



HAL
open science

Rôle de la tension interne du cytosquelette et de la mécanotransduction dans le contrôle de la perméabilité de l'endothélium vasculaire pulmonaire agressé

Adam Caluch

► **To cite this version:**

Adam Caluch. Rôle de la tension interne du cytosquelette et de la mécanotransduction dans le contrôle de la perméabilité de l'endothélium vasculaire pulmonaire agressé. Biologie cellulaire. Université Paris-Est, 2013. Français. NNT : 2013PEST0102 . tel-01140857

HAL Id: tel-01140857

<https://theses.hal.science/tel-01140857>

Submitted on 9 Apr 2015

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.

UNIVERSITÉ — — PARIS-EST

Thèse de Doctorat

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

**Rôle de la tension interne du cytosquelette et de la
mécanotransduction dans le contrôle de la perméabilité de
l'endothélium vasculaire pulmonaire agressé.**

Soutenue par Adam Caluch

Le 20 décembre 2013

Devant le jury composé de :

Pr. Jean-Damien RICARD

Pr. Abdul BARAKAT

Pr. René-Marc MÈGE

Pr. Sylvie HÉNON

Dr. Daniel ISABEY

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Directeur de Thèse

The good thing about science is that it's true whether or not you believe in it.

Neil deGrasse Tyson

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier Daniel Isabey pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de biomécanique cellulaire. Je le remercie également pour sa disponibilité tout au long de ces années et encore plus à la fin de la thèse, ainsi que pour la rigueur scientifique et la persévérance qu'il m'a enseignées. Merci pour ta confiance et ton soutien qui m'ont permis d'aller jusqu'au bout.

J'adresse mes plus sincères remerciements aux Professeurs Abdul Barakat et René-Marc Mège pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail de thèse, ainsi qu'au Professeurs Sylvie Hénon et Jean-Damien Ricard pour avoir accepté d'en être les examinateurs.

Nous nous sommes côtoyés pendant des années et je remercie les membres passés et présents de l'équipe du Laboratoire de Biomécanique pour leur aide et leur gentillesse. Alexis, André, Bin, Bruno, Cécile, Estelle, Gabriel, Gabriela, Jean-François, Julien, Minh, Patricia, Pierre-Antoine, Redouane, Sébastien, Sophie, vous avez consacré ce qu'il y a de plus précieux : votre temps, que ce soit en manips ou à titre personnel. Je vous présente tous mes vœux de réussite et d'épanouissement professionnel et personnel.

A vous nouveaux doctorants, je souhaite du courage, de la ténacité et une brillante réussite dans ce que vous entreprendrez. Merci de votre soutien et merci de votre implication au Comité des Doctorants et PostDoctorants.

Un grand merci aux membres du CoDoPoDo : Adrien, Asmaa, Aude, Benjamin, Candice, Corine, Enis, Florence, Guillaume, Jayne-Louise, Jonathan, Josselin, Lydie, Merieme, Nathalie, Omar, Shahul, Shariq, Stéphane, Valérie. Avec vous les journées au labo étaient plus légères et plus agréables. Au fil du temps vous êtes devenus bien plus que des collègues 😊 Chers amis je vous souhaite toute la réussite possible et surtout que vous soyez épanouis et heureux. Merci pour toutes les discussions scientifiques et surtout non-scientifiques que nous avons eues, c'est tellement bon de parler d'autres choses que de science quelquefois (spéciale dédicace à la quiche, qui se reconnaîtra). Merci surtout pour votre soutien dans les moments difficiles que la vie nous réserve. J'espère que le CoDoPoDo continuera d'exister et de se développer, car il semble essentiel de créer et entretenir un esprit d'entraide et de partage au sein de l'Institut Mondor de Recherche Biomédicale.

Merci aussi aux membres des équipes 3 et 8, nous avons partagé un couloir, un café, des bonnes blagues, des fous rires, des anticorps, des connaissances scientifiques, des bons plans et surtout de la joie.

Mes remerciements à Corinne, pour son efficacité et sa gentillesse. Merci également à Cyril et Sylvie de la laverie car vous contribuez grandement à ce que les choses tournent pour les manips.

Je tiens à remercier particulièrement les supers profs Yann Bassaglia et Valérie Itier qui m'on fait aimer la science, tout simplement.

Un grand merci à mes amis de la fac qui ont fait que les cours de science soient aussi amusants : Christophe, Elodie, Laura des bisous à vous.

Je suis reconnaissant envers ma famille et mes amis pour leur soutien sans faille tout au long de ces années. Un petit mot pour Marie qui m'a donné le courage de terminer ce travail, merci ma bien aimée.

Et surtout, je souhaite tout particulièrement remercier mes parents pour tout ce qu'ils ont fait durant ces années, pour leur soutien malgré les épreuves très difficiles qu'ils ont eues à surmonter ; je suis fier d'être leur fils.

II. 3.1.3	Structure des microtubules	59
II. 3.2	Forces intracellulaires et cytosquelette.....	60
II. 3.2.1	Rôle des moteurs actine-myosine	61
II. 3.3	Tension interne du cytosquelette équilibre et déséquilibre.....	63
II. 3.3.1	Tension interne.....	65
II. 3.3.2	Modèle de tenségrité comme modèle explicatif des réponses mécanique et biologique de la cellule	66
II. 3.3.3	Relation linéaire entre rigidité et tension interne dans le cytosquelette.....	69
II. 3.3.4	Rhéologie du cytosquelette	70
II. 3.4	Méthodes d'évaluation du cytosquelette et des molécules d'adhésion	71
II. 3.4.1	Magnétocytométrie classique.....	71
II. 3.4.2	Magnétocytométrie oscillante.....	73
II. 3.4.3	Microscopie à force atomique	73
II. 3.5	Modèles rhéologiques.....	74
II. 4	Interactions croisées entre les voies extracellulaires et intracellulaires....	77
II. 5	Nos objectifs	81
III.	Matériel et Méthodes	83
III. 1	Outils biologiques et d'imagerie	83
III. 1.1	Culture cellulaire.....	83
III. 1.2	Perméabilité.....	84
III. 1.3	Etude d'expression protéique	85
III. 1.3.1	Western blot.....	85
III. 1.3.1.1	Traitements des échantillons	85
III. 1.3.1.2	SDS-PAGE	86
III. 1.3.1.3	Electro-transfert sur membrane et révélation.....	87
III. 1.3.1.4	Analyse densitométrique	87
III. 1.4	Immunofluorescence et imagerie.....	88
III. 1.4.1	Immunofluorescence.....	88
III. 1.4.2	Microscopie confocale	89
III. 1.4.3	Analyse d'images et quantification	90
III. 2	Outils de mesure et de stimulation mécanique.....	90
III. 2.1	Techniques de micromanipulation cellulaire.....	90
III. 2.2	Magnétocytométrie.....	91
III. 2.2.1	Principe de la Magnétocytométrie	91
III. 2.2.2	Dispositif expérimental.....	92
III. 2.2.3	Protocole cellulaire	95

III. 2.2.3.1	Fonctionnalisation des microbilles.....	95
III. 2.2.3.2	Fixation des microbilles sur les cellules.....	96
III. 2.2.4	Analyse des mesures au travers de modèles bio-rhéologiques et d'adhésion.....	96
III. 2.2.4.1	Modèle simple Voigt.....	97
III. 2.2.4.2	Modèle double Voigt.....	99
III. 2.2.4.3	Introduction de la notion de glissement pour l'analyse des résultats d'expériences MTC.....	100
III. 2.2.4.4	Introduction de la notion d'adhésion pour l'analyse des résultats d'expériences MTC.....	102
III. 2.2.4.5	Critères de qualité et exemples d'ajustements modèle-expérience MTC.....	103
III. 2.3	Magnétostimulation.....	105
III. 2.3.1	Principe de la Magnétostimulation.....	105
III. 2.3.2	Dispositif expérimental.....	106
III. 2.4	Analyse statistique.....	108
IV.	Résultats.....	110
IV. 1	Effets sur la structure d'actine d'une contrainte mécanique cyclique ciblant le CSK.....	111
IV. 2	Effets sur la mécanique et la cinétique d'adhésion matricielle d'une contrainte mécanique cyclique ciblant le CSK.....	114
IV. 2.1	Analyse par le modèle viscoélastique à deux compartiments et un angle de glissement global.....	114
IV. 2.2	Analyse par le modèle viscoélastique à deux compartiments et paramètre cinétique d'adhésion.....	117
IV. 2.3	Analyse par le modèle viscoélastique à un compartiment et paramètre d'adhésion.....	119
IV. 3	Effet d'une contrainte mécanique cyclique ciblant le CSK sur la redistribution des molécules d'adhésion.....	120
IV. 4	Effet d'une contrainte mécanique cyclique ciblant le CSK sur l'expression protéique.....	124
IV. 5	Effet d'une contrainte mécanique cyclique ciblant le CSK sur la perméabilité d'une monocouche endothéliale.....	126
V.	Discussion.....	130
VI.	Conclusion générale et perspectives.....	140
VII.	Publications.....	143
VIII.	Bibliographie.....	213

Liste des abréviations

AFM	Atomic force microscopy ou Microscope à force atomique	GRB2	Growth Factor Receptor-Bound Protein-2
AJ	Adherent junction, Jonction adhérente ou encore jonction d'adhésion	GRAF	GTPase Regulator Associated with FAK
ALI	Acute Lung Injury ou atteinte pulmonaire aiguë	HMEC-1	Cellules dermales microvasculaires humaines
Arf	ADP ribosylation factor	HPMEC	Human pulmonary microvascular endothelial cells ou Cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines
ATP	Adénosine-5'-triphosphate	ILK	Integrin Ligated Kinase
BHE	Barrière hémato-encéphalique	JAM	Junctions adhesion molecules
CASMC	Tracting Artériel Smooth Muscle Cell	k_{off}^0	Constante de dissociation à force nulle
Cav	Cavéoline	k_{on}	Constante de d'association moléculaire
CE	Cellules endothéliales	LBA	Lavage broncho alvéolaire
CRP	Cystein Rich Protein	MAGUK	Guanylate kinase associée à la membrane
CSK	Cytosquelette	ML9	ML9 hydrochloride : Inhibiteur sélectif de la kinase de la chaîne légère de la myosine
Csk	Carboxy-terminal src kinase	MLCK	Myosin Light Chain Kinase
CytoD	Cytochalasine D : inhibiteur de la polymérisation des filaments d'actine	MMP	Métalloprotéases matricielles
Da	Dalton, unité de mesure du poids moléculaire	MTC	Magnétocytométrie
DRAL	protéine-LIM réduite dans le rhabdomyosarcome	MTS	Magnétostimulation
DVA	Double Voigt Adhésion : modèle viscoélastique à deux compartiments et adhésion	Nex	Nexiline
DVG	Double Voigt Glissement: modèle viscoélastique à deux compartiments et glissement	NMDA	Récepteur-N-méthyl-D-Aspartate
E	Module de rigidité cellulaire	OP	Optical tweezers ou pinces optiques
E1	Compartiment cortical du module de rigidité cellulaire	PAK	P21 Associated Kinase
E2	Compartiment profond du module de rigidité cellulaire	Pall	Palladine
EC(X)	Domaine extracellulaire ou encore « ectodomain »	PAR6	Partitioning defective protein 6
ERM	Ezrine-radixine-moesine protéine	Parv	Parvine/actopaxine
FAT	Focal Adhesion Targeting FAK	PAX	Paxilline
FAK	Focal Adhesion Kinase	PBS	Phosphate buffered saline ou Tampon phosphate
FI	Filaments intermédiaires	PDZ	Protein Disc large ZO-1 : Domaine contenant glycine-leucine-glycine-phenylalanine
Fil	Filamine	PFA	Paraformaldéhyde
Fim	Fimbrine	PG	Protéoglycane
GAG	Glycosaminoglycane	PI3K	Phosphatidyl Inositol 3-kinase
GAP	GTPase activatrice	PIX	PAK-interacting exchange factor
GDP	Guanosine-5'-diphosphate	PKC	Protéine Kinase C
GTP	Guanosine-5'-triphosphate	PKL	Paxillin Kinase Linker
GUK	Guanylate kinase	Pon	Ponsine
		PTP	Protéine tyrosine phosphatase
		RGD	Séquence peptidique : Arginine-Glycine-Acide aspartique
		RhoA	Ras homolog gene family member A
		ROCK	Rho associated protein kinase

SDRA	Syndrome de détresse respiratoire aiguë Acute Respiratory Distress Syndrome	T2	Constante de temps du module de rigidité E2
SH3	Src homology 3	VASP	Vasodilatator stimulated phosphoprotein
Src FK	Src-Family Kinases	v1	Module de viscosité du compartiment cortical du cytosquelette d'actine
SVA	Simple Voigt Adhésion : modèle viscoélastique à un compartiment et adhésion	v2	Module de viscosité du compartiment profond du cytosquelette d'actine
Synd	Syndesmone	VEGF	Vascular endothelial growth factor
Synt	Syntenine	Vin	Vinculine
Tal	Taline	Vnx	Vinexine
Ten	Tensine	Zyn	Zyxine
θ Gliss	Représente l'angle de glissement de la bille par rapport à la cellule	ZO	Zona occludin» Zona occludine
TJ	Tight junctions : Jonctions occlusives ou encore jonctions serrées	% Slip Bonds	Pourcentage de liens immatures.
TNF	Tumor Necrosis Factor		
T1	Constante de temps du module de rigidité E1		

Table des illustrations

Figure 1. Coupe en microscopie électronique d'un poumon endommagé durant l'ALI/ARDS.	21
Figure 2. Schématisation d'une alvéole normale (gauche) et d'une alvéole endommagée dans l'ALI/SDRA (à droite).....	22
Figure 3. Effets d'une ventilation protectrice sur le taux de survie des patients présentant un SDRA.	23
Figure 4. Modèle avancé de la relation entre le volume courant et le plateau de mortalité résultant de la variation du volume courant.	24
Figure 5. Ultrastructure de la partie fine de la barrière alvéolo-capillaire chez le rat.	26
Figure 6. Mécanisme possible montrant comment un excès de tension dans la matrice de collagène de type IV peut causer la rupture des couches épithéliales et endothéliales de la barrière alvéolo-capillaire.	26
Figure 7. Structures des jonctions intercellulaires occlusives et adhérentes et leurs connexions avec le cytosquelette d'actine.	30
Figure 8. Un modèle stochastique et élastique des liens récepteur-ligand. D'après (Qian and Gao 2010).....	32
Figure 9. Ectodomains d'interaction des cadhérines de type II.	34
Figure 10. Schéma de la queue cytoplasmique de la VE-cadhérine et de ses sites de phosphorylation.....	38
Figure 11. Modèle suggéré pour la régulation de l'expression de la Claudine 5 par la VE-cadhérine.	39
Figure 12. Domaines d'interaction des ZO et leurs protéines de liaison.....	42
Figure 13. Modélisation de la structure du glycocalyx.....	43
Figure 14. Changement du coefficient de perméabilité pour l'albumine (P_a) en fonction du temps dans des veinules coronaires durant l'administration de peptides.	49
Figure 15. Schéma représentant les intégrines et leurs sous-unités α et β (en orange) ainsi que leur interactions avec les différentes protéines de liaison au cytosquelette d'actine (en rouge foncé).....	50
Figure 16. Schématisation de la structure de la FAK et de ses sites d'associations aux autres protéines.	53
Figure 17. Schéma des processus de polymérisation et dépolymérisation de l'actine.	55
Figure 18. Résumé des fonctions du complexe Arp2/3 et de nucléation par les formines.....	57
Figure 19. Schéma des processus de polymérisation des filaments intermédiaires.	58
Figure 20. Schéma des processus de polymérisation et dépolymérisation des microtubules.	59
Figure 21. Régulation de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine.	62
Figure 22. Représentation d'un modèle de tenségrité cellulaire avec noyau.....	67
Figure 23. Visualisation de la F-actine dans les cellules A549 par microscopie confocale avec et sans traitement à la cytochalasine D.	68
Figure 24. Relation entre rigidité (G) et la précontrainte ou prestress (P) (exprimés en Pa).....	69
Figure 25. Représentation schématique des modèles mécaniques des matériaux viscoélastiques et de leur réponse à l'application d'une force de déformation.....	75
Figure 26. Propriétés mécaniques de substrats de polyacrylamide et effets de substrats sur la morphologie cellulaire.....	78
Figure 27. Modèle multi échelle et Force de rupture.....	79
Figure 28. Schéma de la culture des cellules sur les inserts perméables.	84
Figure 29. Principe de la microscopie confocale permettant l'obtention d'un empilement d'images dans différents plans focaux.....	89
Figure 30. Les 3 étapes de la magnétocytométrie.	92
Figure 31. Magnétocytométrie : en haut, dispositif ; en bas, principe de la mesure de déviation angulaire.....	93
Figure 32. Magnétocytométrie : dispositif de la détection synchrone.	94

Figure 33. Exemple de mesures associées de contrainte-déformation obtenue avec la MTC.....	96
Figure 34. Modèle simple Voigt : représentation schématique d'une cellule par un modèle simple Voigt.....	98
Figure 35. Schéma représentatif de la contrainte appliquée considérée comme une série de segments de droites.....	99
Figure 36. Modèle double Voigt : représentation schématique d'une cellule par un modèle double Voigt.....	100
Figure 37. Représentation d'une mesure du champ magnétique rémanent et des modèles viscoélastiques..	105
Figure 38. Les 3 étapes de la Magnétostimulation.....	106
Figure 39. Magnétostimulation : banc de stimulation mécanique en place dans l'incubateur.	107
Figure 40. Simulation comparative des champs magnétiques obtenus avec un solénoïde simple (à gauche) ou renforcé (à droite).....	107
Figure 41. Reconstruction tridimensionnelle de l'actine montrant l'insertion des microbilles dans une monocouche de cellules primaires microvasculaires pulmonaires humaines (HPMEC).	111
Figure 42. Vues en microscopie confocale de l'actine marquée à la rhodamine-phalloïdine au pôle basal d'une monocouche de HPMEC.	112
Figure 43. Visualisation de l'évolution du cytosquelette d'actine au pôle basal des cellules avant et après stimulation mécanique (2h) dans différentes conditions de traitement.	113
Figure 44. Mesures rhéologiques obtenues en utilisant le modèle d'analyse par modèle viscoélastique à deux compartiments et glissement (DVG).	116
Figure 45. Mesures rhéologiques obtenues en utilisant le modèle d'analyse par modèle viscoélastique à deux compartiments et adhésion (DVA).	118
Figure 46. Mesures rhéologiques obtenues en utilisant le modèle d'analyse par modèle viscoélastique à un compartiment et adhésion (SVA).	120
Figure 47. Marquages de l'actine et de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et quantification de ses clusters.....	122
Figure 48. Vues en microscopie à fluorescence du marquage de la VE-cadhérine sur les HPMEC.....	123
Figure 49. Western blot et quantification de la VE-cadhérine dans les cultures de HPMEC selon les conditions de stimulation.	124
Figure 50. Western blot et quantification des deux sous-unités de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans les cultures de HPMEC selon les conditions de stimulation. Valeurs moyennes \pm SD.....	125
Figure 51. Vues en microscopie du marquage de l'actine des HPMEC cultivées sur les supports poreux servant aux expérimentations de mesure de perméabilité.....	127
Figure 52. Quantification en unités arbitraires (UA) du passage d'un dextran-FITC en fonction du temps d'exposition des monocouches de HPMEC à la magnétostimulation.	128
Figure 53. Schéma global du mécanisme proposé de régulation de la perméabilité par les changements de tension interne en réponse au stress mécanique.....	137
Tableau 1. Caractéristiques permettant d'attribuer un score à chaque patient.	18
Tableau 2. Résumé des caractéristiques du SDRA selon la définition publiée en 1992.	19
Tableau 3. Récapitulatif des éléments définissant le SDRA selon le consensus d'experts réunis en 2011 à Berlin	20
Tableau 4. Comparaison de la force contractile par unité de surface pour différentes populations cellulaires.	63
Tableau 5. Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés en western blot.	87

Introduction

I. Introduction

L'augmentation de la perméabilité vasculaire est un problème clé dans de nombreuses pathologies comme le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA ou ARDS en Anglais), le cancer, ou l'artériosclérose (Matthay and Zimmerman 2005, Satchi-Fainaro, Mamluk et al. 2005, Orr, Stockton et al. 2007). La plupart des travaux sur le contrôle de la barrière vasculaire se sont concentrés sur le rôle des facteurs inflammatoires solubles comme notamment le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) (Petrache, Birukova et al. 2003) ou le facteur de croissance vasculaire (VEGF) (Satchi-Fainaro, Mamluk et al. 2005, Orr, Stockton et al. 2007, Nagy, Benjamin et al. 2008). L'idée selon laquelle la perméabilité vasculaire pulmonaire est placée sous le contrôle des forces mécaniques transmises notamment au sein la Matrice Extra-Cellulaire (MEC) est beaucoup plus récente (Mammoto, Mammoto et al. 2013). En réalité, quand nous avons commencé ce travail, très peu d'études avaient été réalisées dans ce domaine et le lien entre la fuite vasculaire pulmonaire et les forces mécaniques mises en jeu n'avait pas été clairement établi. L'étude de Dudek et al en 2001 (Dudek and Garcia 2001) avait bien suggéré que l'équilibre entre les forces de contraction et les forces d'adhésion cellule-cellule au sein de barrière endothéliale était déterminant pour l'intégrité de la barrière et qu'un déséquilibre entre ces forces pouvait être la source de dysfonctionnements mais le rôle de la matrice extracellulaire était alors largement ignoré. Des études plus récentes ont mis en évidence le rôle des propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire et notamment de l'élasticité matricielle dans le contrôle du devenir des cellules souches, le développement tissulaire ainsi que la cancérogénèse (Paszek, Zahir et al. 2005, Engler, Sen et al. 2006, Levental, Yu et al. 2009, Mammoto, Mammoto et al. 2013). Les modifications de la structure et de la rigidité matricielle peuvent jouer un rôle dans des quantités de processus physiopathologiques comme l'hyperperméabilité des micro-vaisseaux sanguins tumoraux (Satchi-Fainaro, Mamluk et al. 2005), le développement de l'artériosclérose qui s'accompagne d'une augmentation de la perméabilité endothéliale liée à la perte d'élasticité des parois vasculaires (intima) signe d'une MEC plus rigide notamment à cause de l'âge (Huynh, Nishimura et al. 2011). Un autre exemple est la corrélation entre la perte de compliance

Introduction

pulmonaire et l'augmentation de perméabilité vasculaire dans la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (Li, Liao et al. 2008). Ces résultats sont en faveur d'une perméabilité vasculaire pulmonaire régulée par les changements de propriétés physiques de la structure matricielle (MEC). Les tous récents travaux du groupe de Ingber montrent qu'une augmentation ou une diminution de la rigidité matricielle par rapport aux niveaux physiologiques va altérer l'intégrité de la barrière endothéliale et aboutir à une augmentation de fuites vasculaires (Mammoto, Mammoto et al. 2013). En réalité, les mécanismes chimiques réputés contrôler l'œdème pulmonaire (endotoxine-dépendants) seraient eux aussi sous le contrôle des propriétés mécaniques de la structure de la MEC et des propriétés mécaniques matricielles.

La pièce manquante dans la problématique du contrôle de l'endothélium par les forces mécaniques est précisément celle que nous allons étudier dans cette thèse à savoir le rôle d'un remaniement de la structure intracellulaire sur la perméabilité endothéliale. Nous supposons à la base de ce travail que, sous l'effet des contraintes mécaniques comme celles induites par la ventilation mécanique des poumons de patients atteints de SDRA, un remaniement (remodelage) du cytosquelette risque de se produire et ainsi de contribuer d'une manière qui reste à définir, aux augmentations de perméabilité de l'endothélium. Cette question ne nous semble pas avoir été abordée dans la littérature alors que des travaux expérimentaux et théoriques précédemment réalisés dans mon laboratoire d'accueil (thèse de Sophie Féréol en 2005) sur des cellules pulmonaires (cellules épithéliales de phénotype alvéolaires ou macrophages alvéolaires) ont montré que la rigidité du substrat et la tension interne étaient l'une et l'autre en capacité de contrôler la réponse cellulaire à l'environnement (Féréol, Fodil et al. 2009). Cette régulation s'effectue au travers des sites d'adhésion et notamment des liaisons non covalentes entre protéines d'adhésion comme le sont les jonctions : « récepteur de la membrane plasmique »-« ligand matriciel » type intégrines-fibronectine ou encore les liaisons « cellule-cellule » de type cadhérines. Ce concept apporte des arguments théoriques forts – largement sous considérés dans la littérature – pour comprendre les mécanismes physiopathologiques précédemment évoqués à propos du contrôle de la perméabilité de l'endothélium par les propriétés mécaniques de la MEC. Le rôle supposé sur la perméabilité d'un remaniement du cytosquelette qui modifierait la structure de ce cytosquelette et activerait les couplages actine-myosine est à la base de mon travail de thèse. Notre approche fait appel également à un concept

Introduction

actuellement en pleine évolution à savoir les relations complexes d'interdépendance entre les différents systèmes d'adhésion (Burute and Thery 2012) : cellule-cellule (Niessen, Leckband et al. 2011) et cellule-matrice (Rozario and DeSimone 2010). Ces deux systèmes mettent en jeu des complexes moléculaires transmembranaires qui interagissent dynamiquement avec l'environnement extracellulaire et le cytosquelette (par essence intracellulaire). Ces deux systèmes d'adhésion, même couplés, n'évolueraient pas nécessairement dans le même sens car ils restent fonctionnellement différents mettant en jeu des phénomènes de relocalisation et de redistribution que nous décrirons plus avant. Ainsi, la perméabilité vasculaire serait sous le contrôle de mécanismes de régulation couplés dans lesquels la redistribution spatiale et la polarité structurale et moléculaire semblent jouer un rôle déterminant à l'instar de ce qui se passe dans la migration cellulaire (Vicente-Manzanares, Choi et al. 2009). Clairement, au début de cette thèse, le lien entre ces mécanismes de remodelage tant de l'adhésion que du cytosquelette restait à établir et c'est ce que nous avons tenté de faire tout au long de ce travail.

