) = 2\pi RG_e(\omega)\hat{x}(\omega) \quad (\text{B4})$$

for the case of a bead totally immersed in the medium, and

$$\hat{F}(\omega) = 2\pi RG_e(\omega)f(\Theta)\hat{x}(\omega) \quad (\text{B5})$$

for the case of partial immersion. Here we assume that $f(\Theta)$ keeps the same expression as in Eq. (B3). In this definition, G_e reduces to the Young modulus E as the frequency goes to zero. Notice that this convention is different from the one proposed by other authors [31] who define a viscoelastic

modulus $G_s = G_e/3$ from the shear modulus μ . For instance, in the case of magnetic beads, the bead rotation Φ is related to the applied specific torque T_s (torque per unit volume) by

$$T_s = 6\beta G_s \Phi, \quad (\text{B6})$$

where β is a numerically computed geometrical factor. In the limit of a weakly immersed bead, Eq. (B6) takes a form equivalent to Eq. (B5),

$$F = 8\pi R G_s \beta x. \quad (\text{B7})$$

-
- [1] P. A. Janmey, *Physiol. Rev.* **78**, 763 (1998).
- [2] M. Sato, D. P. Theret, L. Wheeler, N. Ohshima, and R. M. Nerem, *J. Biomed. Eng.* **112**, 263 (1990).
- [3] N. O. Petersen, W. B. McConnaughey, and E. L. Elson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 5327 (1982).
- [4] C. F. Dewey, Jr., S. R. Bussolari, M. A. Gimbrone, Jr., and P. F. Davies, *J. Biomed. Eng.* **103**, 177 (1981).
- [5] K. A. Barbee, P. F. Davies, and R. Lal, *Circ. Res.* **74**, 163 (1994).
- [6] C. Rotsch, F. Braet, E. Wisse, and M. Radmacher, *Cell Biol. Int.* **21**, 685 (1997).
- [7] M. Sato, K. Nagayama, N. Kataoka, M. Sasaki, and K. Hane, *J. Biomech.* **33**, 127 (2000).
- [8] J. Alcaraz, L. Buscemi, M. Grabulosa, X. Trepas, B. Fabry, R. Farré, and D. Navajas, *Biophys. J.* **84**, 2071 (2003).
- [9] O. Thoumine and A. Ott, *J. Cell. Sci.* **110**, 2109 (1997).
- [10] N. Caille, O. Thoumine, Y. Tardy, and J.-J. Meister, *J. Biomech.* **35**, 177 (2002).
- [11] N. Desprat, A. Richert, J. Simeon, and A. Asnacios, *Biophys. J.* **88**, 2224 (2005).
- [12] V. Laurent, S. Hénon, E. Planus, R. Fodil, M. Balland, D. Isabey, and F. Gallet, *J. Biomech. Eng.* **124**, 408 (2002).
- [13] M. Balland, A. Richert, and F. Gallet, *Eur. Biophys. J.* **34**, 255 (2005).
- [14] M. Yanai, J. P. Butler, T. Suzuki, H. Sasaki, and H. Higushi, *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.* **287**, C603 (2004).
- [15] J. Guck, R. Ananthakrishnan, H. Mahmood, T. J. Moon, C. C. Cunningham, and J. Käs, *Biophys. J.* **81**, 767 (2001).
- [16] F. Wottawah, S. Schinkinger, B. Lincoln, R. Ananthakrishnan, M. Romeyke, J. Guck, and J. Käs, *Phys. Rev. Lett.* **94**, 098103 (2005).
- [17] A. R. Bausch, W. Möller, and E. Sackmann, *Biophys. J.* **76**, 573 (1999).
- [18] C. Wilhelm, F. Gazeau, and J.-C. Bacri, *Phys. Rev. E* **67**, 061908 (2003).
- [19] B. Fabry, G. N. Maksym, J. P. Butler, M. Glogauer, D. Navajas, and J. J. Fredberg, *Phys. Rev. Lett.* **87**, 148102 (2001).
- [20] S. Yamada, D. Wirtz, and S. C. Kuo, *Biophys. J.* **78**, 1736 (2000).
- [21] Y. Tseng, T. P. Kole, and D. Wirtz, *Biophys. J.* **83**, 3162 (2002).
- [22] A. W. C. Lau, B. D. Hoffmann, A. Davies, J. C. Crocker, and T. C. Lubensky, *Phys. Rev. Lett.* **91**, 198101 (2003).
- [23] B. Fabry, G. N. Maksym, J. P. Butler, M. Glogauer, D. Navajas, N. A. Taback, E. J. Millet, and J. J. Fredberg, *Phys. Rev. E* **68**, 041914 (2003).
- [24] G. Lenormand, E. Millet, B. Fabry, J. P. Butler, and J. J. Fredberg, *J. R. Soc., Interface* **1**, 91 (2004).
- [25] S. Féréol, R. Fodil, B. Labat, S. Galiacy, V. M. Laurent, B. Louis, D. Isabey, and E. Planus, *Cell Motil. Cytoskeleton* **63**, 321 (2006).
- [26] J. Gavard, M. Lambert, I. Grosheva, V. Marthiens, T. Irinopolou, J. F. Riou, A. Bershadsky, and R. M. Mege, *J. Cell. Sci.* **117**, 257 (2003).
- [27] M. Lambert, F. Padilla, and R. M. Mege, *J. Cell. Sci.* **113**, 2207 (2000).
- [28] N. Desprat, A. Guirouy, and A. Asnacios, *Rev. Sci. Instrum.* **77**, 055111 (2006).
- [29] G. Lenormand, S. Hénon, A. Richert, J. Siméon, and F. Gallet, *Biophys. J.* **81**, 43 (2001).
- [30] S. D. Marlin and T. A. Springer, *Cell* **51**, 813 (1987).
- [31] S. M. Mijailovitch, M. Kojic, M. Zivkovic, B. Fabry, and J. J. Fredberg, *J. Appl. Physiol.* **93**, 1429 (2002).
- [32] X. Trepas, M. Grabulosa, L. Buscemi, F. Rico, R. Farré, and D. Navajas, *J. Appl. Physiol.* **98**, 1567 (2005).
- [33] M. Puig-de-Morales, M. Grabulosa, J. Alcaraz, J. Mullol, G. N. Maksym, J. J. Fredberg, and D. Navajas, *J. Appl. Physiol.* **91**, 1152 (2001).
- [34] M. Puig-de-Morales, E. J. Millet, B. Fabry, D. Navajas, N. Wang, J. P. Butler, and J. J. Fredberg, *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.* **287**, C643 (2004).
- [35] B. Fabry, G. N. Maksym, R. Hubmayr, D. Butler, and J. J. Fredberg, *J. Magn. Magn. Mater.* **194**, 120 (1999).
- [36] T. P. Kole, Y. Tseng, I. Jiang, J. L. Katz, and D. Wirtz, *Mol. Biol. Cell* **16**, 328 (2005).
- [37] G. N. Maksym, B. Fabry, J. P. Butler, D. Navajas, D. J. Tschamberlin, J. D. Laporte, and J. J. Fredberg, *J. Appl. Physiol.* **89**, 1619 (2000).
- [38] C.-M. Lo and J. Ferrier, *Eur. Biophys. J.* **28**, 112 (1999).
- [39] D. Choquet, D. P. Felsenfeld, and M. P. Sheetz, *Cell* **88**, 39 (1997).
- [40] M. Glogauer, P. Arora, G. Yao, I. Sokholov, J. Ferrier, and C. A. G. McCulloch, *J. Cell. Sci.* **110**, 11 (1997).
- [41] D. Riveline, E. Eli Zamir, N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Naumiyu, Z. Kam, B. Geiger, and A. D. Bershadsky, *J. Cell Biol.* **153**, 1175 (2001).
- [42] H. Delanoë-Ayari, R. Al Kurdi, M. Vallade, D. Gulino-Debrac, and D. Riveline, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 2229 (2004).
- [43] P. Bursac, G. Lenormand, B. Fabry, M. Oliver, D. A. Weitz, V. Viasnoff, J. P. Butler, and J. J. Fredberg, *Nat. Mater.* **4**, 557 (2005).
- [44] A. Ponton, S. Warlus, and P. Griesmar, *J. Colloid Interface Sci.* **249**, 209 (2002).
- [45] E. R. Weeks, J. C. Crocker, A. C. Levitt, A. Schofield, and D. A. Weitz, *Science* **287**, 627 (2000).

- [46] D. Bonn, P. Coussot, H. T. Huynh, F. Bertrand, and G. Debrégeas, *Europhys. Lett.* **59**, 786 (2002).
- [47] J. P. Bouchaud, *J. Phys. I* **2**, 1705 (1992).
- [48] P. Sollich, *Phys. Rev. E* **58**, 738 (1998).
- [49] K. Kruse, J. F. Joanny, F. Jülicher, J. Prost, and K. Sekimoto, *Phys. Rev. Lett.* **92**, 078101 (2004).
- [50] A. Oustaloup, *La Dérivation Non Entière* (Hermès, Paris, 1995).
- [51] I. S. Gradshteyn and I. M. Ryzhik, *Table of Integrals, Series and Products* (Academic Press, New York, 1980), Chap. 8.36, p. 943.
- [52] F. Ziemann, J. Rädler, and E. Sackmann, *Biophys. J.* **66**, 2210 (1994).
- [53] L. Landau and E. Lifchitz, *Theory of Elasticity* (Pergamon Press, London, 1959).
- [54] J. Ohayon, Ph. Tracqui, R. Fodil, S. Féréol, V. M. Laurent, E. Planus, and D. Isabey, *J. Biomed. Eng.* **126**, 685 (2004).
- [55] N. W. Tschoegel, *The Phenomenological Theory of Linear Viscoelastic Behavior* (Springer-Verlag, Berlin, 1989).

Cell stiffening in response to external stress is correlated to actin recruitment

Delphine Icard–Arcizet, Olivier Cardoso, Alain Richert and Sylvie Hénon ¹

*Laboratoire Matière et Systèmes Complexes,
Université Paris Diderot - Paris 7 and CNRS,
Bâtiment Condorcet, Case 7056, 75205 Paris Cedex 13, France*

¹Corresponding author. Address: Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, Université Paris Diderot – Paris 7 and CNRS, Bâtiment Condorcet, Case 7056, 75205 Paris Cedex 13, France, Tel.: (+33).1.57.27.62.15, Fax: (+33).1.57.27.62.11, E-mail: sylvie.henon@univ-paris-diderot.fr

Abstract

We designed a micromanipulation device that allows the local application of a constant force on living cells, and the measurement of their stiffness. The force is applied through a RGD-coated bead adhering on the cell and trapped in optical tweezers controlled by a feedback loop. Epifluorescence observations of GFP-actin in the cells are made during force application. We observe a stiffening of cells submitted to a constant force within a few minutes, coupled to actin recruitment both at the bead-cell contact and up to several μm from the stress application zone. Moreover, kinetics of stiffening and actin recruitment exhibit a strong correlation. This work presents the first quantification of the dynamics of cell mechanical reinforcement under stress, which is a novel insight into the elucidation of the more general phenomenon of cell adaptation to stress.

Key words: cell mechanics; stiffening; actin recruitment; mechanotransduction; optical tweezers

Abbreviations: RGD, Arg-Gly-Asp peptide sequence; GFP, Green Fluorescent Protein; FA, focal adhesion

Introduction

Adherent cells are highly sensitive to their mechanical environment which they feel through adhesion molecules embedded in the cell membrane. Among these various binding proteins, integrins link the extracellular matrix to the cell actin cytoskeleton *via* a dynamic complex of proteins (1, 2). These clusters, named focal adhesions (FA), are several micrometers in size and act as mechanosensors (3).

Cellular response to the mechanical environment is based on the mechanotransduction that occurs within FA, and implies processes that happen on very different time scales. Long term responses include, for example, adaptation of the traction force to the substrate rigidity (4), spreading (5), motility (6–8), or even control of the cell cycle (differentiation, apoptosis)(9–11). Shorter term responses, on the opposite, involve both physiological and mechanical phenomena: mechanical strengthening (12), growth and modification of the biological composition of the existing contacts (13, 14), assembly of new focal complexes (15) and enhanced contractility of the actin cytoskeleton (16)... Yet the broad cascade of biochemical signalling (17–19) involved in mechanotransduction at the cell membrane has not been totally elucidated.

Cells mechanical integrity is crucial for these adhesion-dependent mechanisms. Hence viscoelastic behaviors of the cells have been widely studied in the aim of establishing a link between their mechanical properties and the biological state of their cytoskeleton (20–23). It lead to identifying actin filaments, and the acto-myosin contractility in particular, as major components of the cells viscoelastic response (24, 25) and of their adaptation to stress (4, 26).

We set out to focus on the process of cell stiffening under stress, that has already been reported previously. It has been shown, for instance, that focal contacts are strengthened by the application of an external force (12) and grow in the direction of the applied force (18). The application of a fluid shear stress on adherent cells causes a dramatic increase in their viscosity, and the actomyosin contractility has been shown to be involved in this process (27). By applying a local force, it has also been shown that cell rigidity increases (28) and actin remodels in the vicinity of the applied force (29, 30).

In order to investigate the link between these phenomena and to quantify their dynamics, we designed a method that allows us to both locally apply a constant force, and make epifluorescence observations. Force application is performed *via* an optically trapped silica microbead, which position is measured on a quadrant photodiode detector (see Fig. S1). A feedback loop (31) is implemented to keep the force on the bead constant. We measure the local creep function and retrieve the cell viscoelastic parameters. We apply a temporal series of step forces so as to have access to the evolution of cell stiffness, and we compare it to the reorganisation of GFP-actin in the cell. We show that the rigidity and the quantity of actin in the vicinity of the force application zone both increase, and that the kinetics of these two phenomena are very well correlated. We propose a typical time scale for actin recruitment and cell stiffening.

Materials and methods

Cells preparation

Both A549 human alveolar epithelial cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) and C2C12 mice myoblastic cells (kindly provided by M. Lambert, Institut du Fer à Moulin, Paris, France) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 2mM glutamine, 100 U/mL penicillin and 50mg/mL streptomycin (Invitrogen). 24 hours prior to manipulation, cells were detached from culture flasks with a trypsin-EDTA solution and plated on a glass coverslip coated with 5 μ g/mL fibronectin (Sigma).

For epifluorescence observations, GFP-actin plasmid transfection was performed with nanofectin (PAA), according to the manufacturer's procedure, about 15 hours before experiment. The plasmid was kindly provided by M. Coppey, Institut Jacques Monod, Paris, France.

Beads coating

Carboxylated silica beads (3.47 μm diameter, Bangs Laboratories Inc., IN, USA) were coated with a polypeptide containing the RGD (Arg-Gly-Asp) sequence (PepTide 2000, Telios Pharmaceuticals, CA, USA), according to the manufacturer's procedure. It ensured a specific binding to integrin receptors. Beads were then incubated on cells at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 15 minutes before manipulation (1 to 3 beads per cell).