Un autre argument justifiant l'intérêt et la pertinence de ce travail concerne sa finalité clinique. Dans le SDRA - une complication pulmonaire gravissime associé le plus souvent à une infection systémique - une fuite excessive au travers de la paroi des capillaires pulmonaires remplit de liquide les territoires alvéolaires adjacents causant l'œdème pulmonaire (Matthay and Zimmerman 2005). Ce fluide altère les échanges gazeux qui normalement s'effectuent au travers de la membrane alvéolaire, diminue la compliance pulmonaire et affecte profondément la fonction respiratoire. Le SDRA concerne environ 50% des patients atteints d'une infection générale grave de l'organisme par des germes pathogènes (sepsis) et est associé à une mortalité très importante (60%). Malgré le nombre d'études réalisées sur cette problématique clinique aiguë, les outils thérapeutiques restent extrêmement réduits pour soigner le SDRA et les conséquences d'une perméabilité vasculaire augmentée. Ce manque de traitements adaptés laisse un large champ possible à des études fondamentales pour cerner les mécanismes en jeu notamment au niveau de la réponse cellulaire. Ceci est d'autant plus nécessaire que la prise en charge de la défaillance respiratoire qui accompagne le patient atteint de SDRA nécessite de le mettre sous ventilation mécanique et ainsi de prendre le risque de ventiler un poumon dont le volume disponible aux échanges gazeux est réduit par l'œdème. Un débat est en cours entre les équipes cliniques quant au choix des paramètres de la ventilation chez ces patients mais les

Introduction

modes « protecteurs », à volumes courants modérés, semblent faire consensus car limitant les traumatismes tissulaires dus à des pressions ou des déformations excessives (Network 2000). Ici réside une des motivations fortes de cette étude, à savoir déterminer au niveau cellulaire les effets de contraintes mécaniques dirigées sur le cytosquelette et leurs conséquences sur la fonction endothéliale. Nous avons donc volontairement travaillé sur des cultures primaires de cellules humaines endothéliales microvasculaires pulmonaires (Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells: HPMEC) et étudié leur réponse dans des conditions où le cytosquelette est directement exposé au stress mécanique pendant 1 à 2 heures.

Étude bibliographique

II. Étude bibliographique

II.1 Contexte clinique: Le Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë

II.1.1 Contexte clinique

La réanimation est une discipline médicale centrée sur les détresses majeures d'organes essentiels dans lesquelles le pronostic vital est le plus souvent engagé. Les hémorragies, l'arrêt cardiaque, le choc septique, l'insuffisance ainsi que l'arrêt respiratoire sont les principales causes d'admission en réanimation. La ventilation mécanique est l'une des principales techniques utilisées en réanimation, avec environ 50% des patients sous respiration artificielle dans ce type de service. On considère que la mortalité des patients ventilés en réanimation atteint en moyenne 30%. L'usage au demeurant nécessaire de la ventilation artificielle est parfois la cause d'une aggravation de l'état des patients car plusieurs effets délétères sont dus aux techniques de ventilations et aux gestes qui lui sont associés. Les pneumonies acquises lors de la ventilation artificielle entraînent un allongement de la durée de ventilation.

II.1.2 Critères cliniques du Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë

Le Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë (SDRA, ou ARDS en anglais) a une incidence dans la population qui, selon les études et les pays, se situe entre 1,5 à 75 cas pour 100 000 personnes. La mortalité varie de 10 à 70% selon les causes du SDRA, de l'âge et du nombre de pathologies associées. En effet la mortalité est moindre dans le cas de SDRA isolé alors qu'elle est très élevée si le SDRA est simplement la composante pulmonaire d'une défaillance multi-organes. Le SDRA a été décrit pour la première fois en 1967 par Ashbaugh et coll. (Ashbaugh, Bigelow et al. 1967). Ces auteurs décrivent le cas de 12 patients présentant une détresse respiratoire aiguë, des infiltrats pulmonaires visibles en radiographie, une cyanose réfractaire à l'oxygénothérapie et une compliance pulmonaire

Étude bibliographique

diminuée (Ashbaugh, Bigelow et al. 1967). Les premières descriptions et définitions du SDRA ne comprenaient pas de critères précis pour identifier et classer les patients. Il en résulte une méconnaissance historique de ce type de pathologie, de son évolution et de la mortalité associée à celle-ci.

En 1988 Murray et ses collègues définissent de nouveaux critères basés sur la pression télé-expiratoire ou encore « Positive End Expiratory Pressure » notée PEEP (Murray, Matthay et al. 1988). Ces nouveaux critères prennent en compte la dysfonction multi-viscérale et surtout, permettent d'attribuer un « score » à chaque patient (voir Tableau 1) que l'on obtient en ajoutant les valeurs de chaque item et en divisant par quatre la valeur totale des items retrouvés chez le patient. Bien que cette notion de score clinique soit intéressante dans la mesure où l'on peut inclure plus systématiquement les patients dans des études cliniques multicentriques, le score attribué n'est pas prédictif de l'évolution du SDRA dans les 72 premières heures. Cependant, au delà 4 à 7 jours, ce score devient prédictif de la durée de prolongation de l'assistance respiratoire.

Valeur de chaque item des colonnes	0	1	2	3	4
Nombre de cadrans pulmonaires infiltrés	0	1	2	3	4
PaO ₂ /FiO ₂ (mm Hg)	>300	<300	<225	<175	<100
PEP (cm H ₂ O)		>5	>8	>11	>14
Compliance (mL/cm H ₂ O)	>80	<80	<60	<40	<20

Tableau 1. Caractéristiques permettant d'attribuer un score à chaque patient.

Le score est obtenu en ajoutant les valeurs de chaque item et en divisant le résultat par quatre. Absence de lésion : score = 0 ; atteinte pulmonaire aiguë (ALI) : $0,1 \leq \text{score} \leq 2,5$; ARDS : score $\geq 2,5$. D'après (Murray, Matthay et al. 1988).

En 1994, les travaux du comité de consensus américano-européen tenu deux ans auparavant sont publiés et donnent une nouvelle définition du SDRA (voir Tableau 2). Cette définition distingue d'un côté l'atteinte pulmonaire aiguë notée ALI (pour « Acute Lung Injury ») caractérisée par un rapport de la pression partielle d'oxygène artériel sur la fraction inspirée d'oxygène inférieur à 300 millimètres de mercure (noté $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$ mm Hg), et de l'autre, le SDRA avec un rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ mm Hg. D'autres critères rentrent en compte pour la définition du SDRA comme la présence d'infiltrats pulmonaires bilatéraux visibles en radiographie de face.

Étude bibliographique

ALI	SDRA
$PaO_2/FiO_2 \leq 300$ mm Hg	$PaO_2/FiO_2 \leq 200$ mm Hg
Infiltrats bilatéraux sur radiographies pulmonaires	

Tableau 2. Résumé des caractéristiques du SDRA selon la définition publiée en 1992.

Différentes stratégies ont été développées afin d'améliorer l'oxygénation des patients atteints de SDRA. Tout d'abord l'oxygénothérapie, qui consiste à saturer les voies aériennes du patient avec 100% d'oxygène. A noter toutefois que l'effondrement des espaces aériens alvéolaires empêche tout échange gazeux. L'utilisation de pression positive et de grands volumes courants, 12mL/kg (du poids prédit), permettent d'ouvrir les espaces alvéolaires collabés. Cette solution induit toutefois une surdistension pulmonaire et alvéolo-capillaire qui finit par endommager les tissus restés sains et fonctionnels (Dreyfuss and Saumon 1998, Matthay and Zimmerman 2005). C'est ce que l'on appelle « VILI » pour Ventilator Induced Lung Injury (Ricard, Dreyfuss et al. 2003 , de Prost, Ricard et al. 2011). Suite à une étude parue en 2000 dans le « New England Journal Of Medecine » le volume courant conseillé a été revu à la baisse passant de 10-14 mL/kg à 6-8 mL/kg et préserver les parties pulmonaires saines (Network 2000). D'autres stratégies ont été utilisées comme le placement des patients en décubitus ventral qui permet une meilleure répartition de la déformation pulmonaire et une meilleure répartition du volume inspiré dans l'arbre aérien.

Un comité d'experts a été réuni en 2011 à l'initiative de la Société européenne de médecine de soins intensifs (European Society of Intensive Care Medecine ; ESICM) et avec l'approbation des deux entités aux Etats-Unis « American Thoracic Society » et « Society of Critical Care Medicine » afin d'affiner plus avant la définition du SDRA en intégrant les dernières données épidémiologiques et celles des études cliniques réalisées ces dernières années. Cette définition est retranscrite dans le Tableau 3.

Étude bibliographique

Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë		
Temps	Doit survenir dans les 7 jours suivant un traumatisme clinique nouveau ou préexistant ou après la dégradation des conditions respiratoires du patient.	
Imagerie	Infiltrats bilatéraux, ne pouvant être expliqués seulement par des épanchements, un effondrement pulmonaire ou d'un lob, ou encore par des nodules.	
Origine de l'œdème	Ne peut pas être uniquement d'origine cardiogénique ou dû à une hyper volémie. L'échocardiographie permet d'exclure l'œdème hydrostatique des causes possibles.	
SDRA Faible	SDRA Modéré	SDRA Sévère
Infiltrats bilatéraux	Infiltrats bilatéraux	Infiltrats \geq 3/4 poumon
$200 < PaO_2/FiO_2 \leq 300$ mm Hg	$100 < PaO_2/FiO_2 \leq 200$ mm Hg	$PaO_2/FiO_2 \leq 100$ mm Hg
PEEP \geq 5 cm H ₂ O	PEEP \geq 5 cm H ₂ O	PEEP \geq 5 cm H ₂ O

Tableau 3. Récapitulatif des éléments définissant le SDRA selon le consensus d'experts réunis en 2011 à Berlin

II. 1.3 Dommages alvéolaires et protection

Les cliniciens ont très vite compris que les problèmes majeurs à l'échelle alvéolaire sont dus à une détérioration structurelle des composantes de la barrière alvéolo-capillaire (Bachofen and Weibel 1977). Sur la Figure 1 on remarque l'état de la barrière dans la phase aiguë de l'ALI/SDRA. Les cellules épithéliales ne tapissent plus l'alvéole, la lame basale est dénudée, les cellules endothéliales présentent des anomalies morphologiques (gonflement cellulaire) alors qu'elles devaient être aplaties. Dans ces conditions d'extrême perméabilité le fluide et les cellules circulantes vont passer dans l'espace alvéolaire.

Étude bibliographique

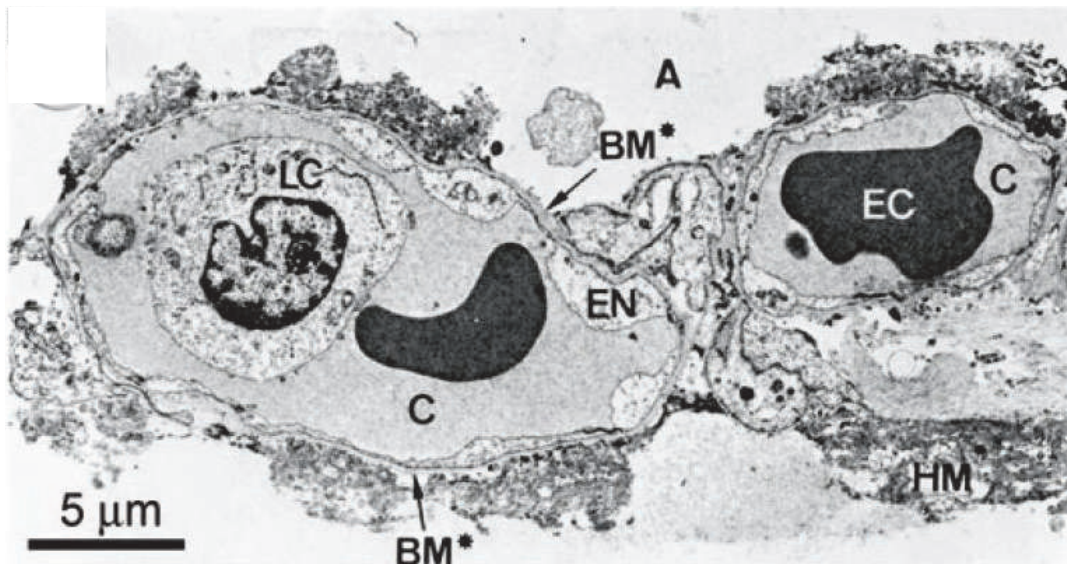


Figure 1. Coupe en microscopie électronique d'un poumon endommagé durant l'ALI/ARDS.

A indique l'espace alvéolaire ; C indique le capillaire sanguin ; BM* indique les endroits dénudés de la matrice ; LC indique un leucocyte ; EC indique un érythrocyte et EN indique une cellule endothéliale endommagée. D'après (Bachofen and Weibel 1977).

Lorsque l'on compare une situation alvéolaire normale et endommagée (Figure 2), on remarque les différences physiques majeures, à savoir la perte des contacts entre les cellules et leur détachement, la formation d'un œdème généralisé et la présence de cellules du compartiment sanguin dans l'espace alvéolaire. Ces cellules déclenchent une cascade de phénomènes inflammatoires avec la synthèse de nombreuses cytokines (IL1, IL6, IL8, IL10, TNF- α) qui vont attirer de nouvelles cellules inflammatoires et activer les neutrophiles.

Étude bibliographique

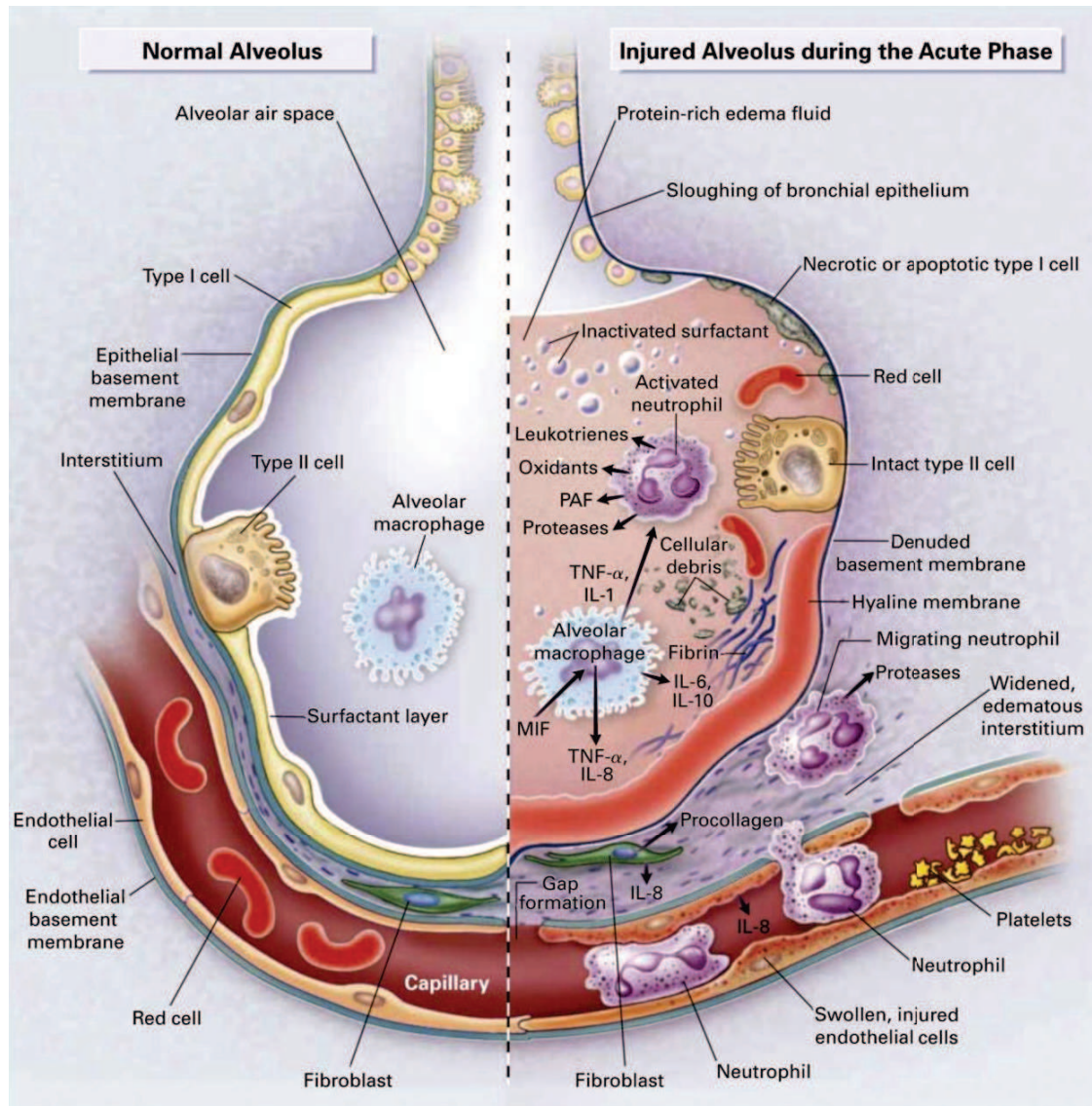


Figure 2. Schématisation d'une alvéole normale (gauche) et d'une alvéole endommagée dans l'ALI/SDRA (à droite).

Dans la phase aiguë on note un détachement des cellules épithéliales qui laissent à nu la lame basale, de plus la couche de surfactant est détruite. Les cellules endothéliales sont endommagées et perdent leurs contacts intercellulaires, on a alors une augmentation de la perméabilité et la formation d'un œdème généralisé ainsi qu'un passage des cellules circulantes dans l'espace alvéolaire. Les cellules produisent des cytokines (IL1, IL6, IL8, IL10, TNF- α) qui vont attirer de nouveaux neutrophiles et les activer. Les fibroblastes vont coloniser l'espace interstitiel et produire de nouveaux éléments matriciels. D'après (Ware and Matthay 2000).

L'un des mécanismes de protection possible de la barrière alvéolo-capillaire est de réduire les contraintes qu'elle subit. Lors de la ventilation mécanique cela passe par la réduction du volume inspiratoire ou volume courant.

Étude bibliographique

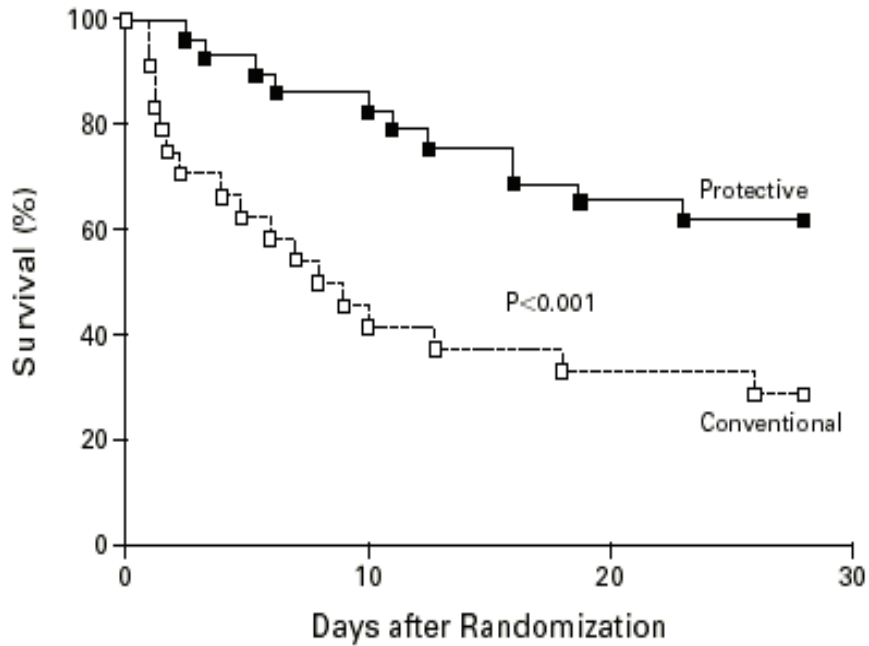


Figure 3. Effets d'une ventilation protectrice sur le taux de survie des patients présentant un SDRA.
Le taux de survie sous ventilation conventionnelle est indiqué par les carrés noirs, le taux de survie sous ventilation protectrice est indiqué par les carrés blancs. D'après (Amato, Barbas et al. 1998)

Sur la Figure 3, la courbe de survie en fonction du temps tracée pour les deux modes de ventilation mécanique; « protecteur » à bas volume courant et « conventionnel » à haut volume courant (Amato, Barbas et al. 1998) fait apparaître le gain en terme de survie d'un mode ventilation protecteur des lésions induites par des contraintes mécaniques excessives. Selon les défenseurs du mode protecteur, un taux de mortalité minimum est attendu pour des volumes courants intermédiaires c'est-à-dire ni trop bas pour garantir des échanges gazeux suffisants pour la survie du patient, ni trop élevés pour éviter les surdistensions alvéolaires génératrices de traumatismes alvéolaires (Figure 4) (Eichacker, Gerstenberger et al. 2002).

Étude bibliographique

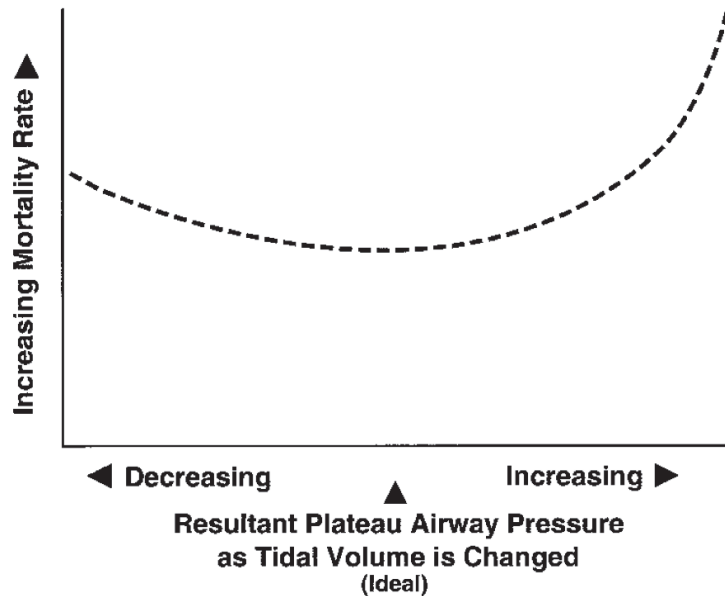


Figure 4. Modèle avancé de la relation entre le volume courant et le plateau de mortalité résultant de la variation du volume courant.

Lorsque l'on diminue de plus en plus le volume courant (Tidal volume) la mortalité augmente, si l'on augmente trop le volume courant la mortalité augmente aussi. Il y a une phase de plateau idéale à utiliser pour le réglage du volume courant des respirateurs. D'après (Eichacker, Gerstenberger et al. 2002)

Cette recherche d'un stress supportable par les alvéoles a conduit les auteurs à poser le problème au niveau cellulaire et moléculaire (Dos Santos and Slutsky 2000). Le caractère éventuellement agressif de la ventilation mécanique est forcément ressenti à l'échelle cellulaire voire moléculaire en raison des voies de mécanotransduction existant dans le poumon (Schumacker 2002, Uhlig 2002). Or les cellules sont sensibles aux contraintes mécaniques et s'adaptent en activant des voies de signalisation qui permettent de transmettre l'information jusqu'au noyau cellulaire, générant ou modifiant la réponse cellulaire notamment lors d'agressions répétées comme celles induites par une ventilation mécanique non adaptée. L'idée d'altérations cellulaires induites par les surdistensions et les contraintes excessives associées à la ventilation mécanique des patients SDRA est devenue une idée relativement bien admise (Vlahakis and Hubmayr 2005) mais peu d'études ont permis de donner des indications claires au clinicien. Les mécanismes proposés comme la rupture de la membrane plasmique des cellules épithéliales alvéolaires (Vlahakis and Hubmayr 2000), les distorsions voire ruptures des fibres de collagène IV en réponse aux contraintes excessives de la barrière alveolo-capillaire (West 2000) constituent des mécanismes possibles qui méritent encore d'être validés par l'expérience. Ces réflexions présentes dans la littérature se situent au cœur de la motivation de ce travail de thèse.

II. 2 Voies péri/extra-cellulaires de l'endothélium pulmonaire normal et agressé et ses conséquences sur la perméabilité.

L'endothélium vasculaire pulmonaire offre une surface d'échange de plus de 100 m², par laquelle transite la totalité du débit cardiaque. Les capillaires pulmonaires représentent la majorité des vaisseaux pulmonaires. Les cellules endothéliales qui les composent représentent environ 40% des cellules pulmonaires. Leur intégrité tant structurale que fonctionnelle est capitale pour garantir l'homéostasie pulmonaire c'est à dire une stabilité de fonctionnement en dépit des contraintes extérieures. L'endothélium vasculaire pulmonaire est un composant majeur de la barrière alvéolo-capillaire. Sa capacité à répondre aux agressions (chimiques, mécaniques, microbiologiques) conditionne l'état du poumon. La structure de cette barrière est en soi un défi pour les bioingénieurs et les médecins puisque sur la moitié de la surface d'échange, l'épaisseur ne dépasse pas 0,2-0,3 µm pour permettre une diffusion gazeuse suffisante (West 2000). Les limites de la capacité d'échange sont atteintes dans certaines situations physiologiques exceptionnelles comme l'exercice physique maximal qui nécessiterait une barrière encore plus fine. Une telle augmentation des capacités de diffusion se ferait au prix d'une fragilisation de la paroi et de risques accrus de rupture. La barrière elle-même étant constituée au minimum de 3 couches (Figure 5) : l'endothélium (versant capillaire), l'épithélium (versant alvéolaire), une matrice extracellulaire (MEC) appelée lame basale étant insérée entre les deux. C'est cette lame basale constituée notamment de collagène IV et de laminine, qui apporte la plus grande capacité de résistance à la déformation de la barrière puisqu'elle résiste plus longtemps à la rupture que les couches cellulaires (Tsukimoto, Mathieu-Costello et al. 1991).

Étude bibliographique

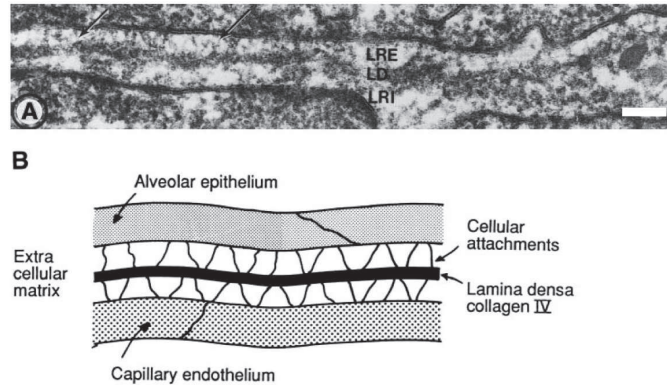


Figure 5. Ultrastructure de la partie fine de la barrière alvéolo-capillaire chez le rat.

A) Vue en microscopie électronique où l'on voit une partie des cellules épithéliales en haut et des cellules endothéliales en bas. La lame basale est constituée d'une lame centrale dense d'une épaisseur de 50 nm environ, constituée de collagène IV et deux lames externe (LRE) et interne (LRI) sur lesquelles s'attachent les cellules. Barre d'échelle = 0,1µm. B) Schématisation de l'attachement des cellules épithéliales et endothéliales sur la matrice extra cellulaire. D'après (West 2000).

Les rares mesures de résistance à la rupture indiquent des valeurs de 2×10^6 N/m pas très différentes du très résistant collagène I (Stromberg and Wiederhielm 1969). L'hyperinflation pulmonaire, telle que rencontrée dans le VILI associé au SDRA, est une cause pathologique très importante de rupture des capillaires pulmonaires (Figure 6) (West 2000). L'hyperinflation pulmonaire est connue depuis longtemps pour augmenter la perméabilité des capillaires pulmonaires (Parker, Townsley et al. 1984, Dreyfuss, Basset et al. 1985, Kolobow, Moretti et al. 1987, Carlton, Cummings et al. 1990). Ceci constitue un sérieux problème en réanimation où des niveaux élevés de PEEP sont utilisés pour maintenir une pression partielle d'oxygène satisfaisante. En fait, toute augmentation de tension dans la paroi alvéolaire causée par des niveaux élevés d'inflation pulmonaire, va être transmise aux capillaires situés dans la paroi alvéolaire et en retour entraîner des lésions dans les couches cellulaires endothéliales et épithéliales.

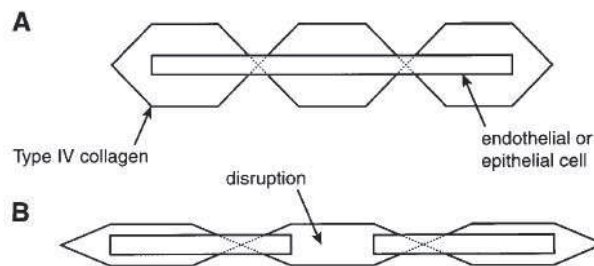


Figure 6. Mécanisme possible montrant comment un excès de tension dans la matrice de collagène de type IV peut causer la rupture des couches épithéliales et endothéliales de la barrière alvéolo-capillaire. A) Situation à pression capillaire normale. B) Situation à pression capillaire élevée entraînant un étirement excessif de la lame centrale. D'après (West 2000).

Étude bibliographique

A l'instar des résultats récemment obtenus sur l'homme en ce qui concerne la baisse de mortalité induite par les petits volumes courants de ventilation mécanique (Network 2000), des résultats antérieurs obtenus chez l'animal ont montré qu'une augmentation du volume pulmonaire d'un niveau normal à élevé va entraîner une très grande augmentation des ruptures des couches cellulaires endothéliales capillaires et épithéliales alvéolaires (Fu, Costello et al. 1992). L'équilibre fragile entre l'extrême finesse de la barrière alvéolo-capillaire et le maintien de son intégrité dans une grande variété de conditions physiologiques et mécaniques est possible grâce à un remaniement permanent de la structure qui serait contrôlé à un certain niveau par la tension dans les parois capillaires. Ce remaniement contrôlé par la signalisation mécano-chimique (appelée mécanotransduction) est appelé remodelage (West 2000). De façon surprenante, le remodelage des capillaires pulmonaires a été très peu étudié. Il est apparu néanmoins que dans le processus de remodelage de la paroi alvéolo-capillaire, notamment dans le cas d'épaississement de la lame basale, les cellules endothéliales jouent un rôle prédominant (Tozzi, Poiani et al. 1989). Les cellules endothéliales sont reconnues pour jouer un rôle fondamental pour maintenir l'intégrité de la barrière endothéliale mais aussi dans les processus physiopathologiques d'altération de cette barrière conduisant à l'œdème pulmonaire lésionnel (Liu, Tanswell et al. 1999, Orfanos, Mavrommati et al. 2004).

Les conséquences moléculaires d'une augmentation de la tension dans les parois des capillaires pulmonaires ne sont pas faciles à étudier *in vivo*. Il faut soit augmenter la pression transmurale (intraluminale - extraluminale) dans les capillaires soit augmenter le niveau d'inflation pulmonaire. Ainsi, des niveaux élevés d'inflation pulmonaire imposés pendant 4 heures chez les lapins ventilés ont montré une augmentation des expressions géniques pour les procollagènes $\alpha 1$ et $\alpha 2$, la fibronectine, les facteurs de croissance des fibroblastes et le facteur de transformation $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) alors que les niveaux de mRNA pour le procollagène $\alpha 1$ et le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) étaient inchangés (Berg, Fu et al. 1997). Une augmentation de la pression transmurale dans les capillaires de poumons excisés isolés de rats a montré des augmentations de l'expression de procollagène $\alpha 1$ et $\alpha 3$, de fibronectine, laminine et TGF- $\beta 1$ (Parker, Breen et al. 1997). En plus de la réponse aux contraintes mécaniques, l'endothélium des capillaires pulmonaires assure une fonction de barrière et de défense contre les agressions de tous types dans lesquelles les endotoxines, les cytokines pro-inflammatoires, les enzymes protéolytiques leucocytaires, les dérivés

Étude bibliographique

réactifs de l'oxygène et de l'azote, les complexes immuns, les agents infectieux, l'ischémie-reperfusion, le stress mécanique, l'hyperoxie jouent un rôle important (Orfanos, Mavrommati et al. 2004). L'endothélium vasculaire pulmonaire joue un rôle déterminant dans la formation de l'œdème et dans la réponse inflammatoire qui implique le recrutement leucocytaire contrôlé par l'expression des sélectines. Les cellules endothéliales sont activées et altérées précocement au cours du SDRA (Pober and Sessa 2007),(Cirino, Napoli et al. 2000) . Elles synthétisent des cytokines et des chimiokines telle que l'IL-8, et perdent leur pouvoir anticoagulant par expression du facteur de Von Willebrand.

La voie principale de passage au travers de la barrière endothéliale pour les fluides, les solutés (comme les protéines plasmatiques), les cellules de l'immunité (comme les leucocytes), se situe au niveau de la jonction entre les membranes de deux ou trois cellules. Cette voie intercellulaire ou paracellulaire est la voie privilégiée pour la perméabilité endothéliale.

La perméabilité de l'endothélium dépend de plusieurs éléments (macro)moléculaires qui assurent des fonctions précises et interagissent entre eux afin de préserver l'intégrité de la barrière. Les principaux étant :

- (i) Les liaisons ou jonctions intercellulaires, cruciales pour la stabilité et la continuité de la monocouche cellulaire (voir paragraphe II. 2.1),
- (ii) le glycocalyx constitué des chaînes oligosaccharidiques des lipides ainsi que des glycoprotéines transmembranaires (voir paragraphe II. 2.2),
- (iii) la matrice extra-cellulaire et les protéines de jonction cellule-matrice qui conditionnent l'adhérence cellulaire et l'ancrage de l'épithélium (voir paragraphe II. 2.3),
- (iv) les moteurs acto-myosines qui sont responsables de la tension intracellulaire et de l'adaptation cellulaire aux changements des conditions intra et extracellulaires (voir paragraphe II. 3.2.1).

Les fonctions remplies par ces différents éléments peuvent être modifiées dans le cas d'agressions microbiologiques, biochimiques ou physiques comme le choc septique, l'inflammation, le stress mécanique.

Étude bibliographique

II. 2.1 Jonctions intercellulaires

C'est dans les années 50 avec les travaux de Pappenheimer et Grotte (Pappenheimer, Renkin et al. 1951, Grotte 1956) qu'apparaît le modèle à pores de transport capillaire. Le concept décrit le transport transcapillaire comme une voie paracellulaire qui met en jeu des pores entre les cellules. Depuis la seconde conférence Alfred Benzon tenue en 1969 et les travaux présentés par Christian Crone et Niels A. Lassen on sait que l'ouverture de moins de 10% du périmètre cellulaire suffit pour expliquer la perméabilité observée dans les capillaires de différents organes tels le cœur, les poumons ou encore les muscles squelettiques (Trap-Jensen and Lassen 1970). Cette ouverture représente moins de 0,1% de la surface totale de l'endothélium (Michel and Curry 1999).

Les membranes cellulaires sont séparées par une distance de seulement 10 à 20 nm. Cette distance de séparation entre membranes est appelée fossé intercellulaire ou fente intercellulaire. Le rapprochement membranaire est aussi observé au niveau des jonctions d'adhésion (« adherens junctions » noté AJ) formées principalement par la VE-cadhérine, et soutenues par les α , β et γ caténines et surtout la structure du cytosquelette d'actine. Elles assurent la cohésion physique des cellules de l'endothélium et en contrôlant les contacts intercellulaires, régulent la voie paracellulaire de la perméabilité aux échelles cellulaire et tissulaire. Les molécules de type nectines jouent un rôle fondamental dans la reconnaissance des cellules partenaires et l'adhésion cellule-cellule initiale en coopération avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$ (voir Figure 7). Au niveau des jonctions occlusives (noté TJ pour « Tight junctions »), les membranes sont encore plus proches qu'au niveau des AJ. Il y a même l'apparence d'une fusion partielle des membranes de cellules adjacentes en ces points de contacts, mais à des agrandissements plus importants, les feuillettes de la membrane plasmique de chaque cellule restent bien distincts. Les jonctions sont scellées par un ensemble de 3 familles moléculaires : les Claudines, les occludines et les zona occludines (noté ZO). Au niveau des épithéliums, c'est la famille des Claudines qui est responsable de la perméabilité aux ions avec des TJ présentant des pores permettant le passage d'éléments jusqu'à 6 Å de diamètre (Spring 1998). Quant au rôle des occludines, il est encore discuté. Ces trois familles de protéines s'ancrent dans la membrane, et se rattachent au cytosquelette d'actine comme présenté dans la Figure 7. D'autres molécules d'adhésion

Étude bibliographique

la base des tissus conjonctifs a été assez peu étudiée alors qu'elle est fondamentale pour la mécanique cellulaire et tissulaire. Notamment, le rôle des forces mécaniques dans la formation et la maturation des jonctions intercellulaires est assez mal connu (Janmey and McCulloch 2007). De plus, la plupart des modèles de signalisation proposés ne prennent en compte que la composante cellule-MEC de l'adhésion et ne considèrent pas les couplages possibles avec la composante intercellulaire de l'adhésion qui se révèle par exemple dans les processus de migration-réparation des blessures d'une monocouche cellulaire (Planus, Galiacy et al. 1999). A l'évidence, les composantes cellule-MEC et intercellulaire de l'adhésion peuvent travailler ensemble de façon coopérative ou antagoniste contribuant à la formation et au maintien d'un système complexe propre à réguler la mécanique cellulaire. Dans différents types cellulaires, les jonctions intercellulaires "cadherine-dépendantes" ont été trouvées régulées par le système d'adhésion cellule-MEC qui est "intégrine-dépendant" (Clark 1994, Gimond, van Der Flier et al. 1999, Kawano, Katak et al. 2001, Marsden and DeSimone 2003). Ces travaux suggèrent fortement que les études cellulaires expérimentales et théoriques visant à décrire le comportement mécanique des cellules, doivent prendre en compte le dialogue croisé existant entre les différentes composantes de l'adhésion.

Quant à la caractérisation de la cinétique de l'adhésion intercellulaire, les modèles utilisés sont les mêmes que ceux développés pour l'adhésion cellule-MEC (Figure 8). La théorie la plus répandue de l'adhésion est celle proposée par Bell (Bell 1978) s'inscrit dans une approche thermodynamique dite déterministe ou "moyennée":

$$k_{off}(f) = k_{off}^0 \cdot \exp\left(\frac{f}{f_\beta}\right) \quad \text{avec} \quad \frac{k_B T}{x_\beta} = f_\beta \quad \text{Eq. I.1}$$

où f_β est une échelle de force définie à partir de l'énergie thermique $k_B T$ (k_B est la constante de Boltzman et T la température absolue), et de la distance de séparation du lien à partir de laquelle le lien devient instable et rompt (x_β est de l'ordre de 1 nm). k_{off}^0 est le taux de dissociation à force nulle et est défini à partir du niveau E_b d'énergie chimique intermoléculaire ou hauteur de la barrière énergétique avant application de la force (voir ci-dessous).

$$k_{off}^0 = \frac{1}{t_{off}^0} = \frac{1}{t_D} \cdot \exp\left(\frac{-E_b}{k_B T}\right) \quad \text{Eq. I.2.}$$

Étude bibliographique

Les mécanismes d'interaction moléculaire sont par essence dynamiques et impliquent des couplages complexes entre la biochimie cellulaire, la mécanique des structures polymériques du CSK et les ligands surfaciques (Evans and Calderwood 2007). Ces interactions s'opèrent au travers de liens multiples mettant en jeu des processus d'association/dissociation entre macromolécules contrôlés par la force (Evans and Williams 2002). Le laboratoire a récemment montré que la régulation par la force mécanique des liens multiples dépendait du caractère homogène ou hétérogène de sa distribution sur les liens individuels qui composent la structure d'adhésion et que tout en restant aléatoire dans son approche, la dissociation obéit à une loi de Bell généralisée de même forme que l'Eq. I.1 (Isabey, Fereol et al. 2013). L'utilisation de rampes linéaires de force permet de scruter la fonction probabilité de survie en fonction du temps ou de la force et d'aboutir à une définition du temps de vie ou de la force de rupture la plus probable, ces deux grandeurs étant d'ailleurs reliées.

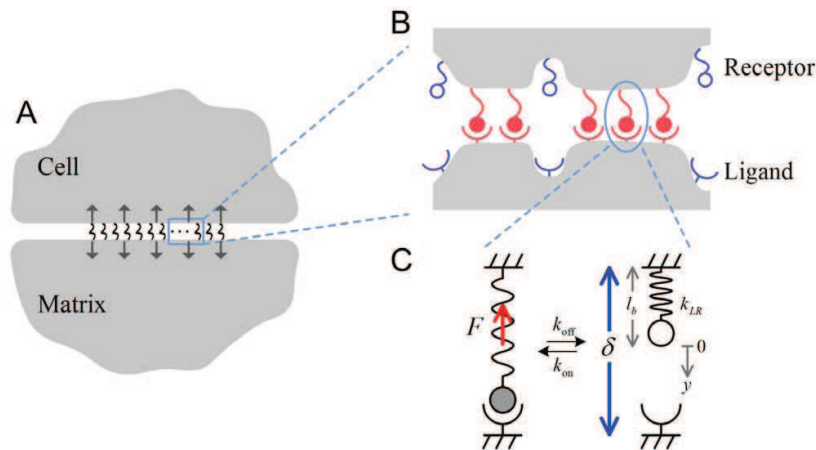


Figure 8. Un modèle stochastique et élastique des liens récepteur-ligand. D'après (Qian and Gao 2010)

Pour les récepteurs amenés à proximité de certains ligands (distance critique: l_{bind}), grâce, notamment, à une structure de type téther de raideur k_{LR} et de longueur au repos l_b le complexe se réassocie avec une fréquence donnée par k_{on} (Gao, Qian et al. 2011):

$$k_{on} = k_{on}^0 \frac{l_{bind}}{Z} \exp\left(-\frac{k_{LR}(\delta - l_b)^2}{2k_B T}\right) \quad \text{Eq. I.3}$$

où Z est la fonction de partition pour un récepteur confiné dans un potentiel harmonique situé entre $-l_b$ et $\delta - l_b$. k_{on}^0 est un taux de réassociation de référence observé quand les distances entre récepteur et ligand sont courtes et en tout cas inférieures à l_{bind} . Les valeurs

Étude bibliographique

typiques des ces paramètres sont : $k_{LR} = 0.25$ pN/nm, $l_{bind} = 1$ nm. La forme exponentielle de k_{on} montre que la fréquence de réassociation diminue très rapidement lorsque la distance de séparation entre les surfaces cellulaires en vis à vis ou celles entre cellule et substrat augmente (Erdmann and Schwarz 2007, Qian, Wang et al. 2008). Ceci nous amènera dans la suite de ce travail à négliger k_{on} dans les conditions expérimentales étudiées.

Dans une étude récente (Tsukasaki, Kitamura et al. 2007), la microscopie intermoléculaire (IFM) qui permet d'atteindre des niveaux de forces inférieurs au picoNewton a été utilisée pour caractériser les interactions moléculaires interindividuelles entre des nectines pairées et des cadhérines pairées. Les résultats indiquent que les domaines multiples de nectines se comportent de façon non-coopérative comme un système zipper (en fermeture éclair) alors que les cadhérines travaillent coopérativement comme un système parallèle dans lequel la force est distribuée uniformément entre les liens. Ces différences ultra-structurales entre les différents types de liens entre cellules conduisent à des régulations, par la force, différentes sur lesquelles nous reviendrons (Evans 2001, Isabey, Fereol et al. 2013).

D'une façon générale, les jonctions intercellulaires qu'elles soient de type AJ ou TJ confèrent aux cellules épithéliales et endothéliales une étonnante capacité à contrôler leur forme, leur polarité, la transcription et la prolifération cellulaires. Des fonctions essentielles comme le développement et la prolifération cellulaires supposent un contrôle précis des déplacements cellulaires dans les tissus dans lesquels la gestion des contacts cellule-cellule est essentielle. Dans ce contexte, le cytosquelette d'actine auquel les TJ et AJ sont physiquement connectés et en interaction, apparaît comme l'interface structurelle et fonctionnelle permettant tout à la fois la régulation du mouvement cellulaire et celle du transport par la voie paracellulaire.

II. 2.1.1 Jonctions adhérentes

La continuité structurale de l'endothélium, sa fonction, sont assurés par les jonctions adhérentes (AJ) organisées autour de la VE-cadhérine, elle-même stabilisée par les caténines β ou γ , qui de manière exclusive l'une et l'autre, vont se lier au niveau de la queue cytoplasmique sur le domaine COOH terminal de la VE-cadhérine. L' α -caténine se lie alors à

Étude bibliographique

la sous-unité β ce qui ancre le complexe d'adhésion au réseau actinique sous-jacent (Figure 7) (Vandenbroucke, Mehta et al. 2008). Les molécules de type nectines et afadines sont constitutives des AJ des cellules endothéliales mais leur rôle dans la voie paracellulaire de la perméabilité est encore discuté (Miyoshi and Takai 2005).

II. 2.1.1.1 La VE-cadhérine

La VE-cadhérine fait partie de la classe II (ou type II) des cadhérines atypiques (VE-cadhérine, K-cadhérine) et ne partage que 23% d'homologie avec les cadhérines de classe I (N-cadhérine, E-cadhérine, P-cadhérine et M-cadhérine). Les cadhérines possèdent 5 domaines extracellulaires répétés (notés EC1 à EC5), un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique (Takeichi 1990). L'ectodomaine des cadhérines de type II présente un domaine spécifique EC1 qui est responsable de la liaison homophile de cette classe de cadhérines, (voir la Figure 9 d'après Patel et coll. (Patel, Ciatto et al. 2006)). L'établissement de la liaison homophile entre deux molécules de VE-cadhérine nécessite la présence de deux résidus tryptophane en position 2 et 4 dans la région N terminale de la molécule (May, Doody et al. 2005).

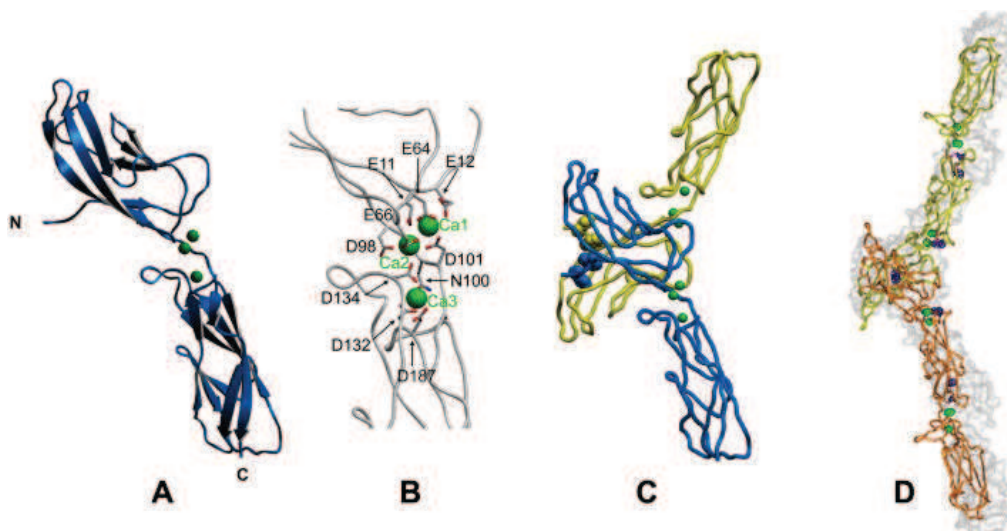


Figure 9. Ectodomaines d'interaction des cadhérines de type II.

(A) Représentation des domaines EC1 et EC2 de la cadhérine-11. (B) Interdomaine de liaison au calcium (en vert), similaire aux cadhérines de type I. Les acides aminés (acide) pouvant lier le Ca^{2+} sont représentés avec leur position respective, ainsi que l'asparagine en position 100 (D : Acide aspartique ; E : Acide glutamique ; N : Asparagine). (C) Représentation cristallographique de deux protomères liés en brin par une liaison *trans* comme les cadhérines de type I. (D) Superposition des domaines EC1-EC3 de la cadhérine-8 avec les régions analogues des cadhérines de type I (C-cadhérine représentée en gris). Les sites de sélénométhionine (en violet) sont concordants avec les sites des méthionines sur le modèle moléculaire validant la structure. D'après (Patel, Ciatto et al. 2006).

Étude bibliographique

Les ectodomains de la VE-cadhérine adoptent une configuration en brins de 20 nm de longueur. La liaison ne peut exister qu'en présence de Ca^{2+} en concentration équivalente à la concentration calcique extracellulaire 1,2 mM. La mesure de la cinétique des liens moléculaires entre cadhérines montre finalement une affinité relativement faible avec une constante d'association k_{on} par lien d'environ 10^4 s^{-1} par mole très inférieure à celle des liens entre selectine et PSGL-1 qui caractérisent les interactions entre cellules endothéliales et leucocytes alors que la constante de dissociation de $k_{\text{off}}=1,8 \text{ s}^{-1}$ est proche de celle des leucocytes (Baumgartner, Hinterdorfer et al. 2000). Les forces de rupture mesurées en microscopie à force atomique (AFM) se situent entre 35 et 55 pN pour une liaison homophilique avec une vitesse de rétraction de la pointe AFM comprise entre 200 et 4000 nm s^{-1} ce qui peut être considéré comme relativement faible comparé à celle de l'albumine et de son antigène qui atteint 245 pN à 200 nm s^{-1} (Hinterdorfer, Baumgartner et al. 1996) ou encore celle mesurée entre la P-sélectine et son ligand PSGL-1 qui atteint 159 pN à 2,800 nm s^{-1} (Fritz, Katopodis et al. 1998). La faible affinité des liaisons entre VE-cadhérines laisse à penser que celles-ci interviennent dans une dynamique de remodelage et permettent une réponse rapide. C'est ce type de liaison « faible » qui facilite le passage des leucocytes au travers de l'endothélium lors de l'extravasation. Ces forces de liaison indiquent que pour avoir une liaison *trans* effective et lier les cellules entre elles, la VE-cadhérine doit se regrouper en clusters, ce qui concorde avec la capacité de la VE-cadhérine à établir des liaisons en *cis* pour former des dimères. Cela a été démontré pour les fragments EC1-EC4 en solution contenant du Ca^{2+} , ces fragments vont alors former un hexamère d'une longueur comparable avec la largeur des liaisons adhérentes (Legrand, Bibert et al. 2001). Cependant la seule présence de clusters de VE-cadhérine ne peut assurer le maintien des liaisons intercellulaires. La stabilité des liaisons est assurée par l'ancrage au cytosquelette d'actine qui empêche le mouvement des molécules de VE-cadhérine au sein de la membrane cellulaire.

II. 2.1.1.2 Les protéines de liaison de la VE-cadhérine

La partie C terminale de la VE-cadhérine interagit avec les caténines (α , β , γ), ainsi que p120 (Figure 7 et Figure 10). Les complexes VE-cadhérine-caténine sont connectés au cytosquelette d'actine via la α -caténine même si cette liaison apparaît aujourd'hui plus

Étude bibliographique

complexe que supposé initialement en raison de la présence d'une molécule de liaison supplémentaire (Abe and Takeichi 2008). L' α -caténine se lie à la β -caténine et ancre le complexe de l'AJ au cytosquelette d'actine (Rimm, Koslov et al. 1995), cependant d'autres rôles lui sont maintenant attribués comme la liaison à l' α -actinine qui participe à la génération de force entre le complexe d'AJ et le cytosquelette. L' α -caténine inhibe la polymérisation de l'actine en inhibant le complexe Arp2/3 (Frank, Hopmann et al. 2006), permettant ainsi la régulation de la concentration actinique à la membrane. La liaison avec la β -caténine implique les 100 derniers résidus de la queue cytoplasmique de la VE-cadhérine et masque le domaine PEST reconnu par les ubiquitines ligases ce qui empêche sa dégradation par le protéasome (Huber, Stewart et al. 2001). En altérant l'interaction entre α -caténine et β -caténine avec un peptide, une augmentation de perméabilité a été observée dans la monocouche endothéliale (van Buul, van Alphen et al. 2009). La γ -caténine (aussi nommée plakoglobine) se lie à la même région mais elle ne peut empêcher la protéolyse de la VE-cadhérine en l'absence de la β -caténine entraînant une destruction des AJ (Cattelino, Liebner et al. 2003). La surexpression de la γ -caténine stimule la croissance cellulaire dans les cellules dermales microvasculaires humaines (noté HMEC-1) (Venkiteswaran, Xiao et al. 2002). On suppose qu'au niveau basal, la plakoglobine joue un rôle dans la stabilisation des jonctions car son inhibition va entraîner la déstabilisation des jonctions adhérentes lorsque les cellules sont soumises à un flux laminaire générant des forces de cisaillement (Schnittler, Puschel et al. 1997). De plus la γ -caténine recrute au niveau des AJ la desmoplakine dont la partie C-terminale peut lier des éléments des filaments intermédiaires comme la vimentine. L'association de p120 au niveau sous membranaire avec la VE-cadhérine permet de la stabiliser cette dernière au niveau de la surface cellulaire et d'inhiber sa recapture lors de l'endocytose (Davis, Ireton et al. 2003, Xiao, Garner et al. 2005). p120 va recruter la GTPase activatrice (noté GAP) et p190RhoGAP qui vont permettre l'hydrolyse de RhoA et empêchant l'action de ROCK1 stabilisant ainsi le cytosquelette d'actine. Le cytosquelette est aussi stabilisé par l'action de la β -caténine qui s'associe aux GTPases activatrices de IQRas (noté IQGAP1) qui régulent l'activité de Rac1 et Cdc42 (Hart, Callow et al. 1996, Brown and Sacks 2006).