Force application

Our optical tweezers setup, represented on Fig. S1, is based on a 1064 nm Nd:YAG laser, 600 mW intensity (Spectra Physics), which is focused through the objective of an inverted microscope (Leica DM IRB, x100 oil immersion objective, 1.25 NA). Galvanometric mirrors are used to deflect the laser beam, and thus displace the optical trap in the XY plane. The position of the bead in the XY plane, \mathbf{r}_{bead} , is measured on a quadrant photodiode (S1557, Hamamatsu) with a resolution of 50 nm. Its electrical signal is amplified as described in (31), yielding the analogical value $V_{\text{diode}} = (V_X, V_Y) = (A X_{\text{bead}}, A' Y_{\text{bead}})$. The proportional coefficients A and A' are calibrated before each experiment. The experimental chamber is mounted on an XYZ piezoelectric nanopositioning device (NanoCube[®], Physik Intrumente, Germany), fixed to the microscope stage in order to allow precise movements of the experimental chamber in 3 dimensions.

Trap force calibration, performed before any experiment, gives F_{trap} as a nearly linear function of the distance δr between the center of the bead and the center of the trap: $\|\delta \mathbf{r}\| = \|\mathbf{r}_{\text{bead}} - \mathbf{r}_0\|$. To apply a constant force on the bead, in modulus and direction, $\delta \mathbf{r}(t)$ is kept constant by moving the piezoelectric stage on which the chamber is mounted. This is achieved numerically by a feedback loop under LabVIEW[®] (National Instruments). The program samples V_{diode} at 180 Hz and commands the piezo stage movement $\mathbf{r}_{\text{piezo}}(t)$ with a 45 Hz bandwidth. Hence we measure the instantaneous displacement of the bead with respect to the cell $\mathbf{r}(t) = -\mathbf{r}_{\text{piezo}}(t)$ in response to a constant force \mathbf{F}_0 .

Measurement of the creep function

When a constant stress is applied to a material ($\sigma = 0$ when $t < 0$, $\sigma = \sigma_0$ when $t \geq 0$), the creep function is defined as:

$$J(t) = \epsilon(t)/\sigma_0 \quad (1)$$

where $\epsilon(t)$ is the induced strain. Here we apply a constant force step F_0 and measure the bead displacement $r(t)$. The relationships between resp. force and stress, and displacement and strain, in a simple linear elasticity model described previously (32) yields:

$$J(t) = \frac{2\pi R f(\theta) r(t)}{F_0} \quad (2)$$

where R is the bead radius (1.735 μm) and θ is half the angle of the immersion cone of the bead into the cell. θ is roughly estimated for each cell on transmission images. The geometrical factor $f(\theta)$ is given by:

$$\frac{1}{f(\theta)} = \frac{9}{4 \sin \theta} + \frac{3 \cos \theta}{2 \sin^3 \theta}. \quad (3)$$

Fluorescence detection

To follow the evolution of actin density around the bead, we visualize GFP-tagged actin in the cell using the same objective as for trapping. Before experiment, and after each step force application and measurement of the creep function, at time t_k ($k = 1 \dots N$) a stack of epifluorescence images along the z axis is captured with a CCD camera (Coolsnap ES, Roper Scientific Inc.) using an ImageJ plugin. The images are then processed using another ImageJ procedure: for each time t_k we define a set of 4 planes along the z axis (located around the plane of force application, and separated by approximately 1 μm) over which we average the fluorescence intensity. In this averaged image, we choose different regions of interest (ROI): ROI_{bleach} , and ROI_i , $i = 1$ to 9.

ROI_{bleach} is a control region, taken in the cell far enough from the bead center (about 6 to 8 μm) not to be modified by the local force application. The average intensity in this zone, I_{bleach} , is used as a reference to check the degree of bleaching during the course of the experiment. ROI_i are disks of radii $R_1 = 2.25$ to $R_9 = 6.25$ μm ($R_{i+1} - R_i = 0.5\mu\text{m}$) centered on the bead.

ROI_2 , which is about twice the area of the bead itself, is named ROI_{bead} , and contains the information about short-range actin recruitment around the bead. In this region, bright patches of actin appear at the bead-cell contact during the experiments (see Fig. 3). To evaluate the quantity of actin they contain, we identify and label the patches by indices p using an image treatment that is similar to the one described in (33). We calculate the area A_p and average intensity $\langle I_p \rangle$ of each patch p and the quantity of actin recruited at the bead-cell contact at time t_k is eventually estimated as:

$$Q = \frac{1}{I_{\text{bleach}}} \sum_p A_p \cdot \langle I_p \rangle \quad . \quad (4)$$

These patches are fitted by ellipses, from which we retrieve the major and minor axes and the orientation angle (see Fig. 4). We also evaluate the actin present in the network around the bead, by the average fluorescence intensity in ROI_{bead} , still taking into account the bleaching factor:

$$Q' = \frac{I_{\text{bead}}}{I_{\text{bleach}}} \quad . \quad (5)$$

We perform the same measurements, Q'_i , in the disks ROI_i . Then, we calculate the average intensity in successive rings around the bead, of radii $\delta R_i = (R_{i+1} + R_i)/2$, by retrieving the differential quantities $\delta Q'_i$:

$$\delta Q'_i = \frac{\pi R_{i+1}^2 Q'_{i+1} - \pi R_i^2 Q'_i}{\pi(R_{i+1}^2 - R_i^2)} \quad . \quad (6)$$

The values of Q'_i and Q are related to actin quantities but are not directly proportional to them. This is why they are only used relatively to the values measured at different times t_k within a given experiment.

Results and discussion

Creep functions and cell viscoelastic parameters

We performed measurements on several cells of two different cell lines: A549 human alveolar epithelial cells and C2C12 mice myoblastic cells. By applying a constant stress on a cell through a RGD-coated bead, and measuring the resulting strain, we retrieved the local creep function (see *Material and Methods*). Fig. 1.A shows a typical example of creep function measured on a C2C12 cell. It is well fitted by a power law over more than two time decades: $J(t) = A(t/t_0)^\alpha$, with $\alpha = 0.181$ and $A = 5.88 \cdot 10^{-3} \text{ Pa}^{-1}$ on this particular example (t_0 is a reference time, chosen here equal to 1 s). This weak power law, with an exponent of 0.1 to 0.5 is characteristic of the rheology of cells and more generally of materials having a large number of relaxation times distributed over a broad time scale (20, 22, 23, 34).

In order to interpret our results in terms of cell rigidity, and to compare them with previous measurements, we retrieve the equivalent viscoelastic modulus at 1 Hz, G_0 . For a creep function that is a power law, G_0 is calculated from A and α using the relation:

$$G_0 = \frac{(2\pi)^\alpha}{A \Gamma(1 + \alpha)} \quad (7)$$

which has been demonstrated previously (23) (Γ is the Euler Gamma function). For example, the creep measurement displayed on Fig. 1.A yields $G_0 = 257 \text{ Pa}$.

Statistical repartitions show a gaussian (or normal) distribution for the power law exponent α , and a log-normal distribution for the prefactor G_0 , as evidenced on Fig. 2. The mean values and widths of

the distributions are obtained by fitting the cumulative probabilities of both α and $\log(G_0)$ by error functions:

$$E(x) = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \operatorname{erf} \left(\frac{x - \langle x \rangle}{\sigma \sqrt{2}} \right) = \frac{1}{2} + \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} \int_0^x \exp \left(-\frac{(u - \langle u \rangle)^2}{2\sigma^2} \right) du \quad . \quad (8)$$

The average values and distribution widths measured for the power law exponent α , and the median value of the viscoelastic modulus G_0 are $\langle \alpha \rangle = 0.300$, $\sigma_\alpha = 0.100$ and $G_{0,\text{med}} = 305$ Pa on A549 cells and $\langle \alpha \rangle = 0.316$, $\sigma_\alpha = 0.089$ and $G_{0,\text{med}} = 285$ Pa on C2C12 cells. The mechanical parameters obtained for all the tested cells are summarized in Table 1. These results are consistent with previous measurements on cells probed locally or globally, for harmonic or quasistatic forcings (see data reported in (20–24, 34)). Our data corroborate a large set of mechanical measurements performed on different cell types, which leads us to assert that our estimate of the viscoelastic modulus G_0 is a reliable measurement of the local cell stiffness.