Étude bibliographique

II. 2.1.1.3 Régulation de VE-cadhérine par phosphorylation/déphosphorylation

Une grande partie des phénomènes de régulation mettent en jeu un équilibre entre phosphorylation et déphosphorylation au niveau de la β -caténine et au niveau de la VE-cadhérine (Bianchi, Sellke et al. 1999, Nawroth, Poell et al. 2002, Lilien and Balsamo 2005, Wallez, Vilgrain et al. 2006). Une idée largement admise est que la phosphorylation du complexe VE-cadherine induit un découplage avec le cytosquelette d'actine par la dissociation des caténines avec les cadhérines. La Figure 10 (Dejana, Orsenigo et al. 2008) résume les principaux points de phosphorylation de la VE-cadhérine et leur impact sur les phénomènes d'extravasation, de régulation de la prolifération par les facteurs de croissance (tel le VEGF), de dégradation, de liaison au cytosquelette et à certaines protéines de soutien des AJ comme la β -caténine et p120. Ainsi, la phosphorylation de la VE-cadhérine sur les résidus tyrosine (noté Y ou Tyr) en position 645, 731 et 733 augmente l'extravasation leucocytaire (Turowski, Martinelli et al. 2008) et va modifier la régulation de la perméabilité vasculaire (Esser, Lampugnani et al. 1998, Angelini, Hyun et al. 2006). La phosphorylation de la VE-cadhérine sur Y658 et Y731 empêchent respectivement l'établissement des liaisons VE-cadhérine/p120 et VE-cadhérine/ β -caténine (Potter, Barbero et al. 2005). La phosphorylation de Y665 par la Kinase activée par P21 (noté PAK) va promouvoir la liaison de la VE-cadhérine avec la β -arrestine, le complexe formé est alors internalisé au niveau des puits de clathrine pour être dégradé dans les lysosomes (Gavard and Gutkind 2006). La phosphorylation en Y685 (Baumeister, Funke et al. 2005) recrute la kinase-c-terminale inhibitrice de Src (noté Csk pour « c-terminal Src Kinase ») ce qui tend à inhiber l'action proliférative du VEGF.

Étude bibliographique

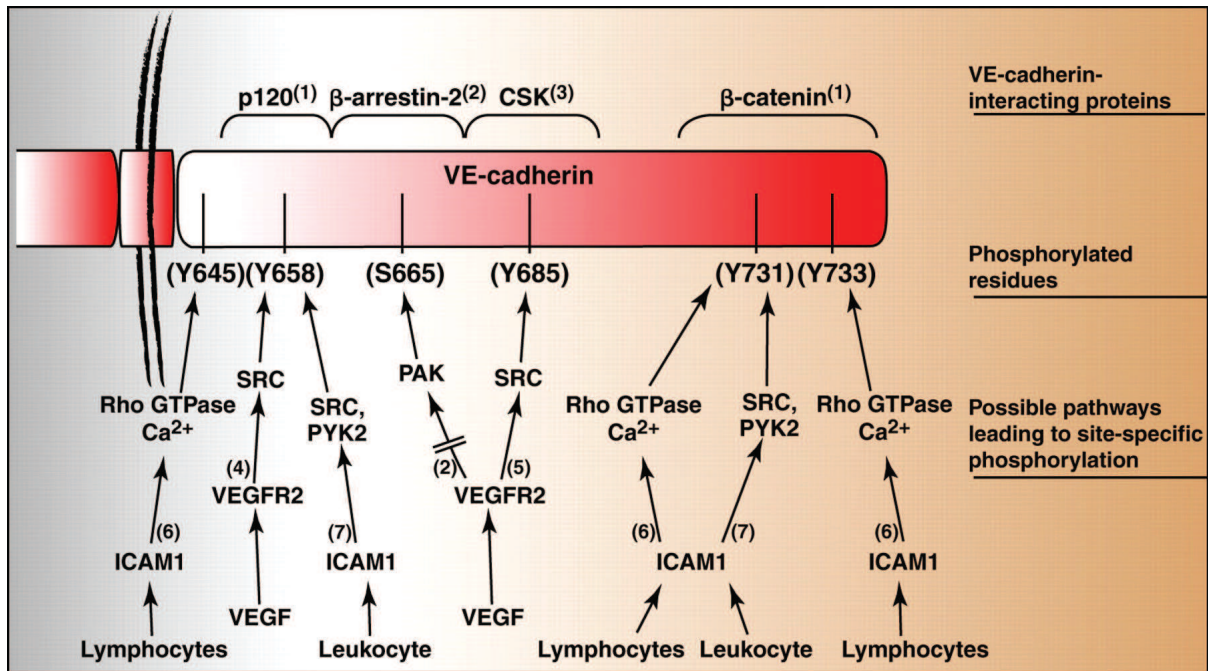


Figure 10. Schéma de la queue cytoplasmique de la VE-cadhérine et de ses sites de phosphorylation.

Les différents sites de phosphorylation sont indiqués par une lettre correspondant à la tyrosine (Y), la sérine (S) et un nombre indiquant leur emplacement dans la chaîne d'acides aminés. La phosphorylation en Y645 intervient dans le passage transendothélial des leucocytes. La phosphorylation en Y658 inhibe la liaison de p120 à la VE-cadhérine, de même pour Y731 sur la β-caténine. La phosphorylation de S665 promeut l'interaction de la β-arrestine avec la VE-cadhérine ce qui va permettre son internalisation et sa dégradation. La phosphorylation de Y685 est impliquée dans l'interaction du complexe avec le cytosquelette dans les phénomènes de migration et de multiplication cellulaire.

Lorsqu'il est perturbé par des phosphorylation/déphosphorylations, le complexe d'adhésion laisse libre les protéines qui lui sont associées. La VE-cadhérine est alors vulnérable à la protéolyse, ce qui a pour conséquence de déstabiliser les AJ et d'augmenter directement la perméabilité. Les autres protéines du complexe comme l'α-caténine, la β-caténine peuvent à leur tour se lier aux protéines des TJ et modifier la perméabilité de celles-ci.

Un exemple de régulation des TJ par la VE-cadhérine est la régulation de l'expression de la Claudine 5 par la VE-cadhérine décrite comme suit (Taddei, Giampietro et al. 2008) : si il n'y a pas de liaison homophile des VE-cadhérines, la β-caténine est libre et forme avec le complexe FoxO1-β-caténine-Tcf-4 qui va se lier au promoteur de la Claudine 5 et inhiber son expression. Lors de l'établissement de contact entre des cellules adjacentes la dimérisation de la VE-Cadhérine va entraîner plusieurs phénomènes : tout d'abord la β-caténine va être séquestrée au niveau de la VE-cadhérine et ne pourra pas former de complexe avec FoxO1, ensuite la VE-cadhérine va activer la phosphatidylinositol kinase 3

Étude bibliographique

(noté PI3K) (Carmeliet, Lampugnani et al. 1999) qui va phosphoryler la serine/théonine kinase Akt qui à son tour va inhiber FoxO1 permettant ainsi l'expression de la Claudine-5 (voir Figure 11).

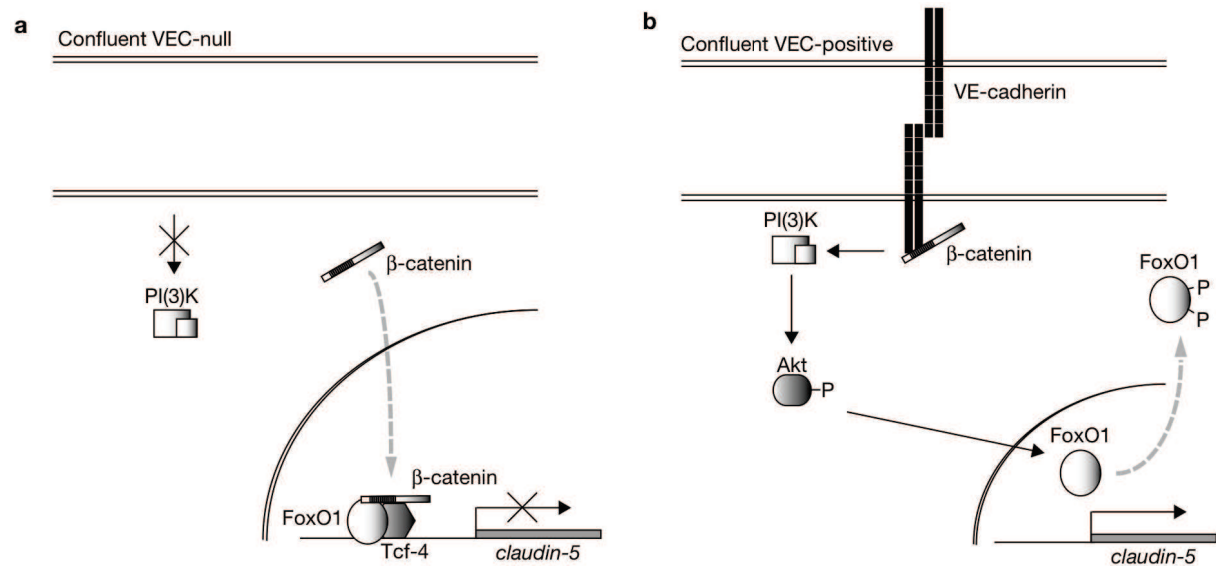


Figure 11. Modèle suggéré pour la régulation de l'expression de la Claudine 5 par la VE-cadhérine.

(a) En l'absence de liaisons homophiles de VE-cadhérine, le complexe FoxO1-β-caténine-Tcf-4 va se lier au promoteur du gène codant pour la Claudine 5 et empêche son expression. (b) Lorsqu'il y a une liaison homophile de VE-cadhérine, FoxO1 est inhibé par Akt et la β-caténine reste à la membrane au niveau de la VE-cadhérine. Cela empêche le complexe de se fixer au promoteur de la Claudine 5 et permet son expression.

II. 2.1.2 Jonctions occlusives et constituants

Les jonctions occlusives (notées TJ pour « tight junctions ») ont été définies comme les points de convergence, voire pour certains observateurs de fusion, des couches externes de la membrane lipidique de cellules adjacentes (voir Figure 7). Tout comme pour la VE-cadhérine, tout changement dans l'état de phosphorylation des molécules des jonctions occlusives décrites ci-dessous (claudines, occludines, ZO...) va entraîner des changements conformationnels qui vont altérer la perméabilité des TJ (Miyoshi and Takai 2005).

II. 2.1.2.1 Les claudines

Les TJ reposent sur l'association homophile des domaines extracellulaires de molécules transmembranaires de la famille des Claudines. Celles-ci sont constituées de vingt-quatre membres possédant chacun quatre domaines transmembranaires et deux

Étude bibliographique

domaines cytoplasmiques (Morita, Furuse et al. 1999). L'idée selon laquelle les Claudines sont les pièces maîtresses dans la construction des TJ a pour origine l'observation selon laquelle, dans des fibroblastes privés de TJ, les Claudines 1 et 2 exprimées se localisent sur les sites de contact cellule-cellule et reconstituent des structures qui ressemblent aux TJ décrites dans les cellules épithéliales et endothéliales (Furuse, Sasaki et al. 1998). Des souris « knock out » (KO) pour la Claudine 5 meurent dans les 24 heures après la naissance. La cause de la mort est due à une sélectivité amoindrie au niveau de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et non pas à une malformation des vaisseaux pulmonaires, d'autant que la morphologie de ces derniers n'est pas altérée. La Claudine 3 est probablement responsable de la mise en place physique de la barrière alors que la Claudine 5 est responsable en partie de l'intégrité de celle-ci, ces différentes molécules fonctionnent donc en tandem au niveau de la BHE. Les souris KO Claudine 5 ne sont pas privées de TJ mais présentent une augmentation sélective de la perméabilité de la voie paracellulaire permettant la diffusion de traceurs dont la taille ne dépasse pas 800 Dalton (Da) (Nitta, Hata et al. 2003).

II. 2.1.2.2 Les occludines

Le rôle des occludines dans le contrôle de la perméabilité par voie paracellulaire a été largement démontré pour les cellules épithéliales (Balda and Matter 2000). Ce résultat a été étendu à la perméabilité endothéliale (Miyoshi and Takai 2005). En effet, la phosphorylation du domaine cytoplasmique C-terminal des occludines jouerait un rôle dans le contrôle la perméabilité de l'endothélium (Hirase, Kawashima et al. 2001). Elles ne sont pas suffisantes à elles seules à former des TJ, cependant elles permettent d'établir des débuts de clusters jonctionnels entre deux cellules adjacentes. Les occludines peuvent se lier aux Claudines et on soupçonne que leur rôle est de réguler la perméabilité au niveau des TJ (Hirase, Staddon et al. 1997), mais les données sont peu nombreuses et les voies de régulations sont débattues car l'absence des occludines chez les souris KO ne semble pas augmenter la perméabilité de la BHE. Le rôle des occludines dans la perméabilité est confirmé par la corrélation existant entre leur niveau d'expression dans les cellules endothéliales (très élevé dans le cerveau comparé aux autres tissus) et le niveau de la perméabilité admises par les

Étude bibliographique

différents tissus (très faible pour la BHE comparé aux autres tissus) (Hirase, Staddon et al. 1997).

II. 2.1.2.3 Les zona occludines acteurs de l'ancrage des claudines

Comme on peut le voir sur la Figure 7, les zona occludines (ZO) ancrent les TJ au cytosquelette d'actine et principalement ZO-1 (Itoh, Nagafuchi et al. 1993). Trois principaux types de ZO ont été identifiés ZO-1, ZO-2 et ZO-3. Elles font partie de la famille guanylate kinase associée à la membrane (noté MAGUK). En liant les claudines transmembranaires au cytosquelette d'actine, elles permettent la stabilisation du complexe dans l'espace membranaire (Bazzoni and Dejana 2004, Dejana, Tournier-Lasserre et al. 2009). La liaison se fait au niveau des acides aminés 358 à 504 de la Claudine et la région guanylate cyclase de ZO-1 (voir Figure 12). Comme on peut le voir ZO-1 possède plusieurs domaines PDZ (ou encore GLGF pour glycine-leucine-glycine-phenylalanine), Src homologue 3 (noté SH3) et GUK. C'est au niveau de ces domaines que ZO-1 peut fixer et recruter les Occludines, les JAM, ZO-2 et 3, d'autres régulateurs/promoteurs de la polymérisation d'actine comme VASP (pour Vasodilatator Stimulated Phosphoprotein), des protéines d'ancrage au cytosquelette d'actine comme l' α -caténine et des modulateurs du complexe d'ancrage (Bazzoni and Dejana 2004). Les domaines PDZ permettent de fixer les parties C-terminales de récepteurs comme le Récepteur-N-méthyl-D-Aspartate (noté NMDA) et de canaux ioniques afin d'assurer la polarisation cellulaire et la distribution spécifique des protéines (Kornau, Schenker et al. 1995, Huber, Sander et al. 1998, Harris and Lim 2001). En raison des nombreux domaines d'interactions présents sur les ZO, ces protéines se trouvent être les points de liaison de nombreux complexes protéiques. On leur attribue donc un rôle d'échafaudage protéique ou de protéines chaperonnes (Gonzalez-Mariscal, Betanzos et al. 2000). La stabilité et l'étanchéité sélective qui découlent de cette organisation protéique assurent une compartimentation des espaces membranaires et permettent de maintenir la polarisation cellulaire en maintenant la distribution asymétrique des glycoprotéines et des lipides entre le pôle apical et le pôle baso-latéral de la cellule.

Étude bibliographique

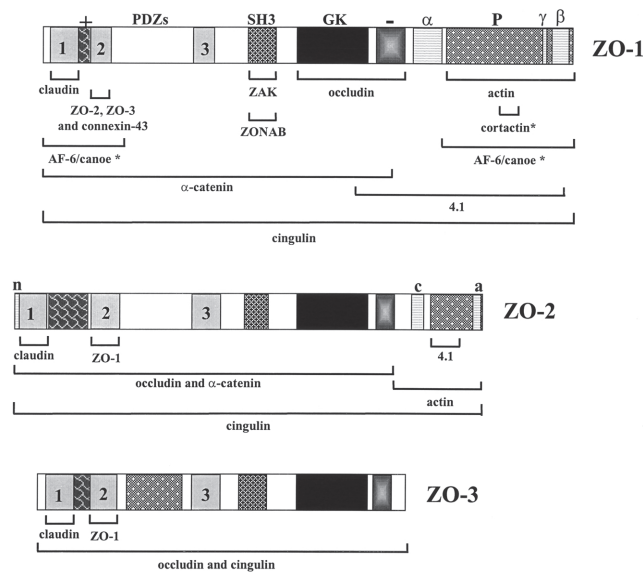


Figure 12. Domaines d'interaction des ZO et leurs protéines de liaison.

+ et – indiquent respectivement les domaines basique et acide ; 1,2,3 représentent les domaines PDZ ; SH3 est le domaine homologue à Src 3 ; GK est le domaine Guanylate Kinase ; α, β, γ sont les sites d'épissages alternatifs de ZO-1 ; P représente les domaines riches en proline. Les sites d'épissages alternatifs de ZO-2, normal, canin, et aviaire sont indiqués respectivement par les lettres n, c et a. D'après (Gonzalez-Mariscal, Betanzos et al. 2000).

II. 2.1.2.4 Les JAM ou « junction adhesion molecules »

Les JAM sont une famille de protéines devant jouer un rôle dans le contrôle de l'intégrité et de la perméabilité intercellulaire vasculaire (Aurrand-Lions, Johnson-Leger et al. 2001). Ce sont des glycoprotéines composées de deux boucles extracellulaires type immunoglobuline VH et C2. Les principales JAMs qui ont été étudiées sont: JAM-1 (JAM-A) présente dans les cellules épithéliales et endothéliales, JAM-2 (JAM-B) présente dans les réseaux lymphatiques, JAM-3 (JAM-C) présente exclusivement dans les cellules endothéliales. Elles sont classées dans la superfamille des immunoglobulines (Aurrand-Lions, Duncan et al. 2001, Aurrand-Lions, Johnson-Leger et al. 2001, Bazzoni 2003). Leur queue cytoplasmique présente un domaine PDZ comme les ZO et leur permet de recruter différentes molécules au sein du complexe TJ (Ebnet, Schulz et al. 2000). Les JAMs peuvent lier Cdc42, la PKC, ainsi que PAR6 (pour « Partitioning defective protein » 6). JAM-1 et JAM-2 jouent un rôle dans la régulation de la perméabilité par voie paracellulaire, ce qui suggère qu'elles participent à la régulation des fonctions vasculaires *in vivo* (Liang, DeMarco et al. 2000, Aurrand-Lions, Johnson-Leger et al. 2001).

II. 2.2 Glycocalyx

De nombreuses études sur les cellules épithéliales utilisent la mesure de la résistance électrique comme un marqueur précis de la perméabilité. Cette technique bien que souvent transposée aux mesures sur des cellules endothéliales n'est pas nécessairement un bon indicateur des changements de perméabilité de l'endothélium. En effet la résistance à la diffusion paracellulaire peut être compensée par une diffusion transcellulaire. De plus, d'autres éléments tel le glycocalyx interviennent dans la perméabilité endothéliale en modulant la diffusion de macromolécules au niveau intercellulaire sans pour autant influencer sur les mesures de résistance électrique.

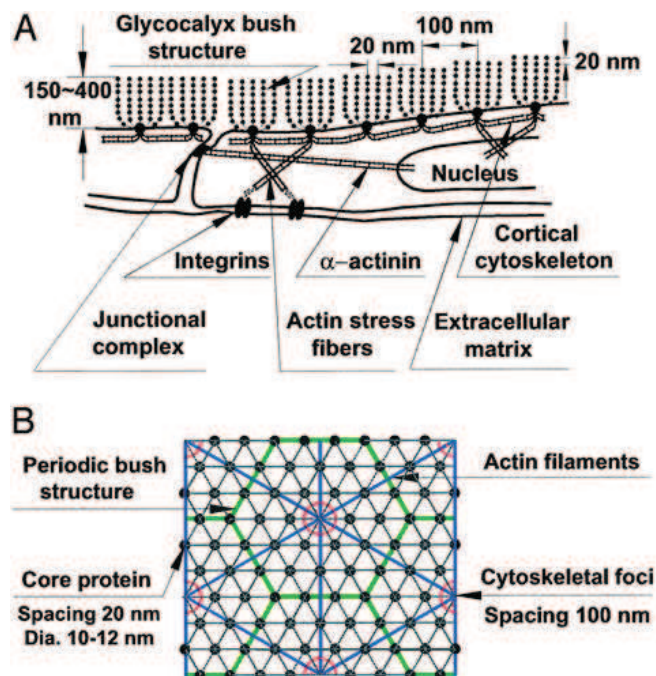


Figure 13. Modélisation de la structure du glycocalyx.

(A) Schématisation de l'espace entre les protéines de soutien, les branches des GAG et l'ancrage dans le réseau du cytosquelette sous cortical. (B) Schématisation, en vue de dessus, de l'organisation des espacements et des structures protéiques avec le réseau cortical d'actine. D'après (Weinbaum, Zhang et al. 2003)

Le glycocalyx (ou glycolemme ou encore « cell coat ») est un feutrage micro fibrillaire de 20 à 50 nm d'épaisseur (Soler, Desplat-Jego et al. 1998) constitué de protéoglycanes (noté PG), de glycosaminoglycanes (noté GAG) et de protéines plasmatiques qui leur sont liées (Figure 13-A). Le glycocalyx intervient dans l'interaction des cellules circulantes avec l'endothélium (Damiano 1998, Mulivor and Lipowsky 2002), il intervient dans les interactions des facteurs solubles avec les cellules endothéliales (noté CE) (Busch, Ljungman et al. 1979)

Étude bibliographique

et limite le passage de macromolécules dans les espaces intercellulaires et contribue de ce fait à la perméabilité de l'endothélium. Le glycocalyx présente des hétérogénéités à la surface cellulaire avec une proportion importante de domaines chargés négativement. Cette charge négative globale assure la sélectivité moléculaire du glycocalyx (Simionescu, Simionescu et al. 1981). La neutralisation de la charge du glycocalyx ou son altération par les pronases et héparinases augmentent fortement la perméabilité de l'endothélium aux macromolécules circulantes (Damiano 1998, Huxley and Williams 2000).

Le glycocalyx peut être considéré comme un mécanosenseur des contraintes de cisaillement (ou « shear stress ») (Florian, Kosky et al. 2003, Weinbaum, Zhang et al. 2003) avec un arrangement spécifique des protéines et des GAG dans la membrane (voir Figure 13-B), le tout soutenu par un réseau actinique organisé (Squire, Chew et al. 2001). Son action pro synthétique de NO (pour oxyde nitrique) a été démontrée au travers de l'augmentation de l'activité de la NO-synthase (Florian, Kosky et al. 2003). Le NO provoque une augmentation du nombre d'adhésions focales améliorant la stabilité de l'endothélium et diminuant sa perméabilité.

II. 2.3 Matrice extra cellulaire et jonctions cellule-matrice

II. 2.3.1 La matrice extra cellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est un ensemble de protéines extracellulaires, de glycoprotéines et de glycosaminoglycanes, éventuellement sous-tendu par un réseau de collagène, dont les propriétés structurales et mécaniques vont orienter la fonction cellulaire. Parce que les propriétés de la MEC déterminent sa déformation sous l'effet de contraintes, la MEC va influencer en retour la précontrainte cellulaire et la déformabilité cellulaire. Cette influence va s'effectuer au travers des mécanorécepteurs de type intégrines (Arnaout, Mahalingam et al. 2005). La plupart des études se sont concentrées sur les aspects biochimiques des interactions cellule-MEC. Il faut reconnaître qu'il est difficile de séparer les changements de l'environnement chimique des changements mécaniques dans la mesure où structure et propriétés mécaniques sont liées de façon complexe par la rhéologie de la structure matricielle et où il s'avère difficile de modifier les propriétés de la MEC sans toucher aux propriétés chimiques. *In vivo*, les propriétés matricielles sont susceptibles d'être

Étude bibliographique

modifiées par la synthèse ou la dégradation protéique, par la contraction d'une cellule adhérente, ou encore par la pression ou le débit dans un écoulement (Mow, Wang et al. 1999). Une méthode permettant de stresser ou relaxer la MEC consiste à attacher des gels de collagène à un support rigide et relâcher ses attaches ce qui a notamment pour effet d'activer la signalisation intracellulaire de l'AMP cyclique (He and Grinnell 1994). Cette méthode fait passer les conditions d'un extrême à l'autre sans couvrir les conditions intermédiaires. La méthode la plus répandue aujourd'hui consiste à utiliser un gel de polyacrylamide pour modifier son module d'élasticité tout en maintenant constant l'environnement chimique (Pelham and Wang 1997). Cette technique a été récemment utilisée au laboratoire pour étudier la réponse des macrophages alvéolaires et des cellules épithéliales alvéolaires aux propriétés mécaniques de l'environnement (Féréol, Fodil et al. 2006, Féréol, Fodil et al. 2009) et dans de nombreuses autres études (Wong, Leach et al. 2004, Yeung, Georges et al. 2005). Comparé à un substrat rigide, un substrat souple va entraîner un moindre étalement cellulaire, augmenter la vitesse de migration, et réduire le montant de phosphotyrosine au niveau des sites d'adhésion. A noter que dans le présent travail, les cellules sont mises en présence d'un double système de matrice dont l'une est composé de micromatrices capables de transmettre des efforts cycliques au cytosquelette et l'autre système, passif, permet de contrôler la perméabilité d'une monocouche cellulaire. Le tissu pulmonaire est quant à lui sous l'effet permanent d'une tension interne induite par la pression transpulmonaire qui change d'une façon cyclique et irrégulière avec la respiration (Hubmayr 2002). Cette tension interne ressentie dans les parois alvéolaires est transmise à la MEC des cellules épithéliales et endothéliales selon des mécanismes décrits plus haut. Les interactions mécaniques entre ces cellules et la matrice sont connues pour moduler la contractilité cellulaire et la phosphorylation des chaînes légères de myosine (Polte, Eichler et al. 2004), la rhéologie cellulaire (Rosenblatt, Hu et al. 2004), et l'assemblage des molécules d'adhésion (Chen, Alonso et al. 2003) qui sont critiques dans les processus cellulaires fondamentaux.

Sur le plan de sa composition physico-chimique, la lame basale sur laquelle reposent les cellules endothéliales fait environ 50 nm d'épaisseur et est constituée de collagène IV, de fibronectine, de laminine, de chondroïtines sulfates, d'héparanes sulfates, de perlécans et de syndécans (Kalluri 2003). La matrice extra cellulaire est synthétisée lors de l'angiogenèse, de la vasculogenèse (Ingber and Folkman 1988, Vlodavsky, Michaeli et al. 1988, Folkman and

Étude bibliographique

D'Amore 1996, Akhta, Carlso et al. 2001, Kalluri 2003) et est continuellement remodelée dans les vaisseaux matures (Pratt, Form et al. 1985, Vlodavsky, Folkman et al. 1987, Yan, Moses et al. 2000, Kalluri 2003). La MEC contient aussi d'autres protéines associées ainsi que des facteurs de croissance. La première étape de synthèse de la MEC est la sécrétion par les CE de la laminine dont les motifs d'acides aminés vont principalement lier les intégrines- β_1 (Albelda, Daise et al. 1989, Languino, Gehlsen et al. 1989); voir la section II. 2.3.2 ci-dessous pour plus de renseignements sur la liaison cellule matrice et la signalisation intracellulaire impliquée. Le collagène IV est ensuite produit par les CE et interagit avec la laminine pour former un tapis sur lequel peuvent se fixer d'autres macromolécules afin de former une lame basale résistante (Kalluri 2003).

Des expériences *in vitro* de remodelage de la matrice extra cellulaire ont montré un doublement de la perméabilité d'un tapis cellulaire à l'albumine lorsque la fibronectine est dégradée (Partridge, Horvath et al. 1992, Resnikoff, Brien et al. 1999). De même, des expériences *in vivo* de remodelage de la MEC à l'aide de trypsine (Cohler, Saba et al. 1985) ou de thrombine (Daudi, Saba et al. 1989) entraînant une dégradation de la fibronectine ont montré une multiplication par 3 de la perméabilité de l'endothélium pulmonaire. Ces expériences ont également montré l'importance du maintien de la MEC dans la perméabilité de l'endothélium pulmonaire. Dans certains cas, il est possible de rétablir une perméabilité basale en réincorporant de la fibronectine dans la MEC (Wheatley, McKeown-Longo et al. 1993, Wheatley, Vincent et al. 1993, Curtis, McKeown-Longo et al. 1995, Resnikoff, Brien et al. 1999). La dégradation de certains GAG dans la MEC et de l'acide hyaluronique par la hyaluronidase augmente la perméabilité de l'endothélium aux fluides et à l'albumine (Qiao, Wang et al. 1995, Dane, van den Berg et al. 2013).

Les métalloprotéases matricielles (noté MMP) peuvent dégrader les éléments de la MEC comme le collagène, les PG, la fibronectine ; les expériences *in vitro* (Partridge, Jeffrey et al. 1993) et *in vivo* (Passi, Negrini et al. 1999) ont démontré une augmentation de la perméabilité suite à un traitement aux MMP-2 et MMP-9 notamment. Le remodelage de la MEC entraîne un remodelage de l'endothélium à l'aide des MMP et des protéines sécrétées acides et riches en cystéines (noté SPARC) (Iruela-Arispe, Diglio et al. 1991, Kato, Lewalle et al. 2001). Le VEGF et le TNF- α (pour « Tumor Necrosis Factor ») stimulent la production de MMP-2, MMP-9 et de SPARC qui vont dénuder la lame basale endothéliale en dégradant les éléments de la MEC (Zucker, Mirza et al. 1998, Kato, Lewalle et al. 2001). Les cellules

Étude bibliographique

entourant la lame basale dénudée présentent à leur surface des intégrines spécifiques liant les éléments matriciels libres (Kalluri 2003), ce qui va activer La FAK (pour « Focal-Adhesion Kinases »), les MAPK (pour « Mitogen-Activated Protein Kinases) ainsi que les Rho-GTPases (RhoA, Rac, Cdc42). L'activation de ces complexes facilite la migration et la prolifération des CE (Nobes and Hall 1995, De Matteis and Morrow 2000, Ridley, Schwartz et al. 2003). Cette prolifération cellulaire entraîne la synthèse de novo des éléments de la MEC et donc sa possible réparation (Li, Zhang et al. 2003). Cependant, tout changement dans la composition matricielle soit en raison de l'atteinte pulmonaire, soit en raison du remodelage cellulaire va entraîner un changement des propriétés mécaniques de la matrice et des parois alvéolaires. De nouvelles conditions d'équilibre vont devoir être trouvées au sein des territoires alvéolaires sous tension modifiant la signalisation et un remaniement structurel en réponse aux nouvelles conditions mécaniques induites par les conditions pathologiques (Suki, Ito et al. 2005).

II. 2.3.2 Liaisons cellule-matrice

Les cellules des tissus sont attachées au réseau matriciel via des groupements de récepteurs (cluster) appelés complexes d'adhésion focale (« Focal Complex » ou « Focal Adhesion »), alors que l'attachement aux cellules adjacentes est réalisé par les complexes de jonction intercellulaire précédemment décrits. Les complexes d'adhésion focale contiennent des intégrines et un grand nombre de protéines plus ou moins directement associées au cytosquelette telles que la taline, la vinculine, l' α -actinine, la paxilline et les FAK (focal adhesion kinases) qui participent et viennent renforcer la connexion entre la terminaison intracytoplasmique des intégrines et le cytosquelette (Burrige, Fath et al. 1988). Ces ponts moléculaires permettent la transmission des forces mécaniques entre les structures intra et extracellulaires (Maniotis, Bojanowski et al. 1997), assurant une coordination mécano-chimique multi-échelle entre la MEC, le cytosquelette et le noyau complémentaire à la diffusion chimique (Hu, Chen et al. 2003).

Étude bibliographique

II. 2.3.2.1 Les intégrines

La liaison des cellules endothéliales avec la MEC passe principalement par une protéine de membrane cellulaire appelée intégrine reconnue comme une composante essentielle dans la transmission des forces entre le cytosquelette et la matrice pour maintenir l'intégrité structurale du tissu et stabiliser son architecture (Maniotis, Bojanowski et al. 1997, Ingber 2003, Hynes 2004, Ingber 2006). L'article princeps de Wang, Butler et Ingber (Wang, Butler et al. 1993) qui démontre le rôle mécano-transducteur de l'intégrine en définissant pour la première fois la magnétocytométrie (que nous utilisons largement dans le présent travail), a joué un rôle déterminant dans cette reconnaissance de la spécificité de l'intégrine (Baker and Zaman 2010). Cette spécificité de l'intégrine d'être le mécano-transducteur par excellence est maintenant très largement reconnue (Paszek and Weaver 2004, Chen 2008, Puklin-Faucher and Sheetz 2009). Les intégrines sont des hétérodimères composées de deux sous-unités: α et β liées de façon non covalente. Les chaînes α et β s'assemblent en 24 intégrines spécifiques à un ou plusieurs types cellulaires. 18 chaînes α et 8 chaînes β ont été décrites à ce jour. Les cellules endothéliales expriment une variété d'intégrines (Albelda, Daise et al. 1989, Cheng and Kramer 1989, Tarone, Stefanuto et al. 1990). Les intégrines les plus communément retrouvées au niveau des cellules endothéliales sont : $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ et $\alpha_1\beta_5$. Par exemple, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ joue un rôle très important pour initier les interactions cellule-matrice et se trouve largement exprimée dans le phénotype vasculaire prolifératif, y compris dans les capillaires pulmonaires (Brooks, Clark et al. 1994, Singh, Fu et al. 2000).

La plupart des intégrines possèdent un grand domaine extracellulaire composé d'une tête capable de reconnaître des ligands matriciels, elle-même connectée à deux bras, chacun étant connecté au cytosquelette par une courte chaîne intracellulaire (Ruoslahti 1991, Hynes, Bader et al. 1999). Les intégrines interagissent avec un domaine spécifique appelé RGD (pour Arginine-Glycine-Acide aspartique) que l'on retrouve dans les séquences du collagène, de la fibronectine, de la vitronectine et du fibrinogène (Pierschbacher and Ruoslahti 1984, Lawler and Hynes 1989, Smith and Cheresch 1990). L'utilisation de composants matriciels synthétiques dans le milieu provoque l'attachement des intégrines aux peptides solubles en dépit de la matrice extra cellulaire (Hadden and Henke 2000). L'adjonction dans le milieu de peptides présents dans la MEC va provoquer une

Étude bibliographique

déstabilisation de l'équilibre jonctionnel au travers des intégrines, ce qui à pour conséquence de déstabiliser les jonctions intercellulaires et d'augmenter la perméabilité endothéliale (Stickel and Wang 1988, Wu, Ustinova et al. 2001). Les expériences montrent qu'en utilisant le peptide synthétique GRGDS (pour Glycine-Arginine-Glycine-Acide aspartique-Sérine), on augmente la perméabilité des cellules endothéliales, celles-ci perdent leurs contacts avec la MEC, s'arrondissent et finissent par se détacher (Stickel and Wang 1988, Qiao, Yan et al. 1995, Poli, Mason et al. 2004). La Figure 14 montre que l'injection dans les veinules isolés de porc, de peptides inhibant la liaison des intégrines à la fibronectine et la vitronectine induit de fortes augmentations de la perméabilité (Wu, Ustinova et al. 2001).

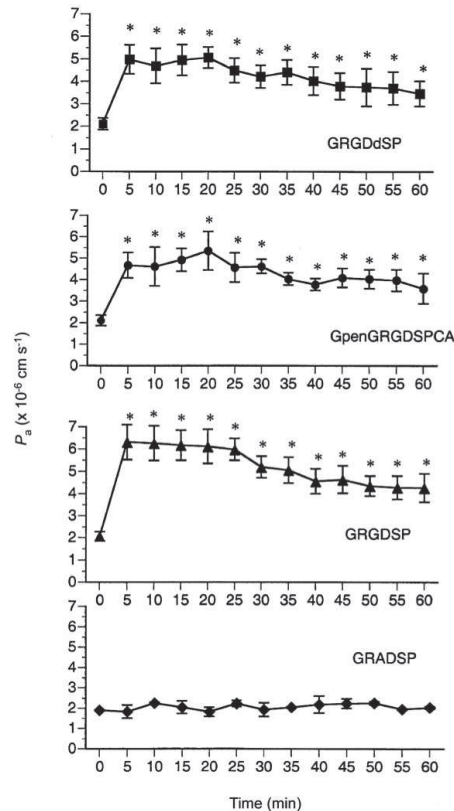


Figure 14. Changement du coefficient de perméabilité pour l'albumine (P_a) en fonction du temps dans des veinules coronaires durant l'administration de peptides.

Le peptide compétitif avec la fibronectine est GRGDdSP (à 10^{-4} M) (n=9). Le peptide compétitif avec la vitronectine est GPenGRGDSPCA (à 10^{-4} M) (n=6). Le peptide compétitif avec la fibronectine/vitronectine est GRGDSP (à 10^{-4} M) (n=14). Le peptide contrôle non compétitif est GRADSP (à 10^{-4} M) (n=3). (*) Différence statistiquement significative ($p < 0,05$) vs. Contrôle à t=0. D'après (Wu, Ustinova et al. 2001)

Étude bibliographique

II. 2.3.2.2 Les molécules de liaison et de régulation des connexions intégrines-cytosquelette

Le domaine cytoplasmique des intégrines est connecté au cytosquelette d'actine au travers de protéines de liaison comme la vinculine, la paxilline, la taline, l' α -actinine, la zyxine, la tensine et la filamentine (voir Figure 15).

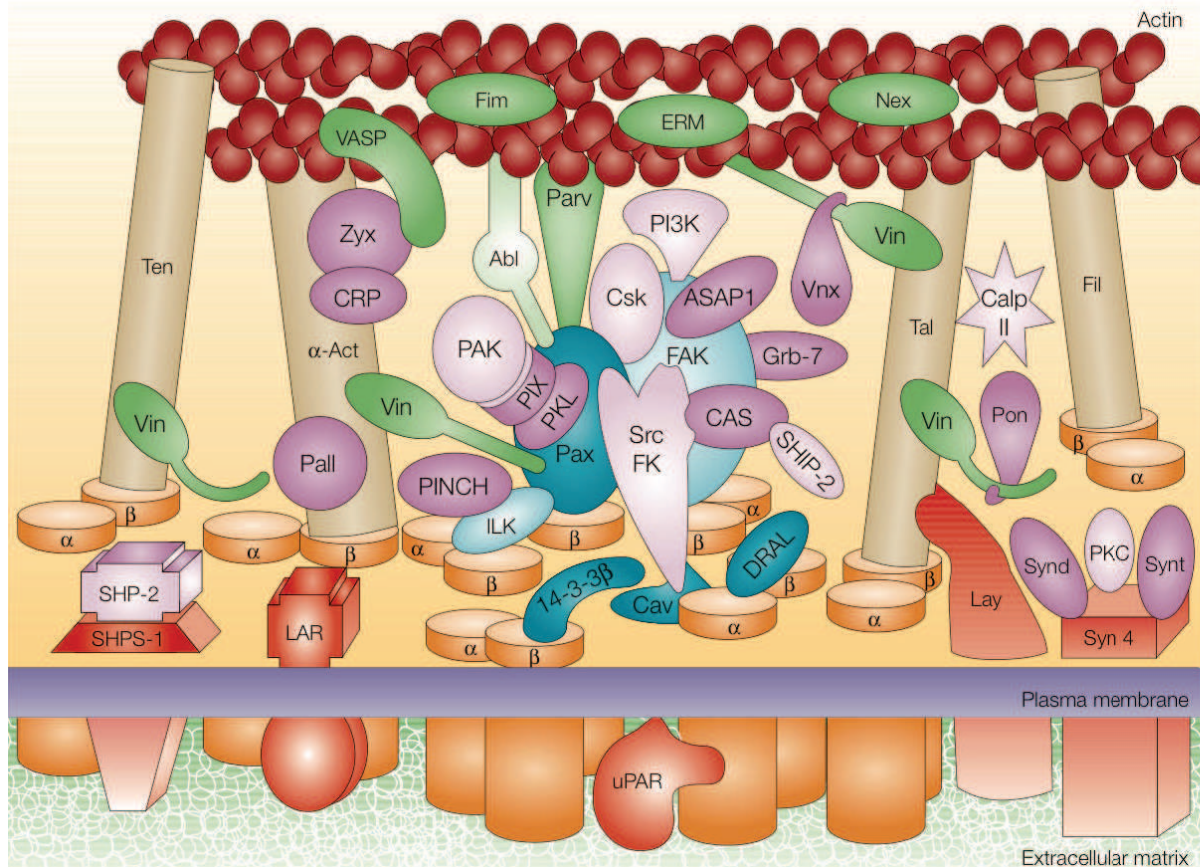


Figure 15. Schéma représentant les intégrines et leurs sous-unités α et β (en orange) ainsi que leur interactions avec les différentes protéines de liaison au cytosquelette d'actine (en rouge foncé).

Les autres protéines transmembranaires et associées à la matrice extra cellulaire sont (en rouge) : Syn4 (syndecan-4), Lay (layiline), LAR (récepteur leucocytaire à l'antigène), SHPS-1 (Substrat-1 au SHP-2), uPAR (récepteur activateur à l'urokinase plasminogène). Les protéines ayant une fonction de liaison entre les intégrines et l'actine sont (couleur or) : α -Act (α -actinine), Tal (taline), Ten (tensine), Fil (filamine). Les protéines associées aux intégrines sont (en bleu) : FAK (kinase d'adhésion focale), Pax (paxilline), ILK (kinase liée à l'intégrine) DRAL (protéine-LIM réduite dans le rhabdomyosarcome), 14-3-3 β , Cav (cavéoline). Les protéines associées à l'actine sont (en vert) : VASP (phosphoprotéine stimulée par les vasodilatateurs), Fim (fimbrine), ERM (ezrine-radixine-moesine protéine), kinase Abl, Nex (nexiline), Parv (parvine/actopaxine), Vin (vinculine). Les protéines adaptatrices sont (en violet) : Zyn (zyxine), CRP (protéine riche en cystéine), Pall (palladine), PINCH, PKL (kinase de liaison à la paxilline), PIX (facteur d'échange interagissant avec PAK), Vnx (vinexine), Pon (ponsine), Grb-7, ASAP-1, Synt (syntenine), Synd (syndesmone). Les enzymes sont indiquées avec une teinte plus claire : SHP-2 (phosphatase-2 contenant SH2), SHIP-2 (inositol 5-phosphate-2 contenant SH2), PAK (kinase activée par p21), PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), Src FK (kinases de la famille Src), Csk (kinase src carboxy-terminale), Calp II (protéase calpaïne II), PKC (protéine kinase C). D'après (Geiger, Bershadsky et al. 2001).

Étude bibliographique

La paxilline (Pax) sert de centre d'interaction avec de nombreuses protéines régulatrices au travers de ses domaines riches en leucine et de ses domaines en doigt de zinc. La Pax forme des complexes au niveau des points d'adhésion avec la matrice et interagit avec de nombreuses intégrines. Parmi ces protéines régulatrices on retrouve PAK (pour « p21-activated kinase ») et PIK (pour « PAK-interacting exchange factor »), Abl (pour « Ablson proto-oncogene ») et p120GAP (pour « p120 GTPase activating protein), qui vont pouvoir moduler l'activité des liaisons intégrines-MEC et intégrines-CSK (Brown and Turner 2004, Deakin and Turner 2008). La filamine qui lie les intégrines au CSK d'actine et qui maintient celui-ci sous forme réticulée, se lie à plusieurs GTPases (RhoA, Rac, Cdc42) à la kinase ROCK (pour « RhoA-associated kinase ») ainsi qu'à la cavéoline. Ces protéines vont réguler l'activité de la filamine au travers de phosphorylations/déphosphorylations (Ohta, Suzuki et al. 1999, Stahlhut and van Deurs 2000, Ueda, Ohta et al. 2003). L' α -actinine (notée α -Act) se lie à la zixyne (notée Zyx) qui va à son tour s'associer à VASP et à la profiline (noté Pro) pour moduler la liaison de l' α -actinine avec l'intégrine et l'actine (Crawford, Michelsen et al. 1992, Reinhard, Jouvenal et al. 1995). La tensine (noté Ten) contient des domaines SH2 au travers desquels elle interagit avec plusieurs tyrosines kinases telles que Src et Cas (Lo 2004). La multitude d'interactions et de régulations possibles au travers des nombreuses protéines du complexe d'adhésion entre la cellule et la MEC permettent l'intégration d'une multitude de signaux régulant le cytosquelette d'actine au cours de la vie cellulaire et des processus comme la motilité et la perméabilité.

La structure des intégrines leur permet d'assurer une transduction bidirectionnelle des signaux entre le cytosquelette d'actine et matrice. Les signaux intracellulaires peuvent moduler l'affinité des intégrines pour les ligands extracellulaire (signalisation "inside-out") alors que les stimuli extracellulaires entraînent une cascade de signalisation intracellulaire via l'activation des intégrines (Schwartz, Schaller et al. 1995). L'étude des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_1$ montre que leur liaison avec la MEC provoque la phosphorylation de FAK, Pax, de la cortactine et de l'eitrine (Bhattacharya, Fu et al. 1995), un influx de Ca^{2+} (Bhattacharya, Ying et al. 2000), l'activation de PLA2 (pour phospholipase A2) (Bhattacharya, Patel et al. 2001), l'activation de Rac GTPases (Fujiwara, Gu et al. 2004), et une augmentation de la perméabilité des capillaires dans les poumons de rats traités à la vitronectine reconnue par ces intégrines (Tsukada, Ying et al. 1995). Ces intégrines jouent potentiellement un rôle très important dans la régulation de la perméabilité endothéliale car une grande partie de la

Étude bibliographique

régulation du complexe d'adhésion se fait au travers de FAK qui lui-même régule les jonctions intercellulaires.

FAK est une tyrosine kinase se liant à la sous-unité β des intégrines (Schlaepfer and Mitra 2004). La structure de FAK est schématisée dans Figure 16. La partie NH2 terminale de FAK comprend un domaine FERM qui lie la ezrine, radixine, Trio (Medley, Buchbinder et al. 2003), deux domaines GEF (pour « guanine nucleotide exchange factor ») liant RhoA et Rac ainsi qu'un site de liaison pour WASP qui induit la polymérisation de l'actine en se liant à Arp2/3 (Millard, Sharp et al. 2004, Wu, Suetsugu et al. 2004). On sait que Arp2/3 interagit avec l'actine (voir la section II. 3.1.1 ci-dessous) et qu'il existe un dialogue croisé avec les cadhérines (Quadri 2012). De plus Arp2/3 interagit avec la cortactine, la vinculine et la E-cadhérine ; par ce biais FAK joue un rôle crucial dans la liaison des CE à la MEC et dans les liaisons cellule-cellule au travers de Cdc42 (Quadri 2012). FAK comporte 3 régions riches en proline et pouvant interagir avec Src, ASAP1, p130, Arf (pour « ADP ribosylation factor »), GRB2 (pour « growth factor receptor-bound protein-2 ») (Nojima, Morino et al. 1995, Liu, Loijens et al. 2002). Le domaine C-terminal de FAK contient une région FAT (pour « focal adhesion targeting FAK) (Schlaepfer and Mitra 2004) qui va permettre à FAK d'être adressé vers le complexe d'adhésion focale. Le domaine FAT lie Pax, Tal, 190RhoGEF et GRAF (pour « GTPase Regulator Associated with FAK »). FAK possède plusieurs tyrosines pouvant être phosphorylées, notamment Y397 qui une fois autophosphorylée est un site de haute affinité pour Src. Celui-ci va à son tour promouvoir l'augmentation de perméabilité de l'endothélium au travers de l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire.

Étude bibliographique

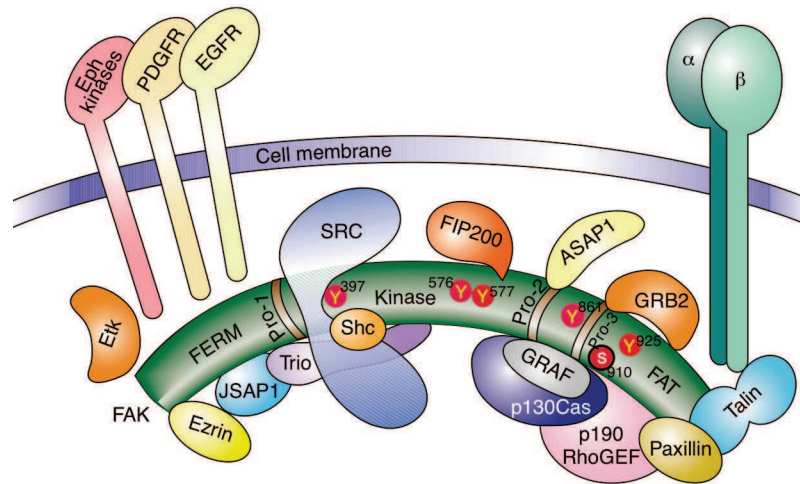


Figure 16. Schématisation de la structure de la FAK et de ses sites d'associations aux autres protéines.

Le domaine N-terminal FERM est important pour l'intégration des signaux des facteurs de croissance EGF et PDGF. FERM lie les protéines ezrine, radixine, Trio, JSAP1, WASP. La partie C-terminale est composée par le domaine FAT qui permet l'adressage de FAK au complexe d'adhésion, mais aussi de lier la paxilline, la taline les Rho GTPases au travers de 190 RhoGEF. Les domaines riches en prolines (Pro-1, Pro2, Pro-3) de la FAK peuvent lier les protéines contenant des domaines SH3 comme Trio, GRAF, p130Cas et ASAP1. FAK peut être phosphorylé au niveau des tyrosines 397, Tyr-576, Tyr-577, Tyr-861 et Tyr-925. La phosphorylation de FAK en position 397 crée un site de forte affinité pour Src alors que la phosphorylation en position 925 va promouvoir la liaison avec GRB2. FIP200 se liant au domaine kinase de FAK va inhiber : l'activité catalytique de FAK et la phosphorylation en position 910 ; au travers de la PKC ou de ERK2 ce qui va impacter négativement sur la capacité de la paxilline à se lier avec FAT. D'après (Schlaepfer and Mitra 2004).

Les contraintes de cisaillement activent les intégrines des cellules endothéliales comme le montrent le développement des clusters d'intégrines (Wang, Miao et al. 2002), l'association avec la protéine Shc (Chen, Li et al. 1999) et la liaison avec WOW-1 qui est un anticorps qui reconnaît spécifiquement l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ activée (Tzima, del Pozo et al. 2001), la régulation de l'expression génique par la contrainte (Li, Haga et al. 2005). L'activation des intégrines induite par les contraintes de cisaillement démarre après 1 minute et dure plus de 6 heures. Bloquer les intégrines avec des anticorps anti-intégrines ou des inhibiteurs de peptides RGD va atténuer la signalisation induite par le cisaillement et les changements fonctionnels induits (Girard and Nerem 1995, Bhullar, Li et al. 1998, Liu, Chen et al. 2002).