Rigidity evolution on long time scales

In order to investigate the dynamics of mechanical response under external stress, we followed the evolution of cell rigidity during force application. The magnitude of the applied force was set between 40 and 180 pN. We applied a series of 150 s step forces and measured the creep function during each step. Each step force was followed by an equal time lapse left for mechanical relaxation of the cell. The main reason for applying a series of force steps rather than a continuous force was to keep the cell deformation small, in order to remain within the linear regime for strain.

A typical series of measurements performed on a single A549 cell is shown in Fig. 1.B. The creep function clearly decreases with the step force application number, meaning that the cell deforms less and less as a force is exerted on it. The cell still exhibits a power law rheology in the time range of 0.1 to 10 – 20 s, with an exponent α that almost remains the same, but a prefactor A that gets smaller. Hence the modulus G_0 , which gives the value of the local cell rigidity, increases. We can quantify the stiffening dynamics by plotting the variations of G_0 *vs* time (see Fig. 1.C). For approximately two thirds of the cells tested, we observed such an increase in the cell rigidity in response to force application. All the stiffening curves exhibit a sigmoid-like behavior, even if the saturation in the value of G_0 is not always reached. In order to restrain to a small number of fitting parameters and get results that can easily be displayed as a whole, we use a dimensionless viscoelastic modulus $g(t)$:

$$g(t) = \frac{G_0(t) - G_{0,\text{min}}}{G_{0,\text{max}} - G_{0,\text{min}}} \quad . \quad (9)$$

$G_{0,\text{min}}$, and $G_{0,\text{max}}$ are respectively the minimum and maximum values measured during the course of the experiment. $g(t)$ can then be fitted by a sigmoid function:

$$g(t) = \frac{g_f}{1 + \left(\frac{g_f}{g_0} - 1 \right) \exp \left(-\frac{t}{\tau_G} \right)} \quad (10)$$

with a set of three fitting parameters: g_f , g_0 and τ_G . τ_G is the stiffening time; g_0 , which is close to zero, takes into account the fact that the first measured value $G_0(t_0)$ is not exactly equal to the modulus of the cell at rest, since we exert a perturbation as soon as we start measuring the cell viscoelasticity. The parameter g_f is approximately equal to 1 if mechanical saturation is reached (that is, if the last measured value $G_0(t_N)$ is the cell maximum response to stress), otherwise $g_f \geq 1$. In Fig. 1.C, for example, $G_{0,\text{min}} = 190$ Pa, $G_{0,\text{max}} = 1355$ Pa, $g_0 = 7.3 \cdot 10^{-7}$, $g_f = 1.08$ and $\tau_G = 90$ s for this A549 cell.

Table 2 summarizes the values obtained for C2C12 cells. Between the first and the last step force application, the value of the viscoelastic modulus G_0 increases by almost one order of magnitude: $G_{0,\text{min}}$ is typically of order 250 Pa while $G_{0,\text{max}}$ is around 900 Pa. Average, minimum and maximum values of the parameter τ_G are also displayed. In these myoblastic cells, the stiffening phenomenon takes place on a time scale of 600 s on average, with some variability from cell to cell. τ_G seems to be greater for C2C12 cells than for A549 cells, but the statistics on A549 cells is too poor to conclude about this point.

Actin recruitment around the bead

Actin is known to be one of the key elements in the regulation of cell rigidity (18, 35, 36). To investigate its role in the phenomenon of stiffening under stress that we observed, we transfected C2C12 cells with a plasmid coding for GFP-actin and followed the actin quantity around the bead. In more than half of the experiments, such as the one shown in Fig. 3, bright actin patches appeared at the bead cell contact. Such patches appeared around beads submitted to a force, while they were never present on other cell-bound beads on which we did not apply any force.

When such actin patches could be detected in an experiment, they appeared after the second or third force step. They started as two or three small elongated dots, about $0.2 \times 0.5 \mu\text{m}^2$ in size, then grew, and eventually merged into an actin ring that surrounded the bead (see Fig. 3.B to G). These observations are consistent with previous observations of actin recruitment within focal adhesions under force application (4, 18). These actin-containing patches, which we observed to develop at the bead-cell contact when a force is applied, are thus probably FA.

In the image analysis procedure (see *Materials and methods*), the shape of each actin patch was fitted by an ellipsis, defined by its major and minor axes and its orientation angle. This allowed us to follow their direction and size during force application (see Fig. 4.A). The ellipses were elongated in a direction close to the direction of force application (see Fig. 4.B): 70 % of their orientations differ by less than 20 degrees from the force direction.

Another important information was the position of these patches around the bead, with regard to the force direction. They appeared preferentially ahead of and behind the bead, which are the regions of highest strain and stress fields (37), both in compression and elongation. This growth of FA in the direction of the applied force is consistent with previous experimental observations (18) and theoretical predictions (38).

A quantification of the actin contained in these contacts is given by the value $Q(t)$. We also measured the global actin density in the network around the bead: it is given by $Q'(t)$, the average fluorescence intensity in a disk about twice the area of the bead. Both calculations are described in *Materials and methods*. Most experiments exhibited an increase in Q' with time, even when actin dots could not be detected. In order to test if this could be attributed to a reinforcement in the actin network around the bead, we measured the average fluorescence intensity $\delta Q'_i$ in rings of increasing radii δR_i around the bead: from $\delta R_1 = 2.5$ to $\delta R_8 = 6.0 \mu\text{m}$ (see *Materials and methods* and Fig. 5). This is an estimate of the intermediate-range actin recruitment within the cell. We observed that the actin quantity in those rings increased during the course of the experiments, and that the increase was substantial even far from the bead. Fig. 5 shows the variation of this actin density with the distance r from the bead center, for different force application times. The observed decrease of $\delta Q'$ with r is fitted by an exponential decay, which yields a cutoff radius of order 3 to 4 μm . The actin network is thus reinforced not only at the bead-cell contact, but also up to a distance of several microns from the force application zone. This length scale is of the same order of magnitude as the characteristic length for stress and strain fields decay (37, 39).

On the positive experiments during which we could observe actin recruitment, we eventually stopped the force application in order to let the cell relax. During this relaxation time, we kept acquiring images, in order to see whether the fluorescence would decrease. Such a decrease, down to the intensity level observed before force application, was observed in more than half of the cases, but not all of them. Due to this variability in the cells relaxation behavior, we cannot conclude on any relaxation time scale.

Control experiments were performed in order to ensure that the actin recruitment was not due to attraction of cell material towards the optical trap. We performed the same temporal series of tweezers application as in the real experiments, but without trapping any bead on the cell. We did not see any increase in the actin quantity around the laser application zone.

Correlation between the rigidity increase and actin recruitment

In order to compare the dynamics of actin recruitment observed in all the experiments, we plotted the evolution of both dimensionless actin quantities, $q(t) = \frac{Q(t) - Q_{\min}}{Q_{\max} - Q_{\min}}$ and $q'(t) = \frac{Q'(t) - Q'_{\min}}{Q'_{\max} - Q'_{\min}}$, that are defined in the same way as $g(t)$.