II. 3 Voies intracellulaires de l'endothélium pulmonaire normal et agressé et ses conséquences sur la perméabilité.

II. 3.1 Cytosquelette

Le cytosquelette se compose de 3 types d'éléments fonctionnant en réseaux interconnectés: microfilaments d'actine, filaments intermédiaires et microtubules. Si le rôle critique du cytosquelette d'actine sur la perméabilité est démontré par de nombreuses études, en revanche, le rôle des microtubules et des filaments intermédiaires dans la régulation de la barrière endothéliale est moins clair (Dudek and Garcia 2001). Les trois réseaux étant interactifs fonctionnellement et interdépendants fonctionnellement, les effets spécifiques de l'un ou de l'autre de ces réseaux non actiniques restent difficiles à cerner au cours des grands processus dynamiques (Klymkowsky 1999, Goode, Drubin et al. 2000).

II. 3.1.1 Structure des filaments d'actine

Les filaments d'actine jouent un rôle critique pour la perméabilité endothéliale comme le montrent l'effet de la cytochalasine D, qui en entraînant des ruptures des filaments d'actine, entraîne augmentation de perméabilité dans les cellules en culture (Shasby, Shasby et al. 1982) alors que la phalloïdine qui stabilise le réseau en bloquant la dépolymérisation empêche les dysfonctions de la barrière induites par un agoniste comme la thrombine (Phillips, Lum et al. 1989). Les filaments d'actine se focalisent sur les nombreuses protéines de la membrane décrites précédemment: cadhérines, glycocalyx, protéines occlusives et d'adhésion focale. La structure des microfilaments d'actine joue un rôle fondamental dans la génération de la tension interne et la contraction acto-myosine (traitées ci-après).

Les microfilaments d'actine (actine-F ou actine fibrillaire) d'un diamètre d'environ 8 nm sont des polymères hélicoïdaux constitués par l'assemblage de monomères d'actine globulaire (actine-G), voir Figure 17. L'actine-G est une protéine bi-globulaire de 5,46 nm de diamètre et de 42 kDa. L'actine est ubiquitaire et représente jusqu'à 15% de la masse protéique cellulaire totale. La polymérisation de l'actine-G en filaments dépend de la concentration d'actine-G dans la solution, de la concentration d'ATP (pour Adenosine-5'-

Étude bibliographique

triphosphate) et de la concentration de cations divalents (Ca^{2+} et Mg^{2+}). La polymérisation commence par une étape de nucléation au cours de laquelle trois molécules d'actine doivent s'assembler, cette étape est lente car défavorable thermodynamiquement. L'addition de nouveaux monomères sur le trimère de départ est rapide car l'actine-G lorsqu'elle est liée à l'ATP augmente son affinité pour l'actine fibrillaire. La concentration locale de l'actine-G diminue alors jusqu'à ce que la vitesse de polymérisation et de dépolymérisation s'équilibre, elle est appelée concentration critique (Pollard 1990). La cytochalasine D bloque le côté (+) de la polymérisation des filaments d'actine alors que la phalloïdine bloque le côté (-) (voir Figure 17).

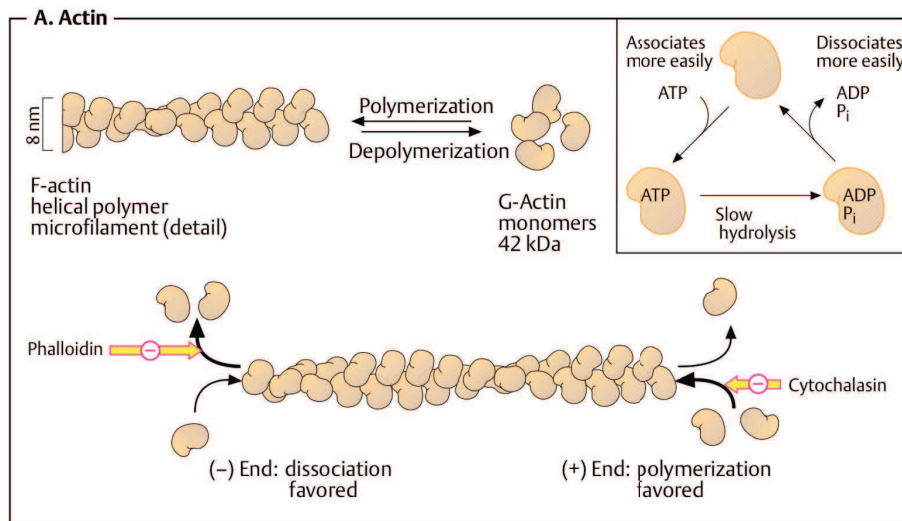


Figure 17. Schéma des processus de polymérisation et dépolymérisation de l'actine.

Les actions inhibitrices de la cytochalasine et de la phalloïdine sont représentées sur les extrémités du filament d'actine. D'après (Koolman, Röhm et al. 2005).

La polymérisation et l'organisation des microfilaments sont régulées par les ABP (pour « Actin binding proteins ») dont il existe environ une centaine de membres qui peuvent se lier à l'actine-G ou l'actine-F. Les ABP sont classées en catégories : les régulateurs de polymérisation/dépolymérisation, les régulateurs de structures actiniques secondaires et les protéines utilisant l'actine comme charpente (Winder and Ayscough 2005).

La polymérisation de l'actine est initiée par le complexe Arp2/3 et les formines (Mullins, Heuser et al. 1998). Le complexe Arp2/3, aux extrémités (+) de l'actine (appelées aussi barbelées ou barbées), permet la polymérisation de deux brins filles à un angle de 70° (voir Figure 18). De même le complexe peut se fixer sur un point le long d'un filament d'actine par l'intermédiaire de WASp (pour « Wiskott-Aldrich syndrome protein ») et

Étude bibliographique

Scar/Wave liés à un monomère d'actine et activés par les GTPases. Le complexe ainsi formé permet la polymérisation d'un brin fille à 70° du brin mère (Pollard 2007). La dépolymérisation spontanée de l'extrémité (-) est accélérée par le complexe ADF/cofiline qui induit une torsion du filament (Bamburg 1999). Le coiffage de l'extrémité (+) par CapZ augmente la vitesse de raccourcissement du filament en empêchant l'ajout de monomères à cette extrémité. La géloline empêche la polymérisation de l'actine (Gremm and Wegner 2000), mais en formant un complexe avec Arp2/3 elle permet la nucléation des filaments d'actine. Les souris KO-géloline ont une motilité cellulaire, une vitesse de réparation cellulaire réduites ainsi qu'une perméabilité au passage leucocytaire fortement diminuée (Witke, Sharpe et al. 1995). Les souris surexprimant la géloline voient leur motilité cellulaire hautement accélérée (Cunningham, Stossel et al. 1991). Ces protéines régulatrices sont responsables du phénomène de tapis roulant (ou « threadmiling ») qui facilite la motilité cellulaire (Carlier, Laurent et al. 1997).

Les filaments courts d'actine liés aux ABP constituent un réseau sous membranaire appelé cortex cellulaire et définit la forme cellulaire au travers de la tension corticale. Les ABP de ce réseau sont les protéines liant l'actine aux différentes protéines transmembranaires décrites dans les sections II. 2.1 et II. 2.3 et qui rattachent la cellule à son environnement. Ce réseau permet à la cellule de s'adapter très rapidement, il participe aux mouvements cellulaires (Suetsugu and Takenawa 2003), au maintien des protéines transmembranaires à leur emplacement comme les protéines des AJ et TJ, ainsi qu'aux phénomènes d'endocytose.

Étude bibliographique

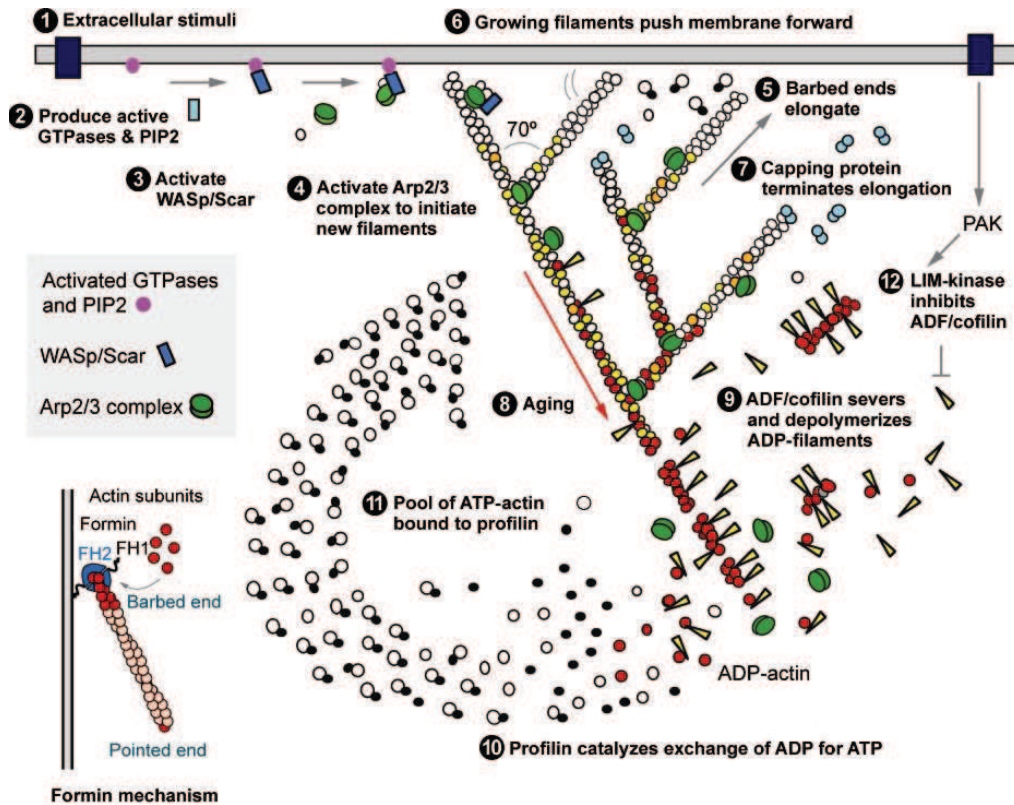


Figure 18. Résumé des fonctions du complexe Arp2/3 et de nucléation par les formines.

Modèle proposé pour la nucléation et l'élongation des filaments d'actine. Les facteurs facilitant la nucléation comme WASp et Scar/WAVE lient Arp2/3 et un premier monomère d'actine sur un brin principal afin de créer une branche fille à 70°. La partie barbée va être allongée jusqu'à ce que des protéines de coiffe viennent la stabiliser. L'insert en bas à gauche représente la nucléation et l'élongation par la formine au niveau de l'extrémité barbée d'un filament non embranché. La formine reste attachée au filament pendant l'élongation. D'après (Pollard 2007).

II. 3.1.2 Structure des filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires (FI) sont des fibres protéiques très stables. Les composants des FI sont nombreux et ils s'associent en cordages (« coiled coil ») d'environ 10 nm de diamètre voir Figure 19. Les FI sont distribués autour du noyau avec une grande diversité d'organisation qui dépend du type cellulaire et s'étendent jusqu'à la périphérie cellulaire où ils vont s'ancrer à la membrane plasmique (Strelkov, Herrmann et al. 2003).

Étude bibliographique

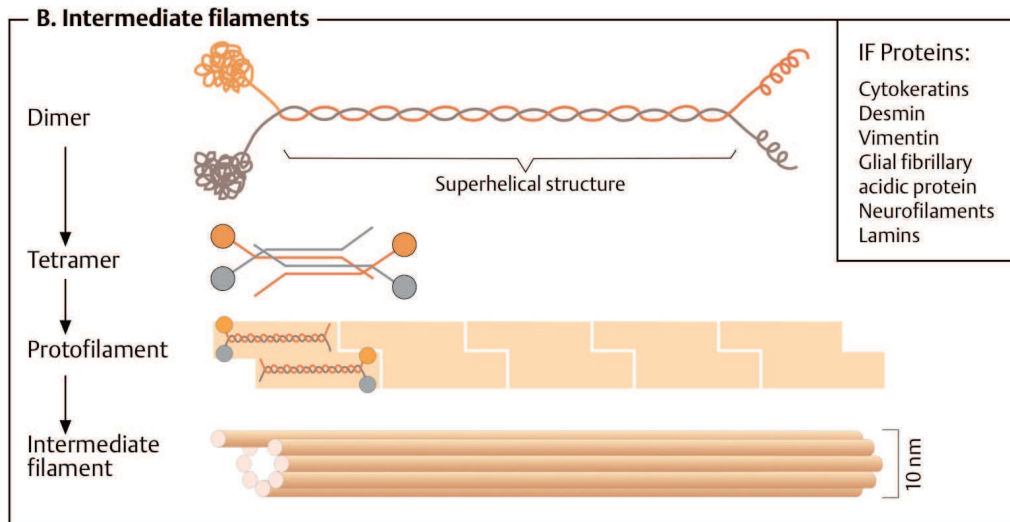


Figure 19. Schéma des processus de polymérisation des filaments intermédiaires.
D'après (Koolman, Röhm et al. 2005).

Les monomères constituant les FI ne se retrouvent quasiment pas à l'état libre dans les cellules (Soellner, Quinlan et al. 1985). Les FI sont structurellement très stables et sont constituées par différentes protéines ayant une structure en tige avec en leur centre une super hélice α allongée et interrompue par trois segments non hélicoïdaux qui sont propres à chaque molécule et par conséquent à chaque type de FI. Deux dimères s'associent de façon antiparallèle pour former un tétramère. Les tétramères sont arrangés de manière échelonnée et forment un protofilament très stable. L'association de 8 protofilaments constitue alors un filament intermédiaire. La prédominance de ces structures stables dans les sites de déformation mécanique suggère une fonction de résistance mécanique.

L'endothélium exprime principalement la vimentine et la cytokératine (Patton, Yoon et al. 1990, Alexander, Patton et al. 1991). L'utilisation de thrombine aboutit à la phosphorylation de la vimentine par la PKC, ce qui diminue son affinité aux protéines jonctionnelles (Bormann, Huang et al. 1986). La phosphorylation des molécules de jonctions comme la VE-cadhérine par l'utilisation d'histamine empêche l'établissement de la liaison entre la vimentine et la VE-cadhérine (Shasby, Stevens et al. 1997). Des souris KO pour la vimentine ont un phénotype normal et ne présentent pas d'altération de leur cytosquelette d'actine ou des microtubules. Elles ne semblent pas présenter de changements de la perméabilité endothéliale (Colucci-Guyon, Portier et al. 1994). Ceci suggère que des effets de compensation peuvent s'opérer en raison des redondances structurales apportées par l'association des différents réseaux de filaments. Les FI renforcent et stabilisent également

Étude bibliographique

les jonctions intercellulaires et permettent au sein des épithéliums le transfert des contraintes mécaniques d'une jonction intercellulaire à l'autre.

II. 3.1.3 Structure des microtubules

Les microtubules sont des tubes creux de 25 nm de diamètre polymérisés à partir d'hétérodimère de tubuline constitué des sous-unités α et β (53 et 55 kDa) (Wade and Hyman 1997). Ces hétérodimères s'assemblent pour former des protofilaments, l'association de 13 protofilaments forme la base du microtubule voir Figure 20.

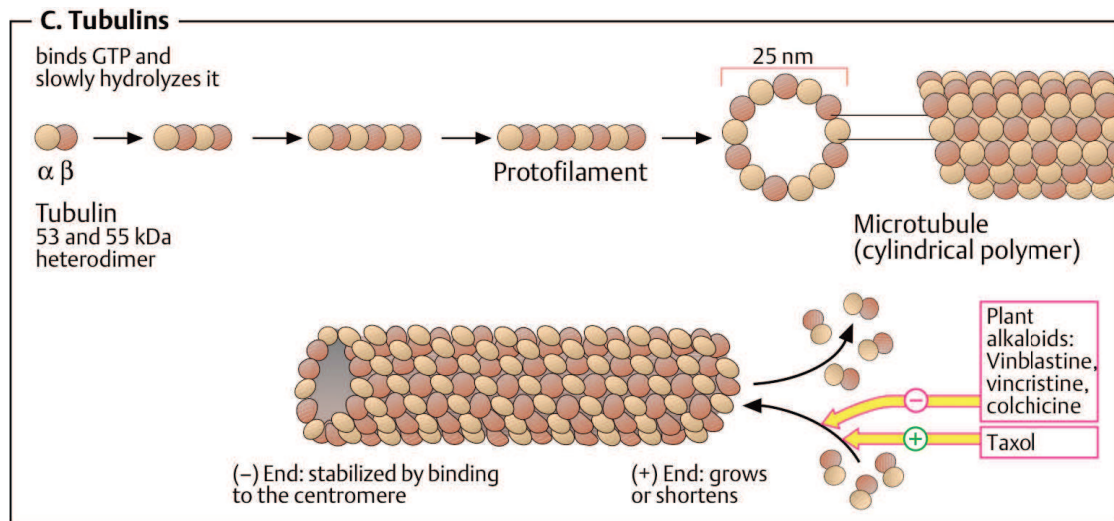


Figure 20. Schéma des processus de polymérisation et dépolymérisation des microtubules.

L'action de différentes drogues sur le processus est indiquée. D'après (Koolman, Röhm et al. 2005).

Les microtubules sont des structures dynamiques avec une extrémité (+) et extrémité (-). L'extrémité (-) est stabilisée par une coiffe liée à un centre organisateur appelé centrosome. L'extrémité (+) libre dans le cytoplasme présente une instabilité dynamique, car la longueur du microtubule est dépendante de la longueur de la coiffe de GTP (pour Guanosine-5'-triphosphate). La GTP est associé au microtubule et est lentement hydrolysée en GDP (pour Guanosine-5'-diphosphate). La stabilité de l'extrémité est influencée par la concentration de tubuline libre, de tubuline polymérisée ainsi que par la concentration calcique intracellulaire qui, lorsqu'elle est importante va favoriser la dépolymérisation de l'extrémité (+). La rupture des microtubules avec des agents comme le nocodazole qui bloque le côté + des filaments entraîne un renforcement de la structure

Étude bibliographique

d'actine et des adhésions focales (Bershadsky, Chausovsky et al. 1996, Verin, Birukova et al. 2001), une augmentation de la contraction isométrique (Danowski 1989), l'augmentation de la perméabilité de la couche endothéliale (Kielbassa, Schmitz et al. 1998). Le rôle de la structure des microtubules reste difficile à évaluer en raison de l'intrication des réseaux structuraux du cytosquelette.

Les protéines s'associant aux microtubules sont appelées « Microtubule associated proteins ». Les dynéines et kinésines associées aux microtubules permettent d'exercer des forces entraînant un mouvement des organelles (par exemple des mitochondries), le mouvement ciliaire dans les épithéliums, le battement flagellaire, le mouvement des chromosomes durant le cycle cellulaire ou encore la motilité cellulaire (Mandelkow and Mandelkow 1995). De par leur taille et leur structure, les microtubules assurent une résistance aux forces de compression en complémentarité avec les éléments compressifs présents dans l'environnement extracellulaire (Stamenovic and Ingber 2002).

II. 3.2 Forces intracellulaires et cytosquelette

Depuis plus de 30 ans, on considère que le cytosquelette cellulaire joue un rôle important dans le contrôle de la perméabilité endothéliale en raison de sa capacité à générer et transmettre les forces au sein de la cellule, entre plusieurs cellules et entre les cellules et la MEC (Shasby, Shasby et al. 1982). Ainsi, la forme aplatie des cellules endothéliales a été attribuée à la tension interne, aux microtubules résistant à la compression ainsi qu'aux attaches intercellulaires et matricielles (Moy, Van Engelenhoven et al. 1996, Dudek and Garcia 2001). La dépolymérisation des microtubules entraîne l'activation de RhoA (van Horck, Ahmadian et al. 2001, Birukova, Smurova et al. 2004, Birukova, Birukov et al. 2005) via l'activation de p190 RhoEGF, p115 Rho EGGF ou par MAPK (van Horck, Ahmadian et al. 2001, Birukova, Smurova et al. 2004), qui en retour augmente la densité et le nombre de fibres de stress. L'augmentation de la contraction du cytosquelette d'actine et le renforcement des AF qui en résulte serait responsable de l'augmentation de la perméabilité (Moy, Van Engelenhoven et al. 1996, Dudek and Garcia 2001, Mehta, Tiruppathi et al. 2002).

Étude bibliographique

II. 3.2.1 Rôle des moteurs actine-myosine

Les cellules endothéliales ont une importante machinerie contractile dont les fibres de stress sont les éléments principaux (Dudek and Garcia 2001). Il existe une excellente corrélation entre le développement des câbles actiniques ou fibres de stress, la phosphorylation de MLC, l'augmentation de la tension interne, tous ces facteurs dépendants de la régulation des couplages entre le réseau des filaments d'actine et les protéines de liaison de type myosine comme expliqué ci-après. La contraction acto-myosine nécessite la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine en position S19 (serine-19), et en position T18 (thréonine-18) par la MLCK (pour « Myosin Light Chain Kinase ») (Goeckeler and Wysolmerski 1995) ; et d'autres kinases comme PAK2 (Zeng, Lagunoff et al. 2000). La MLCK est une kinase calmoduline/ Ca^{2+} dépendante (noté CaM/ Ca^{2+}) qui est activée lorsqu'elle lie CaM/ Ca^{2+} et qu'elle est phosphorylée par une Src kinase en position T464 et T471. Une fois phosphorylée par MLCK, la myosine interagit avec l'actine et la tête moléculaire de la myosine va avancer sur le filament d'actine. MLCK est inhibée lorsqu'elle est phosphorylée par la PKA, PKC ou PAK2 sur la serine 19 (Verin, Gilbert-McClain et al. 1998, Goeckeler, Masaracchia et al. 2000, Zeng, Lagunoff et al. 2000) ; elle peut en outre être inhibée par ML9, un inhibiteur chimique spécifique de la MLCK. La MLCK joue un rôle majeur dans le contrôle de la contraction endothéliale et dans l'augmentation de perméabilité. Ainsi, le stress mécanique induit par une ventilation à haut volume courant n'entraîne pas d'augmentation de la perméabilité de l'endothélium chez les souris KO pour la MLCK (Wainwright, Rossi et al. 2003).

La MLCP (pour « Myosin Light Chain Phosphatase ») déphosphoryle la myosine et empêche son avancée sur les filaments d'actine, inhibant ainsi la contraction cellulaire (Essler, Amano et al. 1998). La MLCP peut elle-même être inhibée par la phosphorylation de ses T693 et T853 par ROCK qui est elle-même régulée par RhoA (Essler, Amano et al. 1998, Birukova, Smurova et al. 2004). La phosphorylation de la MLCP peut être inhibée en utilisant un inhibiteur sélectif de ROCK, le Y27632, entraînant une déphosphorylation de la myosine et empêchant ainsi sa contraction. La structure de la MLCK et de la MLCP ainsi que leur régulation de la phosphorylation de la myosine sont décrites sur la Figure 21.

Étude bibliographique

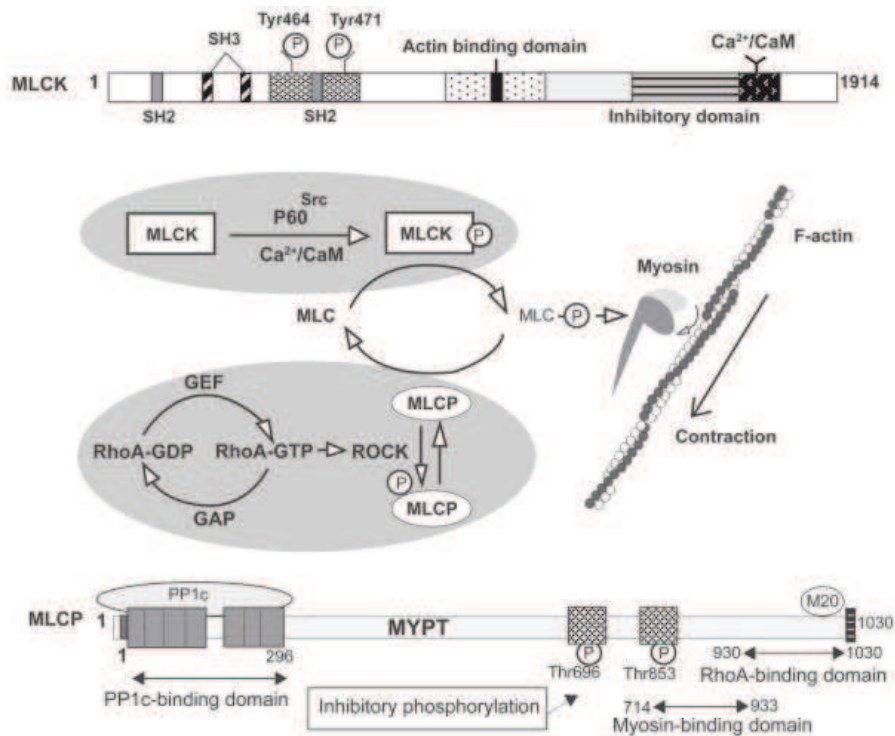


Figure 21. Régulation de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine.

La MLCK des cellules endothéliales possède deux domaines de liaison SH2/SH3 en position N-terminale, un domaine central de liaison à l'actine, un domaine catalytique C-terminal, et un domaine de liaison Calmoduline/Ca²⁺ (noté CaM/Ca²⁺). La MLCK est activée lorsqu'elle lie CaM/Ca²⁺ et qu'elle est phosphorylée par une kinase (par ex. p60Src) en position Tyr464 et Tyr471. Elle va alors phosphoryler la chaîne légère de la myosine sur Thr18/Ser19 augmentant son interaction avec l'actine et la contraction cellulaire. La MLCP peut inverser cette contraction par la déphosphorylation de la myosine. La MLCP contient un domaine de liaison à PP1 un domaine de ciblage à la myosine (noté MYPT) et des domaines de phosphorylation inhibiteurs (Tyr696 et Tyr853) et un domaine de liaison à la myosine entre les acides aminés 714-933. MLCP se lie à la myosine qui sera déphosphorylée par PP1. En réponse à l'activation de RhoA-GTP, ROCK va phosphoryler la MLCP ce qui conduit à l'augmentation de la contraction actomyosinique. D'après (Shen, Wu et al. 2009).

On peut observer la contraction des cellules endothéliales par les moteurs acto-myosine en cultivant ces cellules sur un gel de collagène (Morel, Petruzzo et al. 1990, Kolodney and Wysolmerski 1992). En stimulant le tapis cellulaire avec de la thrombine, on double sa force contractile (Kolodney and Wysolmerski 1992) passant de 70 à 132 dynes (soit de $70 \times 10^{-5} \text{ N}$ à $132 \times 10^{-5} \text{ N}$). Les expériences de Kolodney et coll. (voir Tableau 4) ont montré que la tension (de $1,3 \times 10^5$ dynes/cm² (soit $1,3 \times 10^4$ Pa)) développée par les cellules endothéliales est dix fois inférieure à la tension développée par les ASMC (pour « arterial smooth muscle cell) en cours de contraction (qui est de l'ordre de $6,7 \times 10^6$ dynes cm² (soit $6,7 \times 10^5$ Pa)). Si l'action de la thrombine sur les CE dure environ 2 heures, la durée et les effets contractiles varient d'une population cellulaire à l'autre (Goeckeler and Wysolmerski 1995). Ainsi, la contraction cellulaire par les moteurs acto-myosines au sein des cellules

Étude bibliographique

endothéliales permet de moduler la perméabilité de l'endothélium (Moy, Van Engelenhoven et al. 1996, Moy, Blackwell et al. 2002).

Type cellulaire	Tension en dyn/cm ²
Cellules épithéliales*	$3,2 \times 10^4$
Cellules de muscle squelettique de rat [±]	$2,3 \times 10^6$
Cellules musculaires lisses artérielles [±]	$6,7 \times 10^6$
Fibroblastes d'embryon de poulet (CFE) [§]	$1,0 \times 10^5$
Cellules humaines vasculaires de cordon ombilical (HUVEC) [§]	$1,3 \times 10^5$

Tableau 4. Comparaison de la force contractile par unité de surface pour différentes populations cellulaires.

(*) Non stimulés ; (±) cellules stimulées électriquement pour obtenir une force de contraction maximale ; (§) traitement avec 1U/mL de thrombine pendant 15 minutes. Adapté de (Kolodney and Wysolmerski 1992)

Très probablement, de nombreuses autres protéines de couplage avec la structure d'actine sont susceptibles de jouer un rôle dans le contrôle des processus aboutissant à des modifications de perméabilité, notamment en présence de stimulations mécano-chimiques variées.

II. 3.3 Tension interne du cytosquelette équilibre et déséquilibre

Les cellules endothéliales ou musculaires sont particulièrement sensibles aux stimulations mécaniques. Les études *in vitro* et *in vivo* montrent des changements de morphologie, de physiologie, de biochimie et d'expression génique dans les cellules endothéliales soumises à des contraintes de cisaillement et à des étirements cycliques comme lors de la respiration. Dans la plupart des expériences *in vitro*, les niveaux de stress mécanique ne dépassent pas les valeurs physiologiques de 1-50 dynes/cm² (1-5 Pa) qui sont en deçà des valeurs extrêmes potentiellement rencontrées dans les conditions d'activités sportives ou professionnelles extrêmes (une pression de 1 atmosphère représente environ 10⁶ dynes/cm² soit 10⁵ Pa). L'adaptation cellulaire à des conditions de pression très différentes reste une question non élucidée (Fujiwara 2003). On estime à 5% le niveau de déformation linéaire des tissus au cours de la respiration. Des valeurs de 17% à 22% seraient appliquées aux cellules endothéliales pendant la ventilation mécanique à haut volume. Ces

Étude bibliographique

valeurs ont parfois été considérées comme susceptibles d'endommager les cellules et la barrière endothéliale mais ce point n'a pas été confirmé expérimentalement (Birukov, Jacobson et al. 2003) ce qui suggère que les cellules endothéliales notamment sont dotées de propriétés d'adaptabilité très particulières. Il a même été suggéré que des niveaux normaux de stress permettaient aux cellules de mieux récupérer après une agression inflammatoire et que la ventilation mécanique des poumons lésés ne soit pas à elle seule la cause des altérations cellulaires. En réalité, la capacité des cellules à s'adapter à la déformation est avant tout dépendante de la façon dont les forces se propagent à l'intérieur de la structure cellulaire. Or la réponse à cette question est pour l'essentiel inconnue (Hoffman and Crocker 2009). Le concept le plus pertinent pour l'endothélium stressé est celui d'efforts répartis par des éléments discrets du cytosquelette, capables de redistribuer spatialement les efforts mécaniques de façon inhomogène (non affine), alors qu'une certaine continuité dans la transmission des efforts est assurée au travers des interconnexions entre éléments. Cette vision a été confortée par des études expérimentales qui ont montré que le champ de déplacement à l'intérieur du cytosquelette est hautement non uniforme et ne suit pas la direction de la contrainte appliquée localement au niveau de la membrane (Helmke, Rosen et al. 2003). Ces effets distants ont été observés par d'autres auteurs qui ont utilisé des mitochondries fluorescentes comme marqueurs du réseau des microfilaments et de ses déplacements en réponse à des actions mécaniques locales induites par des microbilles revêtues de RGD (Hu, Chen et al. 2003, Hu and Wang 2006). Ces mesures sont en accord avec le concept de tenségrité qui considère en priorité le caractère structural d'un réseau d'éléments en équilibre entre tension et compression (Ingber 2006). Le fait que les effets cellulaires distants disparaissent quand les éléments en tension sont altérés par une drogue comme la cytochalasine D ou un inhibiteur du couplage actine-myosine, montre l'importance de la tension interne du cytosquelette, bien représenté par le modèle de tenségrité (Hu, Chen et al. 2003). Cette tension interne peut se trouver augmentée par la contractilité active générée par une activation plus grande des moteurs acto-myosine (Hu, Chen et al. 2003, Hu and Wang 2006).

Étude bibliographique

II. 3.3.1 Tension interne

La tension interne (noté TI ou « prestress ») est définie mécaniquement comme la tension préexistante au sein du cytosquelette avant l'application d'une force externe (Stamenovic and Wang 2000, Wang, Naruse et al. 2001, Stamenovic and Ingber 2002, Stamenovic, Suki et al. 2004). Elle résulte de l'action des forces de tension générées au sein des microfilaments d'actine contractiles (moteurs acto-myosine). Ces forces, transmises au réseau des filaments du cytosquelette en général, s'opposent aux forces de réaction du substrat transmises via la MEC au niveau des points d'adhérence focale, et aux forces de compression dans les microtubules. La tension interne peut être modifiée passivement ou activement par une déformation mécanique externe imposée.

L'idée d'un équilibre entre la TI et d'autres forces présentes dans la cellule est inscrite dans le modèle classique d'une cellule (en suspension) composée d'un cortex sous tension entourant un cytoplasme nécessairement sous pression positive (Evans and Yeung 1989). Cette idée a été reprise et transformée par Ingber (Ingber 1993) qui a suggéré que la TI du réseau cytosquelettique intracytoplasmique est équilibrée par d'autres éléments sous compression soit de ce même cytosquelette (microtubules), ou plus récemment par les éléments de la MEC. La stabilité de la forme cellulaire est conférée par cet équilibre entre des éléments soumis à des forces opposées s'exerçant au sein de l'ensemble cellule-microenvironnement. Cet auto-équilibre des forces (intégrité des tensions intérieures) est le concept fondamental gouvernant la stabilité des structures de tensegrité (utilisées communément en architecture) qui résulte seulement de l'équilibre entre les éléments sous tension (câbles) et les éléments sous compression (barres) (Wendling, Oddou et al. 1999). Les structures de tensegrité utilisées comme modèle cellulaire permettent d'appréhender la TI cellulaire (Wendling, Planus et al. 2000), par ailleurs mise en évidence par des expérimentations sur cellules adhérentes (Harris, Wild et al. 1980). Selon ce concept, la cellule serait capable de retrouver une stabilité de sa forme lorsque elle est soumise à des déformations variées grâce à une redistribution des forces au sein des éléments de la structure du cytosquelette. Le concept de tension interne permet d'expliquer les effets distants (biologiques et mécaniques) résultant d'actions locales au travers d'une mécanotransduction médiée par la tension interne (Wang, Naruse et al. 2001, Hu, Chen et

Étude bibliographique

al. 2003, Na, Collin et al. 2008). Les autres aspects liés à la tenségrité sont abordés dans les paragraphes suivants : II. 3.3.2 et II. 3.3.3.

II. 3.3.2 Modèle de tenségrité comme modèle explicatif des réponses mécanique et biologique de la cellule

Le cytosquelette cellulaire subit un remaniement constant comme le montrent les expériences de « tapis roulant » dans lesquels on identifie par extinction du marquage fluorescent un des filaments d'actine du cytosquelette que l'on suit au cours du temps (Small, Herzog et al. 1995). Ce remaniement permanent montre la façon dont la cellule répond à son environnement. La structure modifiée qui en découle résulte de nouvel équilibre qui s'installe entre les forces contractiles centripètes dues aux moteurs actomyosines (responsables de la tension interne) et les forces de compression intra et extracellulaires qui passent par les jonctions adhérentes avec l'environnement cellulaire ou matriciel. L'adaptabilité cellulaire, garante de l'intégrité cellulaire, repose donc sur cette succession d'états d'équilibre entre les grandeurs moyennes des forces de compression et les forces de tension (Chicurel, Chen et al. 1998). Ceci suppose une redistribution sur l'ensemble de la cellule comme le montre le modèle de « tenségrité » (contraction de « tensional integrity ») qui est décrit dans la Figure 22 (Ingber 1993, Coughlin and Stamenovic 1998, Wendling, Oddou et al. 1999). Au travers d'une structure de tenségrité, les forces appliquées localement sont transmises à distance et sont susceptibles d'activer des protéines cytoplasmiques et membranaires (Hu, Chen et al. 2003, Na, Collin et al. 2008). Le corolaire de cette conception structurale et mécanique de la cellule est à la base de la MTC; en stimulant spécifiquement et localement le cytosquelette, on peut localement mesurer les propriétés multi-échelles du CSK, tout en influant très peu sur ces propriétés et les mesures qui en découlent (Fereol, Fodil et al. 2008).

Étude bibliographique

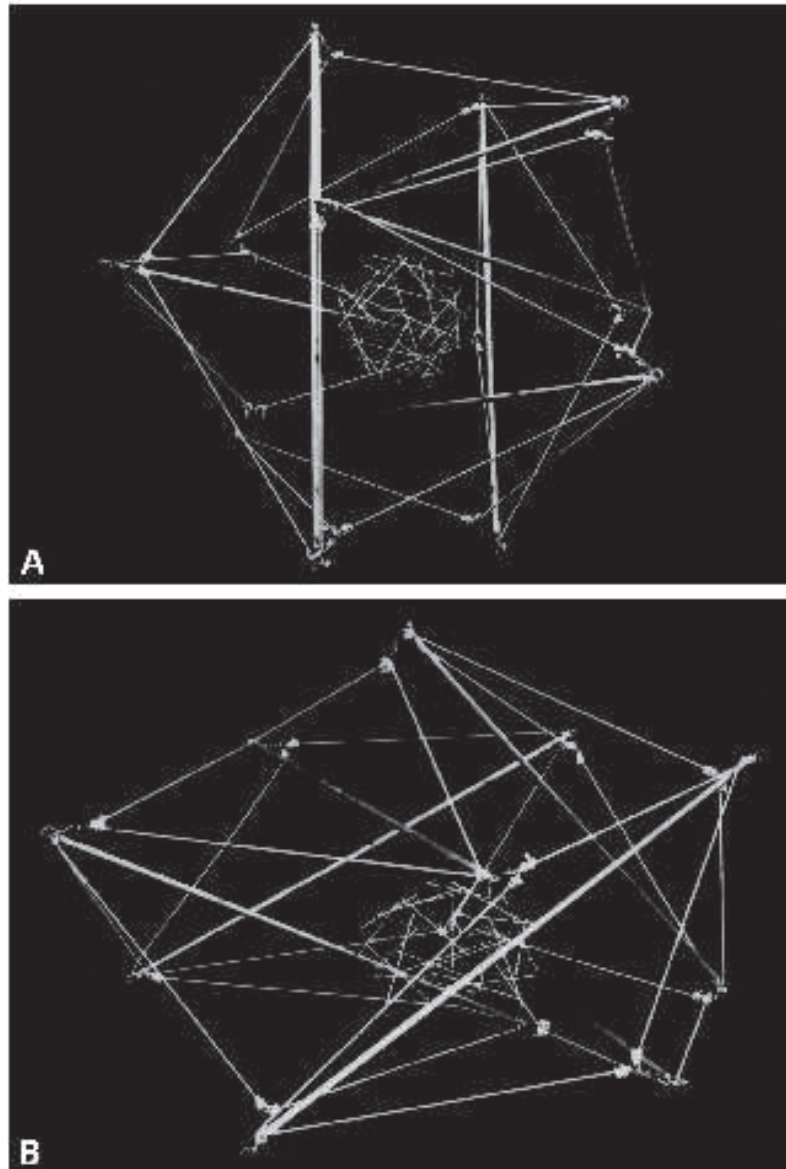


Figure 22. Représentation d'un modèle de tensegrité cellulaire avec noyau.

Ce modèle de « cellule » constituée de tiges d'aluminium liées entre elles à l'aide d'élastiques épais ; le noyau est une sphère géodésique composée de tiges de bois et d'élastiques fins ; le noyau et la cellule sont reliés à l'aide de fils noirs et non visibles ici. (A) La cellule et le noyau sont tous les deux sphériques dans le cas d'une cellule non attachée. (B) La forme de la cellule et du noyau changent tous deux lorsque la cellule est attachée à un substrat non déformable. De plus le noyau va migrer vers la base de la cellule au cours d'une grande déformation. D'après (Ingber 1993).

L'applicabilité du modèle de tensegrité pour décrire le comportement cellule continue de faire l'objet de débats (Ingber 2000). Une partie de ce débat est attribuable au manque de données expérimentales permettant une validation globale de ce modèle. Cependant le développement des techniques de micromanipulation du CSK ont rendu possible l'acquisition de données montrant des similitudes entre certains comportements cellulaires et les prédictions du modèle de tensegrité : par exemple une atteinte des

Étude bibliographique

filaments d'actine par la cytochalasine D va fortement modifier la forme et l'organisation interne de la structure d'actine cellulaire, réduire les courbures associées aux effets d'une tension interne (voir la Figure 23 adaptée de (Wendling, Planus et al. 2000)), à l'image des modifications de la structure de tenségrité induite par une diminution de la tension interne, voire la rupture des éléments en tension.

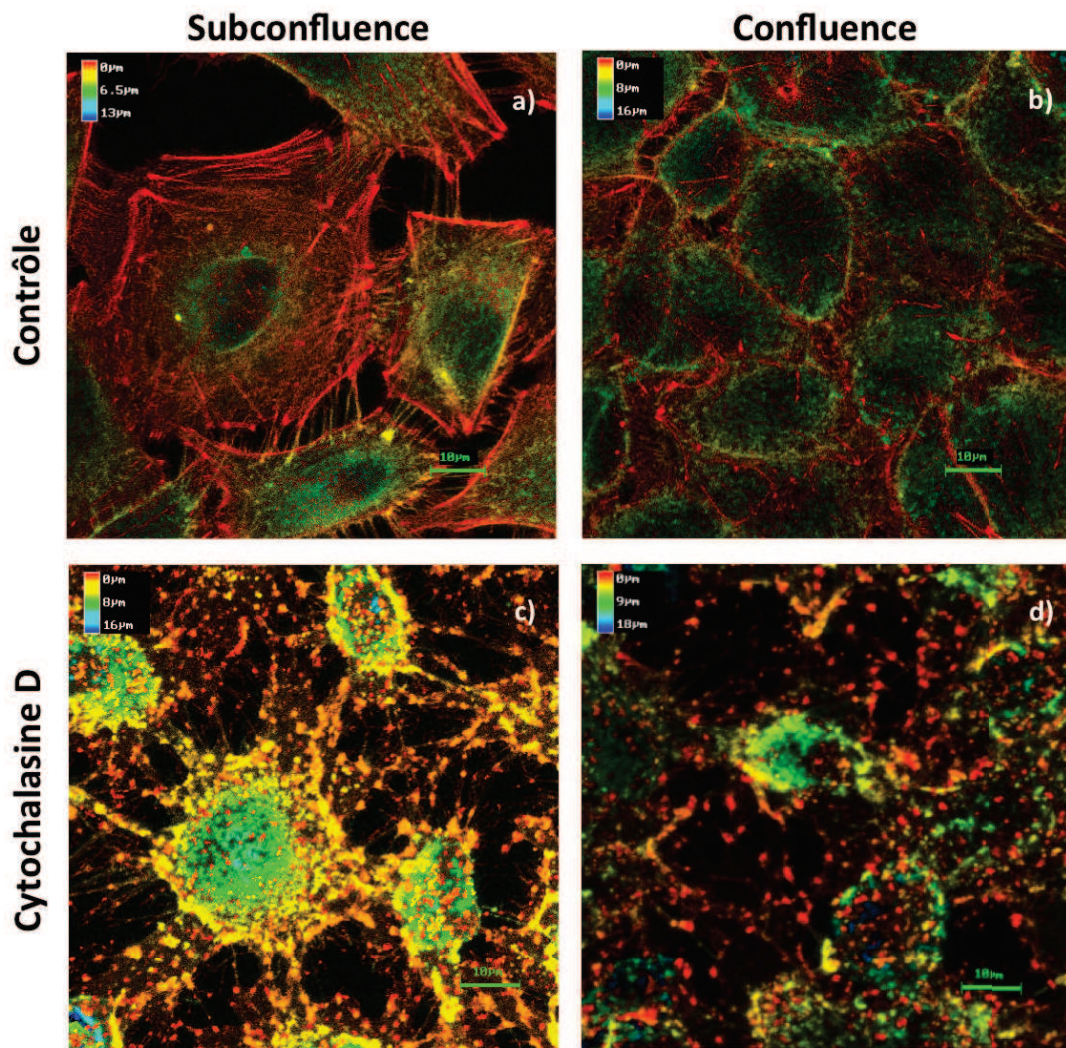


Figure 23. Visualisation de la F-actine dans les cellules A549 par microscopie confocale avec et sans traitement à la cytochalasine D.

Les A549 sont cultivées à confluence (b et d) ou à subconfluence (a et c). Les cellules sont laissées au repos (a et b) ou traitées avec 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cytochalasine D pendant 20 minutes (c et d). L'échelle de couleur (en μm) indique la position verticale de l'actine dans la cellule: en rouge l'actine au pôle basal, en bleu foncé l'actine au niveau apical (env. 16-18 μm). Adapté de (Wendling, Planus et al. 2000).

Un autre exemple est la similitude existant dans le modèle biologique et dans le modèle de tenségrité entre la rigidité cellulaire et la tension interne du cytosquelette (voir le paragraphe suivant).

Étude bibliographique

II. 3.3.3 Relation linéaire entre rigidité et tension interne dans le cytosquelette

Le mécanisme central par lequel les structures de tensegrité répondent aux forces extérieures appliquées est d'abord, le réarrangement spatial et donc géométrique des éléments (câbles et barres) dans l'espace (changements en 3 dimensions des angles et des distances entre les éléments). Plus grande est la pré-contrainte (« prestress » en anglais) dans les éléments élastiques et donc dans la structure dans son ensemble, moins le réarrangement géométrique qu'elles peuvent subir est important, et donc, plus grande sera la rigidité de la structure (Coughlin and Stamenovic 1997, Wendling, Oddou et al. 1999, Stamenovic and Ingber 2002, Wang, Tolic-Norrelykke et al. 2002, Stamenovic 2005). Les études expérimentales sur cellule adhérentes montrent qu'il existe une relation étroite entre les propriétés rhéologiques de la cellule et la pré-tension à l'image des structures de tensegrité. Cela suggère que la pré-contrainte joue un rôle déterminant dans les propriétés rhéologiques des cellules adhérentes. Une relation linéaire a été observée entre la rigidité cellulaire et la tension interne dans les cultures de cellules adhérentes et dans les structures de tensegrité (Wang, Tolic-Norrelykke et al. 2002).

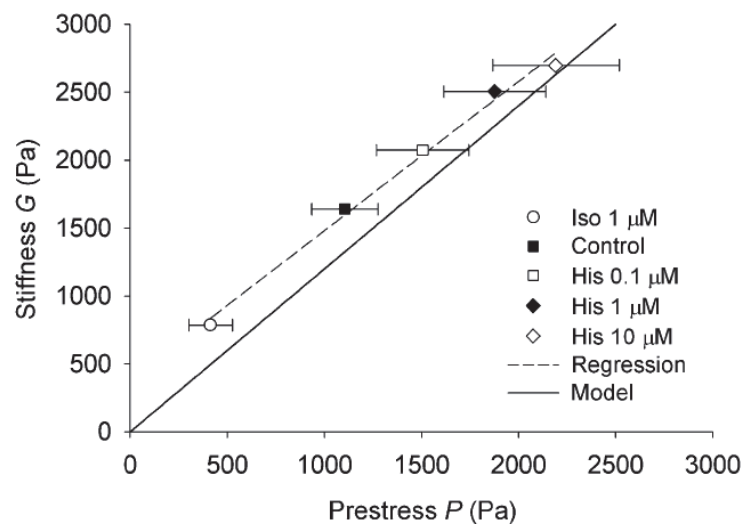


Figure 24. Relation entre rigidité (G) et la précontrainte ou prestress (P) (exprimés en Pa).

Les mesures sont faites sur des HASM dont la contractilité a été modifiée à l'aide d'histamine (His. Constricteur) ou à l'aide d'isoprotérénol (Iso. Relaxant). La rigidité a été mesurée par magnétocytométrie et la pré-tension a été mesurée par la technique de cytométrie de traction. La pente de la droite de régression est de 1,1 (ligne en pointillés) alors que le modèle de tensegrité prédit une pente de 1,2 (ligne continue) Données exprimées \pm SE. D'après (Stamenovic 2005).

Il s'agissait de cellules musculaires lisses des voies aériennes humaines notées HASM pour « human airway smooth muscle cells » considérées dont le niveau de précontraintes

Étude bibliographique

peut être modifié par des drogues. Le résultat principal de cette étude est décrit dans la Figure 24 ci-dessus. L'équipe a mesuré la rigidité du cytosquelette en fonction de la pré-contrainte calculée par intégration du champ des contraintes développées dans le substrat élastique et en changeant la concentration d'histamine (contractant) et d'isoprotérénol (relaxant).

II. 3.3.4 Rhéologie du cytosquelette

La rhéologie est l'étude de la déformabilité des matériaux mous en relation avec leur structure interne qu'il s'agisse de gels, de solutions de polymères, de suspensions colloïdales. Ils sont alors soumis à un stress mécanique, une déformation ou un mouvement de flux. Nous traitons dans le paragraphe suivant des principales méthodes utilisées pour mesurer ces propriétés mécaniques. Les premières mesures des propriétés mécaniques cellulaires ont débuté il y a plus d'une cinquantaine d'années (William 1924, Crick and Hughes 1950, Rand and Burton 1964). Depuis, les valeurs variant dans une très large gamme ont pu être mesurées sur les cellules : des plus élastiques (Theret, Levesque et al. 1988, Zahalak, McConnaughey et al. 1990), aux plus visqueuses (Valberg and Albertini 1985, Evans and Yeung 1989) en passant par les plus rigides (Hofmann, Rotsch et al. 1997) et les plus souples (Sato, Ohshima et al. 1996), reflétant les différences entre les types cellulaires, la variabilité intercellulaire, la variété des conditions de mesure, des techniques et des environnements cellulaires étudiés. Ces résultats sont ceux que l'on obtient en mesurant les propriétés du cytosquelette d'actine. La structure des filaments intermédiaires, ou encore celle des microtubules contribuent moins que l'actine à la rigidité cellulaire car leur dépolymérisation affecte moins l'élasticité cellulaire sauf si elle entraîne un réarrangement important du cytosquelette d'actine (Wang, Butler et al. 1993, Trickey, Vail et al. 2004, Takai, Landesberg et al. 2006). Le réseau d'actine est essentiel pour résister à la déformation et les mesures effectuées en AFM sur des cellules endothéliales aortiques (notées HAEC pour « Human Aortic Endothelial Cells ») donnent un module élastique égal à $5,6 \pm 3,5$ kPa au niveau des fibres de stress et de $1,5 \pm 0,76$ kPa en l'absence de fibres de stress. Le traitement par cytochalasine D (4 μ M) diminue la valeur du module à $0,89 \pm 0,46$ kPa. Ces résultats sont à mettre en relation avec des mesures effectuées sur des gels d'actine à 0,7 mg/mL liés avec l' α -actinine ou la filamine ont un module élastique d'environ 100 Pa

Étude bibliographique

(Janmey, Hvidt et al. 1990, Wachsstock, Schwartz et al. 1993). Les modèles théoriques et expérimentaux prédisent un module d'élasticité d'environ 10 kPa pour des gels d'actine concentrée à 10 mg/mL (Janmey, Euteneuer et al. 1991, MacKintosh, Kas et al. 1995). Pour réduire les causes de la variabilité des mesures de rigidité cellulaire, les auteurs vont travailler sur des cultures bien identifiées et dans des conditions expérimentales aussi comparatives que possible, aux changements près des conditions biologiques étudiées. Dans ces conditions, l'identification de cellules anormales peut alors être envisagée au travers des mesures effectuées pour une technique donnée (Guck, Schinkinger et al. 2005).

II. 3.4 Méthodes d'évaluation du cytosquelette et des molécules d'adhésion

L'étude de la réponse cellulaire au stress mécanique nécessite de contrôler les forces appliquées sur les cellules. Cela peut être effectué *in vitro* dans des modèles expérimentaux de culture cellulaire, ou dans des tissus prélevés et étudiés *ex vivo* (organes perfusés par exemple). Les techniques de micromanipulation cellulaire incluent la magnétocytométrie classique (MTC) (Wang, Butler et al. 1993) ou oscillante (OMTC), l'indentation à l'aide d'un microscope à force atomique (AFM) (Shroff, Saner et al. 1995), l'aspiration par micropipette, les pinces optiques (OT pour « optical tweezers » (Dai and Sheetz 1995)), la cyto-indentation (Shin and Athanasiou 1999), la déformation de substrat et la chambre à flux. Nous nous concentrerons sur les techniques MTC et AFM qui sont l'une et l'autre devenues des méthodes de référence pour respectivement mesurer: (i) les propriétés mécaniques du cytosquelette en raison d'une fonctionnalisation CSQ-spécifique de la bille, et (ii) les paramètres cinétiques de l'adhésion cellulaire en raison de la "microscopie de surface" permise par l'AFM.