We fitted these data by sigmoids with a similar set of three parameters as for g : (q_0, q_f, τ_Q) and (q'_0, q'_f, τ'_Q) . Fig. 6 shows the result of an experiment in which both q and q' increase with very similar behaviors. The most interesting parameters of the fit, the time scales, are $\tau_Q = 300$ s and $\tau'_Q = 470$ s in this example. As summarized in table 2, for all the cells tested, we observed typical recruitment times of a few hundreds of seconds. It should be noted that, in spite of cell-to-cell variability, scattering of the time scales τ_G, τ_Q, τ'_Q turns out to be rather small.

We must also take into account the waiting time that is left between two successive force steps, which is approximately equal to the force application duration itself. We can estimate that the force is applied during an effective time t_{eff} which is half the total time t . So that effective time scales for stiffening and actin recruitment can also be roughly estimated as half the mean measured times: $\tau_{G_{\text{eff}}} \simeq \tau_G/2 \simeq 315$ s, $\tau_{Q_{\text{eff}}} \simeq 192$ s, $\tau'_{Q_{\text{eff}}} \simeq 277$ s.

The increase in G_0 appears highly correlated to the actin recruitment around the bead. The bead-cell contact strengthening exhibits a sigmoid-like dynamics, with an effective rising time $\tau_{Q_{\text{eff}}}$ of order 200 s. However in most of the experiments, the effective rigidification time $\tau_{G_{\text{eff}}}$ is closer to the rising time for the overall actin network density $\tau'_{Q_{\text{eff}}}$ than to $\tau_{Q_{\text{eff}}}$. This is also evident in the average values: both $\tau_{G_{\text{eff}}}$ and $\tau'_{Q_{\text{eff}}}$ are very close to 300 s. It means that the local reinforcement of the actin network results in a greater cell rigidity. The rigidity increase is thus very dependent on the actin network density, which is modified by the external stress, even relatively far from the application zone.

Conclusion

This work is the first attempt to quantify the dynamics of both cell stiffening and actin recruitment in response to a controlled external stress. We evidence a mechanical strengthening of cells in response to force application, and a reinforcement both of the cell-substrate contact and of the local actin network in the vicinity of the force application zone, and up to several micrometers from it. The rising times for cell rigidity and actin quantity are about 300 s for C2C12 cells.

The increase in the actin quantity may be due to a densification or a broadening of the actin cortex in this zone, and/or to a more global reorganization of the filaments within the cell, allowing for instance new actin bundles to grow from or towards the force application zone. Further investigation will include confocal imaging, that could help to determine the presence of such bundles. Furthermore, the mechanism of this actin recruitment still has not been elucidated.

Acknowledgements

The authors wish to thank François Gallet (MSC) for very helpful assistance and advice; Myriam Allieux and Maïté Coppey (Institut Jacques Monod, Paris, France) for interesting discussions and the GFP-actin plasmid. This work was supported by the Association pour la Recherche contre le Cancer.

References

1. Felsenfeld, D. P., D. Choquet, and M. P. Sheetz, 1996. Ligand binding regulates the directed movement of $\beta 1$ integrins on fibroblasts. *Nature* 383:438–440.
2. Zamir, E., and B. Geiger, 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* 114:3583–3590.
3. Geiger, B., A. Bershadsky, R. Pankov, and K. M. Yamada, 2001. Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:793–805.
4. Saez, A., A. Buguin, P. Silberzan, and B. Ladoux, 2005. Is the mechanical activity of epithelial cells controlled by deformations or forces? *Biophys. J.* 89:L52–54.
5. Engler, A., L. Bacakova, C. Newman, A. Hategan, M. Griffin, and D. Discher, 2004. Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses. *Biophys. J.* 86:617–628.
6. Pelham, R. J., and Y.-L. Wang, 1997. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:13661–13665.
7. Lo, C.-M., H.-B. Wang, M. Dembo, and Y.-L. Wang, 2000. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys. J.* 79:144–152.
8. du Roure, O., A. Saez, A. Buguin, R. H. Austin, P. Chavrier, P. Silberzan, and B. Ladoux, 2005. Force mapping in epithelial cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:2390–2395.
9. Giancotti, F. G., and E. Ruhoslahti, 1999. Integrin signaling. *Science* 285:1028–1032.
10. Wang, H.-B., M. Dembo, and Y.-L. Wang, 2000. Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279:C1345–C1350.
11. Saez, A., M. Ghibaudo, A. Buguin, P. Silberzan, and B. Ladoux, 2007. Rigidity driven growth and differentiation of epithelial cells on microstructured anisotropic substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:8281–8286.
12. Choquet, D., D. Felsenfeld, and M. P. Sheetz, 1997. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of the integrin-cytoskeleton linkages. *Cell* 88:39–48.
13. Balaban, N. Q., U. S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi, and B. Geiger, 2001. Force and focal adhesion assembly, a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat. Cell Biol.* 3:466–472.
14. Katz, B.-Z., E. Zamir, A. Bershadsky, Z. Kam, K. M. Yamada, and B. Geiger, 2000. Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Mol. Biol. Cell* 11:1047–1060.
15. Galbraith, C. G., K. M. Yamada, and M. Sheetz, 2002. The relationship between force and focal complex development. *J. Cell Biol.* 159:695–705.
16. Delanoë-Ayari, H., R. A. Kurdi, D. Gulino-Debrac, and D. Riveline, 2004. Membrane and actomyosin tension promote clustering of adhesion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:2229–2234.
17. Felsenfeld, D. P., P. L. Schwartzberg, A. Venegas, R. Tse, and M. P. Sheetz, 1999. Selective regulation of integrin-cytoskeleton interactions by the tyrosine kinase Src. *Nat. Cell Biol.* 1:200–206.
18. Riveline, D., E. Zamir, N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger, and A. Bershadsky, 2001. Focal contacts as mechanosensors, externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts in an mDial-dependent and ROCK-independent mechanism. *J. Cell. Biol.* 153:1175–1185.

19. Wang, Y., E. L. Botvinick, Y. Zhao, M. Berns, S. Usami, R. Y. Tsien, and S. Chien, 2005. Visualizing the mechanical activation of Src. *Nature* 434:1040–1045.
20. Fabry, B., G. N. Maksym, J. P. Butler, M. Glogauer, D. Navajas, and J. J. Fredberg, 2001. Scaling the microrheology of living cells. *Phys. Rev. Lett.* 87:148102.
21. Fabry, B., G. N. Maksym, S. A. Shore, P. E. Moore, R. A. P. Jr, J. P. Butler, and J. J. Fredberg, 2001. Selected contribution, time course and heterogeneity of contractile responses in cultured human airway smooth muscle cells. *J. Appl. Physiol.* 91:986–994.
22. Desprat, N., A. Richert, J. Simeon, and A. Asnacios, 2005. Creep function of a single living cell. *Biophys. J.* 88:2224–2233.
23. Balland, M., N. Desprat, D. Icard, S. Féréol, A. Asnacios, J. Browaeys, S. Hénon, and F. Gallet, 2006. Power laws in microrheology experiments on living cells, Comparative analysis and modelling. *Phys. Rev. E* 74:021911.
24. Balland, M., A. Richert, and F. Gallet, 2005. The dissipative contribution of myosin II in the cytoskeleton dynamics of myoblasts. *Eur. Biophys. J.* 34:255–261.
25. Smith, B. A., B. Tolloczko, J. Martin, and P. Grütter, 2005. Probing the viscoelastic behavior of cultured airway smooth muscle cells with atomic force microscopy, stiffening induced by contractile agonist. *Biophys. J.* 88:2994–3007.
26. Wang, N., J. P. Butler, and D. E. Ingber, 1993. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 260:1124–1127.
27. Lee, J. S. H., P. Panorchan, C. M. Hale, S. B. Khatau, T. P. Kole, Y. Tseng, and D. Wirtz, 2006. Ballistic intracellular nanorheology reveals ROCK-hard cytoplasmic stiffening response to fluid flow. *J. Cell Sci.* 119:1760–1768.
28. Wang, N., and D. E. Ingber, 1994. Control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape and mechanical tension. *Biophys. J.* 66:2181–2189.
29. Deng, L., N. J. Fairbank, B. Fabry, P. Smith, and G. N. Maksym, 2004. Localized mechanical stress induces time-dependent actin cytoskeletal remodeling and stiffening in cultured airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 287:C440–C448.
30. Matthews, B. D., D. R. Overby, and d. D. E. I. R. Mannix a, 2006. Cellular adaptation to mechanical stress, role of integrins, Rho, cytoskeletal tension and mechanosensitive ion channels. *J. Cell Sci.* 119:508–519.
31. Simmons, R. M., J. T. Finer, S. Chu, and J. Spudich, 1996. Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap. *Biophys. J.* 70:1813–1822.
32. Laurent, V. M., S. Henon, E. Planus, R. Fodil, M. Balland, D. Isabey, and F. Gallet, 2002. Assessment of mechanical properties of adherent living cells by bead micromanipulation, comparison of magnetic twisting cytometry vs optical tweezers. *J. Biomech. Eng.* 124:408–421.
33. Zamir, E., B.-Z. Katz, S. i. Aota, K. M. Yamada, B. Geiger, and Z. Kam, 1999. Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* 112:1155–1669.
34. Lenormand, G., E. Millet, B. Fabry, J. P. Butler, and J. J. Fredberg, 2004. Linearity and time scale invariance of the creep function in living cells. *J. R. Soc. Interface* 1:91–97.
35. Chrzanowska-Wodnicka, M., and K. Burridge, 1996. Rho-Stimulated Contractility Drives the Formation of Stress Fibers and Focal Adhesions. *J. Cell Biol.* 133:1403–1415.
36. Trepap, X., M. Grabulosa, L. Buscemi, F. Rico, R. Farré, and D. Navajas, 2005. Thrombin and histamin induce stiffening of alveolar epithelial cells. *J. Appl. Physiol.* 98:1567–1574.

37. Karcher, H., J. Lammerding, H. Huang, R. T. Lee, R. D. Kamm, and M. Kaazempur-Mofrad, 2003. A three-dimensional viscoelastic model for cell deformation with experimental verification. *Biophys. J.* 85:3336–3349.
38. Nicolas, A., and S. Safran, 2006. Limitation of cell adhesion by the elasticity of the extracellular matrix. *Biophys. J.* 91:61–73.
39. Bausch, A., F. Ziemann, A. A. Boulbitch, K. Jacobson, and E. Sackmann, 1998. Local measurements of viscoelastic parameters of adherent cell surfaces by magnetic bead microrheometry. *Biophys. J.* 75:2038–2049.

Tables

| Cell type | Nb of cells | $\langle \alpha \rangle$ | σ_α | $\langle \log G_0 \rangle$ | $\sigma_{\log G_0}$ | $G_{0,med}$ (Pa) | $\langle G_0 \rangle$ (Pa) |
|-----------|-------------|--------------------------|-----------------|----------------------------|---------------------|------------------|----------------------------|
| A549 | 22 | 0.300 | 0.100 | 2.48 | 0.375 | 305 (-175/+420) | 480 |
| C2C12 | 39 | 0.316 | 0.089 | 2.45 | 0.475 | 285 (-140/+570) | 375 |

Table 1: Mechanical parameters calculated from creep measurements performed on A549 cells and C2C12 cells with RGD-coated beads ($\langle \rangle$ denotes average values, σ the width of the distribution, $G_{0,med}$ is the median value of the viscoelastic modulus G_0 , given by $G_{0,med} = 10^{\langle \log G_0 \rangle}$).

| | $G_{0,ini}$ (Pa) | $G_{0,max}$ (Pa) | τ_G (s) | τ_Q (s) | τ'_Q (s) |
|------|------------------|------------------|--------------|--------------|---------------|
| mean | 250 | 900 | 630 | 385 | 555 |
| min | 100 | 420 | 90 | 115 | 225 |
| max | 1000 | 2100 | 2000 | 835 | 875 |

Table 2: Mechanical and actin data for C2C12 cells (11 experiments in which both stiffening and actin recruitment were observed): mean, minimum and maximum values of $G_{0,ini}$ and $G_{0,max}$, and of the fitting parameters τ_G , τ_Q , τ'_Q .

Figure Legends

Figure 1.

Mechanical measurements on single cells. (A) Creep function of a single C2C12 cell as a function of force application time, fitted by a power law $J(t) = 5.88 \cdot 10^{-3} t^{0.181} \text{ Pa}^{-1}$ (in log-log scale). (B) Successive creep functions on a single A549 cell: a series of step forces is applied. For each step, the creep function is measured. For better readability, $J(t)$ is displayed for only 4 of the 9 step force applications: number 2, 4, 5 and 7. (C) The corresponding viscoelastic modulus G_0 versus time, fitted by a sigmoid with a rising time $\tau_G = 75 \text{ s}$. Mechanical saturation is reached in this example.

Figure 2.

Distribution histograms and cumulative probability functions of the power law parameters: exponent α (A) viscoelastic modulus G_0 (B), measured on 39 different C2C12.

Figure 3.

A C2C12 cell during force application: transmission image with the ROI around the bead (A); fluorescence images of GFP-actin at times $t_1 = 420\text{s}$ (B), $t_3 = 1080\text{s}$ (C), $t_8 = 1440\text{s}$ (D), $t_7 = 1920\text{s}$ (E), $t_9 = 2400\text{s}$ (F), $t_{10} = 2640\text{s}$ (G) . Arrows in images D and E point at adhesion patches. (bar: $5\mu\text{m}$)

Figure 4.

(A) Sketch of the actin recruited in FA around the bead during one experiment. The arrow gives the force direction, the ellipses are the best fits for the actin patches detected, and are labeled according to the image number at which they appeared. (B) Distribution of the actin patches orientations. Angles are calculated relatively to the angle of force application.

Figure 5.

Plot of the actin density $\delta Q'_i$ in successive rings around the bead (of radii $\delta R_1 = 2.5$ to $\delta R_8 = 6.0 \mu\text{m}$), at different step force application times t_k , $k = 2$ (open down triangles), 4 (open up triangles), 6 (open circles), 8 (plain down triangles), 10 (plain up triangles), 12 (plain circles). During force application, the actin quantity increases even far from the bead. An exponential decay fit $\delta Q'(r) = A + B \exp(-r/R_c)$ yields a cutoff radius R_c of order $3.5 \mu\text{m}$ (resp. $1.4, 5.2, 3.25$ and $4.55 \mu\text{m}$ for t_4, t_6, t_{10} and t_{12}).

Figure 6.

Normalized cell viscoelastic modulus $g(t)$ (grey dots) and actin quantities $q(t)$ (open diamonds) and $q'(t)$ (black diamonds) versus time, during a series of step force application. Fitting this experiment by a sigmoid yields the parameters: $\{q_0 = 1.9 \cdot 10^{-4}, q_f = 1.01, \tau_Q = 300 \text{ s}\}$, $\{q'_0 = 6.2 \cdot 10^{-3}, q'_f = 1.03, \tau'_Q = 471 \text{ s}\}$ and $\{g_0 = 1.6 \cdot 10^{-3}, g_f = 1.2, \tau_G = 612 \text{ s}\}$.

Figures

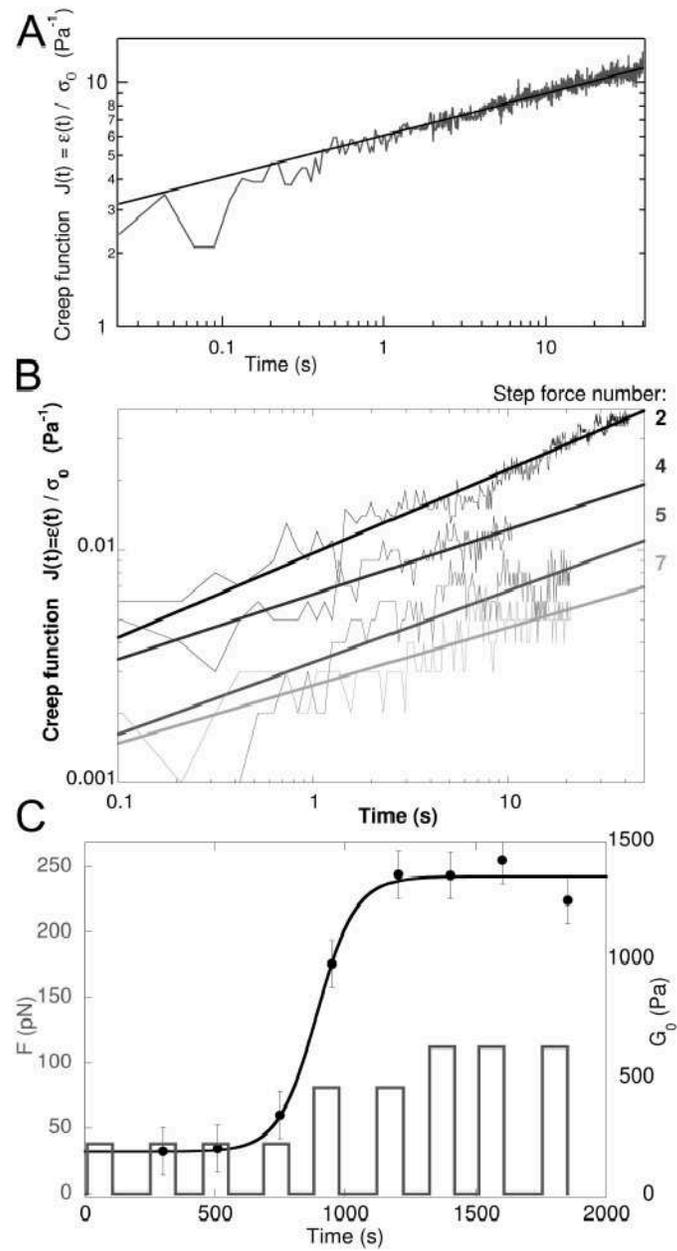


Figure 1:

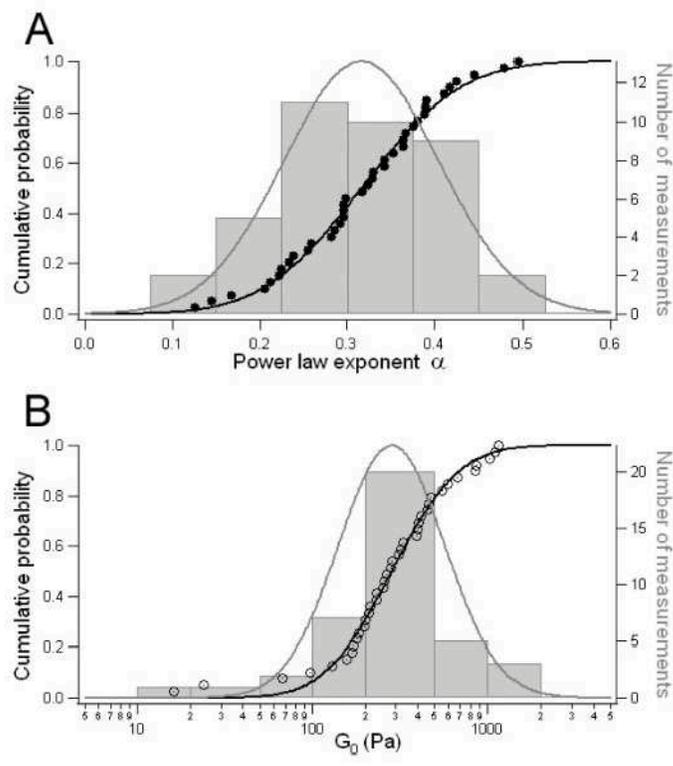


Figure 2:

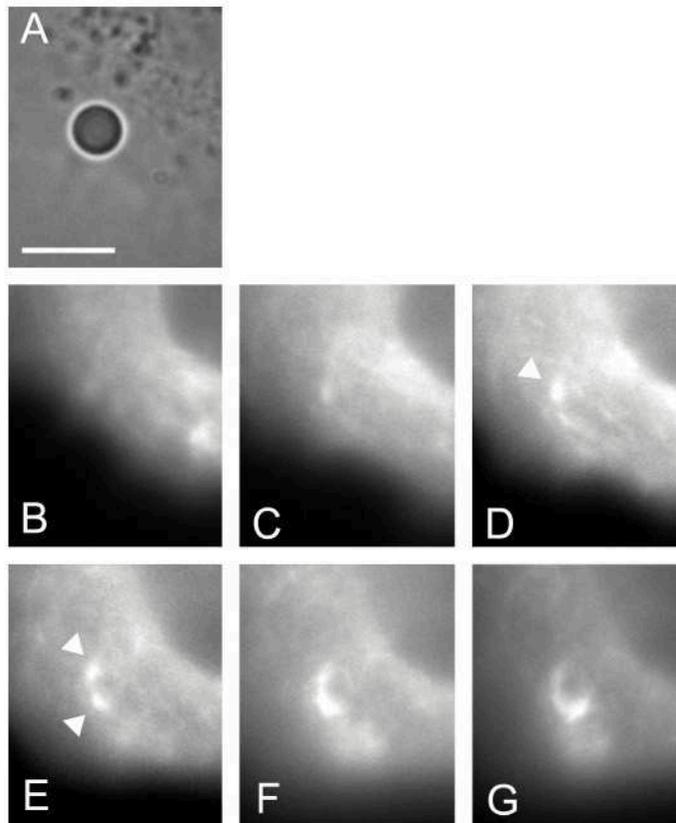


Figure 3:

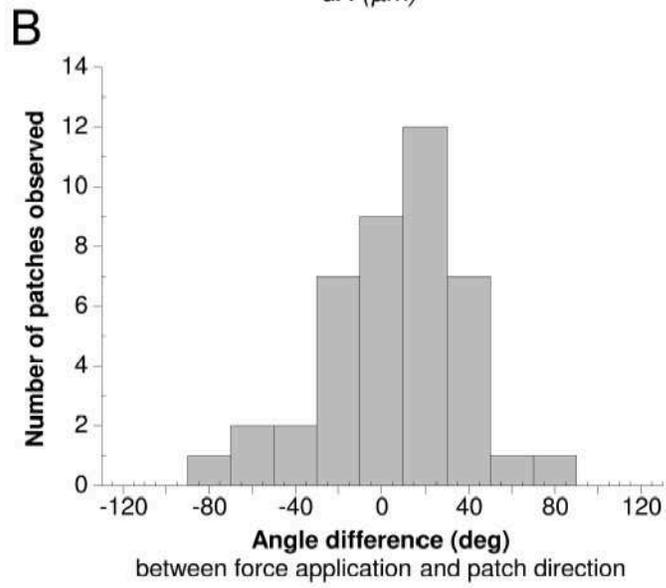
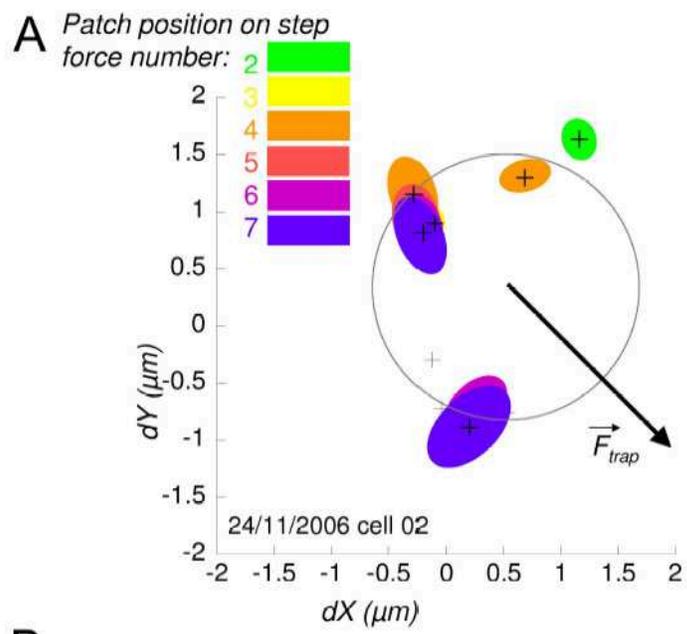


Figure 4:

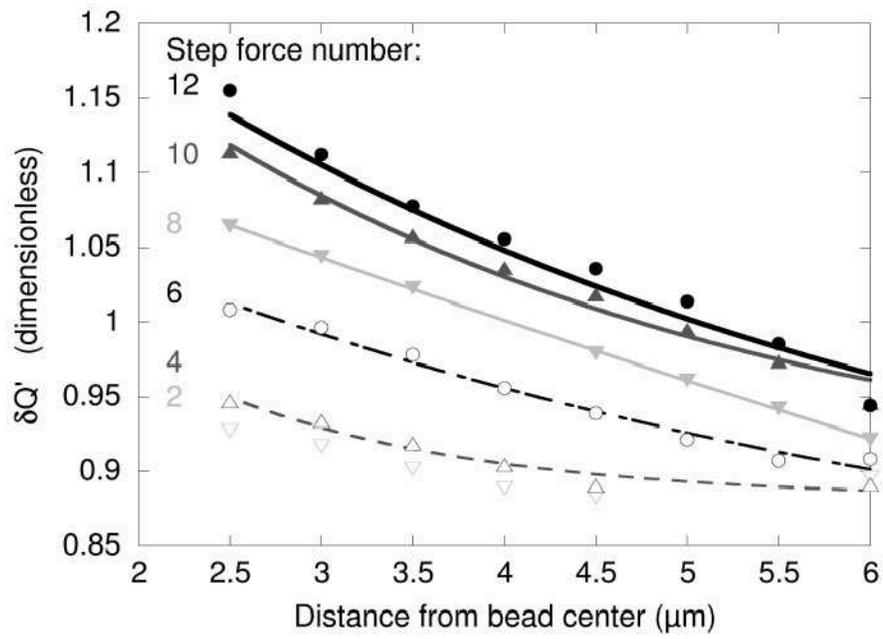


Figure 5:

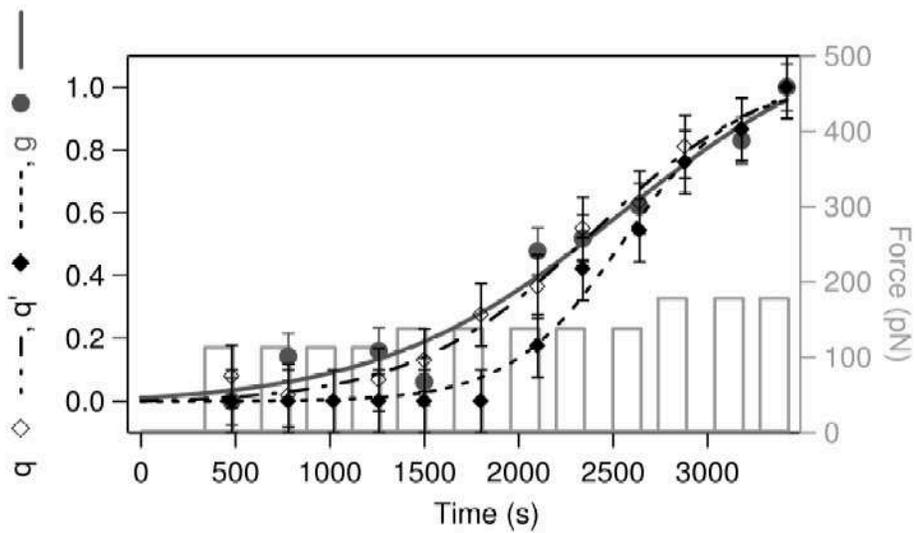


Figure 6:

Modifications mécaniques et biologiques induites dans des cellules en culture par application locale d'une force contrôlée

Résumé

Les propriétés mécaniques des cellules adhérentes ont une importance capitale pour l'ensemble de leurs fonctions : division, migration, différenciation, etc. De plus, on sait désormais qu'elles sont très sensibles aux caractéristiques mécaniques de leur substrat, auquel elles sont ancrées par l'intermédiaire des intégrines. Ces récepteurs transmembranaires lient indirectement le cytosquelette d'actine intracellulaire aux protéines de la matrice extracellulaire.

Nous avons conçu un dispositif de pinces optiques contrôlées par une boucle de rétroaction, qui permet d'appliquer aux cellules une force locale constante, *via* des microbilles liées aux intégrines. Nous pouvons ainsi mesurer la fonction de fluage de chaque cellule et en tirer une estimation de sa rigidité. Des observations simultanées en épifluorescence permettent par ailleurs d'évaluer les effets de l'application de la force sur la répartition d'actine locale.

Nous avons constaté que les cellules se rigidifient sous l'application prolongée d'une force, tout en gardant le même comportement rhéologique : une fonction de fluage en loi de puissance du temps, $J(t) = At^\alpha$, où A décroît aux temps longs. Cette rigidification est couplée à un recrutement d'actine au niveau des contacts et au sein du réseau cytosquelettique (jusqu'à plusieurs μm du point d'application de la force). De plus, les dynamiques de ces deux phénomènes semblent fortement corrélées.

Ce travail présente une évaluation de la dynamique de renforcement cellulaire sous contrainte, et ouvre des perspectives prometteuses vers l'élucidation des phénomènes intervenant dans la mécanotransduction.

Abstract

Adherent cells can control their mechanical properties in order to perform crucial biological functions, like division, migration or differentiation. It has now been proved that cells are very sensitive to the mechanical properties of their substrate, which they sense through integrins. Integrins are transmembrane proteins that link the actin cytoskeleton to the extracellular matrix through scaffolding proteins.

We designed an optical tweezers setup controlled by a feedback loop, which allows the application of a constant local force *via* microbeads bound to the cell integrins. We can thus measure the creep function of a single cell and retrieve an estimate of its rigidity. Simultaneous fluorescence observations allow us to evaluate the impact of force application on the actin repartition within the cell.

We observed that cells stiffen under force application but keep the same rheological response – the creep function still exhibits a power law behavior : $J(t) = At^\alpha$, in which A decreases on a long time range. Stiffening is coupled to actin recruitment both in the contacts and in the cytoskeleton network – up to several μm from the force application point. Stiffening and recruitment dynamics seem strongly correlated.

This work presents an evaluation of the dynamics of cell stiffening under stress, which is a novel insight into the elucidation of the more general phenomenon of mechanotransduction.