II. 3.4.1 Magnétocytométrie classique

L'idée d'utiliser des particules magnétiques comme stimulateurs et sondes pour la mesure des propriétés de viscosité du cytoplasme des cellules vivantes a été initialement émise par les physiciens Peter Valberg et Jim Butler de Harvard University (Valberg and Butler 1987). Les premières expériences ont été réalisées sur des macrophages issus de lavages broncho-alvéolaires (noté LBA) et capables d'endocyter les billes. Elles ont permis de

Étude bibliographique

décrire les premières relations entre le déplacement mesuré des billes et le couple magnétique appliqué (Valberg and Feldman 1987). La MTC, mise au point quelques années après par Wang, Butler et Ingber (Wang, Butler et al. 1993), repose sur un concept beaucoup plus solide que le concept initial, à savoir que les propriétés viscoélastiques de la cellule peuvent être mesurées par des sondes ferromagnétiques fonctionnalisées et attachées, via la surface cellulaire, au cytosquelette au travers de récepteurs transmembranaires de type intégrines. Les différentes composantes du cytosquelette: microfilaments d'actine, filaments intermédiaires et microtubules, contribuent, avec des proportions variables, à la résistance cellulaire aux déformations imposées par les billes, mais la contribution de la structure des filaments d'actine reste prédominante sur la rigidité mesurée (Wang 1998).

La MTC proposée par Wang, Butler et Ingber a été développée pour valider la nature structurale de la réponse du cytosquelette et notamment la relation entre la rigidité et la tension interne. D'où l'idée d'appliquer des contraintes contrôlées via les récepteurs transmembranaires de type intégrines, idée que nous avons reprise au laboratoire pour stimuler directement le CSK via des récepteurs spécifiques (tels que les intégrines ou d'autres protéines transmembranaires comme ICAM (Planus, Galiacy et al. 2005)). Des techniques magnétiques dérivées de la MTC comme les pinces magnétiques ont été ultérieurement proposées. Elles utilisent les forces de traction générées par des gradients de champs magnétiques appliqués sur des billes superparamagnétiques fonctionnalisées de la même manière que les billes MTC (Alenghat, Fabry et al. 2000, Overby, Matthews et al. 2005). Les avantages des techniques magnétiques par rapport à OT et AFM sont les suivantes. Si toutes ces techniques permettent d'appliquer des forces localisées à des molécules de la surface cellulaire, la technique MTC permet (Lele, Sero et al. 2007) : (1) d'appliquer les mêmes contraintes contrôlées sur un grand nombre de cellules et de billes (des milliers voire des dizaines de milliers), (2) d'appliquer des contraintes durables pendant des heures voire des jours, (3) de stimuler mécaniquement les cellules en exerçant les forces via l'intérieur de la cellule puisque nombre de billes se trouvent enfouies dans les cellules, (4) de mesurer la réponse cellulaire en termes d'angle de rotation "moyen" ou de champ rémanent "moyen" sur la totalité de la culture, conduisant à analyser le mouvement "moyen" d'une seule bille représentative d'un ensemble dans lequel les fluctuations stochastiques sont gérées par une procédure intrinsèque à la MTC d'homogénéisation des mouvements aléatoires individuels

Étude bibliographique

(Ohayon, Tracqui et al. 2004), (5) de développer des systèmes magnétiques robustes, faciles d'utilisation et meilleur marché.

II. 3.4.2 Magnétocytométrie oscillante

La magnétocytométrie oscillante correspond à une évolution plus récente la technique initiale qui toutefois utilise le même concept à savoir une sollicitation mécanique spécifique du cytosquelette par les mêmes billes, qui sont en outre fonctionnalisées de la même manière. Dans ce cadre, le banc de MTC a été placé sous microscope pour analyser la structure locale et les réponses mécaniques et biochimiques de billes placées à certaines positions sur la surface cellulaire ou encore immergées dans le cytoplasme. A noter que l'angle d'immersion des billes dans le cytosquelette d'actine a pu être évalué à partir d'une reconstruction tridimensionnelle des plans en z obtenus par microscopie confocale (Laurent, Planus et al. 2003). Des versions modifiées de la MTC couplée avec l'imagerie cellulaire ont été développées pour (1) caractériser le comportement dynamique des cellules vivantes sur de larges gammes de fréquences (entre 0,01 Hz et 1 kHz) (Fabry, Maksym et al. 2001), (2) pour étudier la réponse MTC dans les 3 directions de l'espace (Hu, Eberhard et al. 2004) et (3) pour explorer les déplacements des éléments moléculaires dans le cytoplasme et le noyau (Hu and Wang 2006). L'intérêt de combiner la MTC avec des méthodes d'imagerie microscopique à haute résolution est de mesurer les déplacements nanométriques de la bille en conjonction avec le déplacement des éléments structuraux du cytoplasme et du noyau pour explorer comment les contraintes mécaniques sont transmises à travers la cellule et comment elles sont responsables de phénomènes de signalisation distante dans la cellule (Na, Collin et al. 2008, Na, Chowdhury et al. 2009).

II. 3.4.3 Microscopie à force atomique

La spectroscopie de force réalisée avec la microscopie à force atomique (AFM) a été appliquée dans des contextes biophysiques et cliniques à la reconnaissance moléculaire des paramètres cinétiques de l'adhésion entre protéines et ligands testés dans des environnements aussi représentatifs que possible des conditions biologiques. L'AFM est à l'origine une technique d'imagerie de surface de résolution nanométrique (Binnig, Quate et al. 1986). L'AFM est apparue progressivement comme une technique de choix pour étudier

Étude bibliographique

la structure des biomolécules isolées (Sitko, Mateescu et al. 2003, Chen, Cai et al. 2004) ainsi que pour la mesure des forces moléculaires au niveau de molécules isolées. L'utilisation d'une sonde très fine (pointe) attachée à un cantilever dont on mesure la déflexion rend possible l'étude de la surface de l'échantillon avec une résolution atomique (0,01 nm) (Chen and Gewirth 1992). Un AFM combine les avantages d'une très grande sensibilité pour la mesure des forces (en principe 10^{-2} pN), une gamme de force très large (0.001-5000 nN) et une très grande précision de positionnement (0,01 nm) (Dammer, Popescu et al. 1995). Pour les mesures des forces de liaison protéine-ligand, le ligand peut être attaché à la pointe AFM et la protéine est attachée au substrat (ou l'inverse). Les paramètres cinétiques pouvant être obtenus sont les suivants: 1) les forces de rupture, 2) les taux de dissociation (Equations I-1 et I-2), 3) les énergies de séparation. L'AFM s'avère être une technique de référence pour caractériser les liaisons protéine-protéine et protéine-ligand (Lee, Wang et al. 2007).

II. 3.5 Modèles rhéologiques

Comme tout matériau, les cellules se déforment quand des forces extérieures leur sont appliquées. Ces comportements sont décrits par les propriétés mécaniques des cellules qui sont déterminées par la composition et les structures cellulaires ainsi que par l'environnement au sens hétérogène du terme. La contribution de ces différentes composantes peut varier mais, dépendant du type cellulaire et du type d'effort appliqué, certains éléments vont dominer plus que d'autres. Les cellules déformées par une dépression créée par une micropipette vont s'écouler et ressembler à un liquide viscoélastique alors que les cellules soumises à des couples magnétiques vont plutôt ressembler à des solides viscoélastiques. Il est de plus en plus reconnu que les propriétés mécaniques du cytosquelette vont influencer non seulement sur la forme mais aussi sur la fonction cellulaire incluant l'étalement, la reptation, la polarisation cellulaires (Stossel 1993, Ingber, Prusty et al. 1995, Janmey 1998). A la différence des cellules en suspension qui ont fait l'objet des premières études et ressemblent à des milieux continus viscoélastiques et réversibles, la déformation des cellules adhérentes dépend beaucoup du cytosquelette et partiellement irréversible. En outre, la fonction des cellules adhérentes est influencée par les interactions mécaniques et biochimiques entre la cellule et son environnement (Zhu, Bao et al. 2000).

Étude bibliographique

Les premiers modèles de connaissance du comportement cellulaire sous des contraintes mécaniques sont issus de la rhéologie des matériaux viscoélastiques. Dans le modèle de Maxwell, la cellule est considérée comme un fluide viscoélastique alors que dans le modèle de Kelvin-Voigt la cellule est considérée comme un solide viscoélastique ; les modèles et leurs réponses à la déformation sont résumées dans la Figure 25.

- Le modèle de Maxwell est un modèle de fluide viscoélastique constitué par l'association en série d'une composante élastique (E) et d'une composante visqueuse (ν) qui permet un écoulement infini.

- Le modèle de Voigt est un modèle de solide viscoélastique constitué par l'association parallèle d'une composante élastique (E) et d'une composante visqueuse (ν). Il décrit de façon satisfaisante la réponse du cytosquelette lorsqu'un couple magnétique est appliquée via les microbilles ferromagnétiques fonctionnalisées pour les intégrines et donc connectées au cytosquelette d'actine (Wang, Butler et al. 1993).

- Le troisième modèle (Standard Linear Solid SLR dit de Zener) est un modèle de solide viscoélastique qui vise à prendre en compte ce que chacun des modèles séparés de Maxwell et de Kelvin-Voigt model ne prennent pas en compte, soit respectivement la réversibilité pour Maxwell et la relaxation de contrainte pour Voigt. Ce modèle a été utilisé pour analyser certaines données AFM ou d'aspiration par micropipettes.

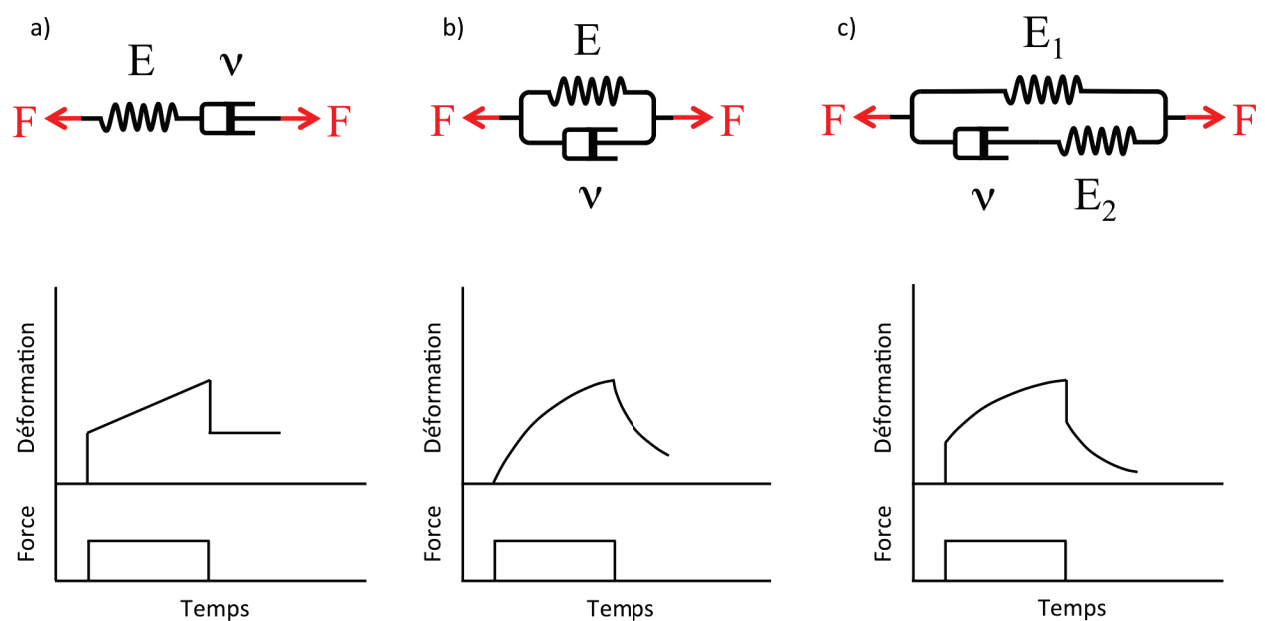


Figure 25. Représentation schématique des modèles mécaniques des matériaux viscoélastiques et de leur réponse à l'application d'une force de déformation.

Étude bibliographique

a) Modèle de Maxwell. b) Modèle de Voigt. c) Modèle de solide linéaire standard. La composante élastique de chaque modèle est représentée par un ressort (E) et la composante visqueuse est représentée par un amortisseur (ν).

Le modèle viscoélastique à deux compartiments proposé par Laurent et coll. pour décrire la réponse du cytosquelette à un échelon de stress est composé de deux compartiments en série dont chacun est un modèle solide viscoélastique. Le premier compartiment (E1) correspond au cytosquelette cortical sous membranaire à réponse rapide, le second compartiment (E2) correspond au cytosquelette profond et représente le réseau dense d'actine organisé en fibres de tension, ce compartiment est à réponse lente (Laurent, Fodil et al. 2003). La réponse du cytosquelette cortical apparaît comme rapide, de faible rigidité et peu visqueuse car le CSK cortical est constitué d'un fin réseau (0,5 à 2 μ m d'épaisseur) de soutien membranaire. La réponse du cytosquelette profond est plus lente, il est plus rigide. Il présente aussi une augmentation de la rigidité en fonction de la contrainte appliquée que l'on peut attribuer à différentes causes : structurales (Laurent, Fodil et al. 2003), matériaux (Ohayon et al 2004) ou encore artefactuelles (Fabry, Maksym et al. 1999, Maksym, Fabry et al. 2000). La dépolymérisation de l'actine affecte particulièrement le compartiment profond alors que le cytosquelette cortical est plutôt affecté par le remodelage de la MEC au travers des intégrines (Laurent, Fodil et al. 2003).

Ce modèle à deux compartiments viscoélastiques de constantes de temps et propriétés mécaniques différentes n'est pas en désaccord avec le concept de tenségrité dont la stabilité dépend de la précontrainte (Laurent, Cañadas et al. 2002). Les mesures mécaniques des composantes corticale et profonde du cytosquelette lors du traitement à la cytochalasine D suggèrent que la tension interne (ou pré-existante) dans le cytosquelette cortical est inférieure à celle du cytosquelette profond composé de fibres de stress en tension entre les sites d'adhérence. De même, les propriétés mécaniques des composantes du cytosquelette cortical et profond diffèrent grandement des propriétés du cytoplasme fluide (Zhu, Bao et al. 2000). Pour assimiler une cellule à un milieu continu, il convient que la plus petite dimension considérée soit beaucoup plus grande que les dimensions de l'espace sur lesquelles les propriétés structurales et mécaniques varient. C'est le cas si l'on considère la déformation d'une cellule en suspension à l'échelle de la cellule entière alors que son cytosquelette (structure) et son cytoplasme (liquide) ont des propriétés mécaniques très différentes. Cette hypothèse "milieu continu" n'est plus applicable quand on mesure les

Étude bibliographique

propriétés mécaniques apparentes avec des sondes de dimension submicrométriques comme celles utilisées en AFM, lesquelles révèlent en effet une certaine variabilité spatiale (Shroff, Saner et al. 1995, Hofmann, Rotsch et al. 1997).

II. 4 Interactions croisées entre les voies extracellulaires et intracellulaires

Les cellules sont capables d'exercer des forces au travers de leur cytosquelette et de s'adapter aux contraintes de leur environnement. Elles sont capables d'intégrer et de s'accorder avec les propriétés mécaniques de leurs environnements cellulaire et matriciel (Discher, Janmey et al. 2005). Par exemple, les cellules des différents tissus ne sont viables que lorsqu'elles sont en relation d'adhérence avec leur substrat (Ruoslahti and Pierschbacher 1987, Hadden and Henke 2000). Les cellules vont agir sur leur environnement en exerçant des forces de traction sur celui-ci via des sites d'adhérence dont la maturation va dépendre des forces appliquées et de la réaction de l'environnement. Pour cela, elles vont utiliser leur machinerie contractile principalement les moteurs acto-myosine et leurs liaisons cellule-MEC mettant en jeu les intégrines. Les forces de traction exercées sur leur substrat peuvent être visualisées lorsque les cellules sont mises en culture sur un gel ou sur des micropiliers (Harris, Wild et al. 1980, Oliver, Dembo et al. 1999, Tan, Tien et al. 2003).

L'imagerie cellulaire et moléculaire permet d'observer les adhésions cellulaires sur des substrats de propriétés mécaniques différentes. Sur des substrats mous ($E \approx 1$ kPa), les cellules présentent des points d'adhésion diffus sur l'ensemble de la surface de contact et ne sont pas très étalées comme nous l'avons montré pour les macrophages alvéolaires (Féréol, Fodil et al. 2006) et comme cela a été montré pour les cellules endothéliales (Yeung, Georges et al. 2005). Au contraire, sur des substrats rigides ($E \approx 30$ à 100 kPa) les cellules ont des points d'adhésion focaux bien définis et s'étalent fortement comme on peut le constater dans la Figure 26.

Étude bibliographique

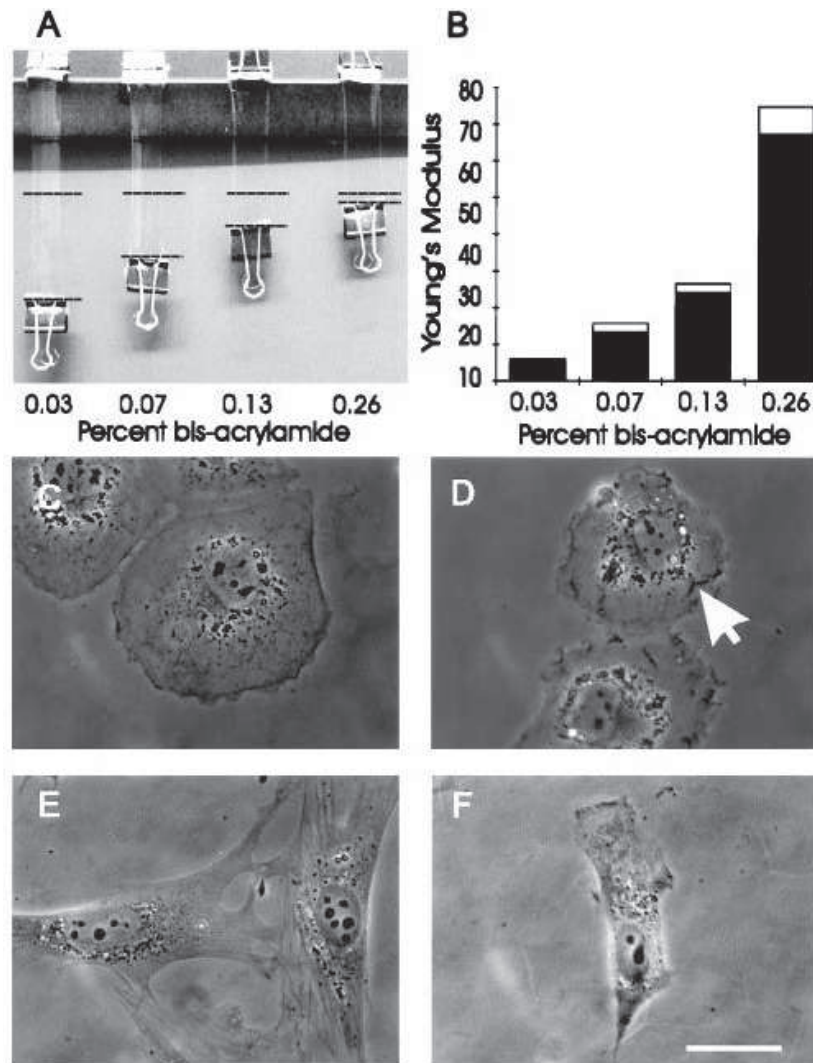


Figure 26. Propriétés mécaniques de substrats de polyacrylamide et effets de substrats sur la morphologie cellulaire.

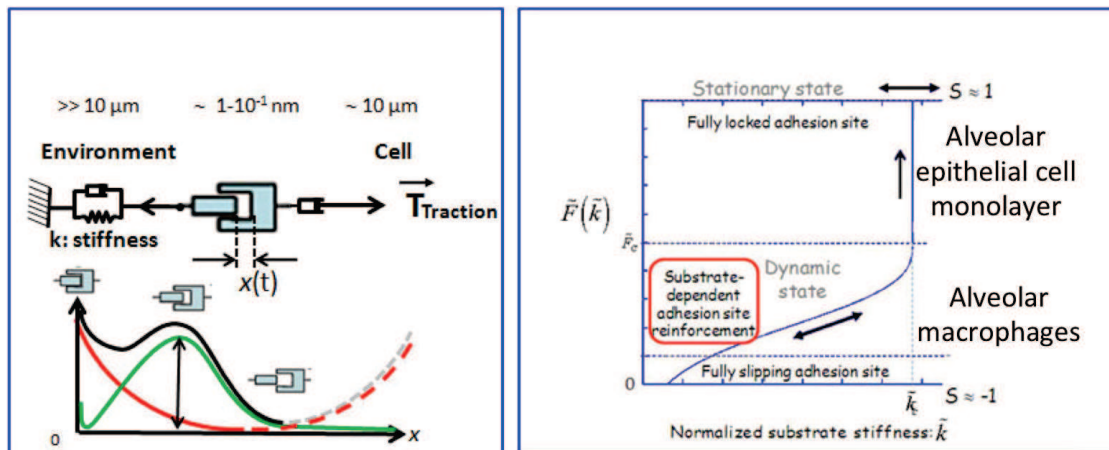
Des bandes d'acrylamide/bis-acrylamide de même taille sont étirées avec une force de 0,103 Newton (A et B). (A) Les pointillés marquent la distance d'étirement des gels. (B) Les distances d'étirements sont utilisées pour calculer le module d'Young exprimé en N/m². (C à F) Microscopie à contraste de phase montrant des cellules NRK (en C et D) ou des cellules 3T3 (en E et F) sur différents substrats : en C et E substrat rigide (0,26% bis-acrylamide), en D et F substrat mou (0,03% bis-acrylamide). Les deux types cellulaires sont moins étalés sur le substrat mou, les cellules NRK présentent des replis (indiqué par une flèche) sur le substrat mou. Barre d'échelle = 10 µm. D'après (Pelham and Wang 1997)

L'utilisation d'inhibiteurs de contraction actomyosine diminue le nombre d'adhésion focales observées sur les cellules cultivées sur des substrats rigides (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge 1996). L'hyperphosphorylation des moteurs actomyosine et des protéines d'adhésion telles que la paxilline, provoque l'établissement de jonctions d'adhésion focale même si les cellules sont cultivées sur des substrats mous. Ces expériences confirment le rôle des moteurs actomyosine et des intégrines sur la sensibilité de la cellule au substrat. C'est l'utilisation des inhibiteurs de phosphorylation de la myosine qui ont permis de

Étude bibliographique

démontrer le rôle régulateur des protéines du cytosquelette comme RhoA et les Src sur la perception des propriétés du substrat par la cellule (Pelham and Wang 1997, Griffin, Sen et al. 2004) (voir Figure 21 à la section II. 3.2.1). De cette sensibilité à l'environnement découlent la capacité cellulaire à s'adapter en tenant compte des propriétés de l'environnement (Beningo and Wang 2002, Fereol, Fodil et al. 2008). Il faut garder à l'esprit que la transmission d'information biochimiques et mécaniques entre la cellule et son environnement est toujours à double sens ; de l'environnement à la cellule et de la cellule à son environnement (Rottner, Hall et al. 1999, Féréol, Fodil et al. 2009).

Le laboratoire a développé un modèle multi-échelle de l'interaction entre les voies extracellulaires et intracellulaires (Féréol, Fodil et al. 2009). Le modèle considère un lien récepteur-ligand individuel soumis (i) du côté récepteur à une force de traction constante (T) induite par la contraction acto-myosine bien représentée par le produit: "vitesse du flux d'actine rétrograde (V_R) \times coefficient de frottement des filaments d'actine dans le cytoplasme (γ_R)", (ii) du côté ligand à une force de réaction du substrat $F_{ex}(t) = k V_R t$ où t est le temps et $k=E_S a$ avec E_S module d'Young du substrat et a une longueur caractéristique liée la dimension du site d'adhésion.



Étude bibliographique

L'équation du mouvement du filament d'actine est obtenu en écrivant l'équilibre des forces appliquées sur le lien récepteur-ligand considérant, en plus de T et $F_{ex}(t)$, la force de liaison qui dérive du potentiel chimique ($U(\rho, S)$ où ρ est une distance caractéristique et S une fonction de l'état d'activation) et la force associée au bruit thermique $f(t)$. L'équation qui régit le modèle est une équation de Langevin qui fait apparaître que l'énergie élastique du substrat vient moduler le potentiel chimique d'interaction. La conséquence est une modification de la force de rupture du lien avec les propriétés mécanique de l'environnement ainsi que la tension intracellulaire, qui apparaissent dans l'expression du « loading rate ». Ceci qui revient à dire que la maturation du site d'adhésion composé de plusieurs de ces liens récepteur-ligand va dépendre de la rigidité du substrat E_s et/ou de la tension interne représentée par V_R . Ce modèle explique à la fois les différences de sensibilité entre macrophages alvéolaires et cellules épithéliales en monocouche ainsi que les raisons d'une maturation des sites d'adhésion dépendant de la rigidité de l'environnement et de la tension interne intracellulaire (Féréol, Fodil et al. 2009).

II. 5 Nos objectifs

Sur la base des connaissances acquises sur les cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires et du rôle du cytosquelette et des protéines de jonction sur la fonction cellulaire et notamment la sensibilité cellulaire aux contraintes mécaniques (notamment environnementales), nous avons émis l'hypothèse que toute modification de la balance des forces intra et intercellulaires au sein de l'ensemble cytosquelette-matrice était susceptible de modifier la fonction cellulaire et notamment la perméabilité de la couche endothéliale.

Afin de valider cette hypothèse, nous nous sommes fixés 3 objectifs principaux :

- 1) Modifier le niveau de tension intracellulaire en appliquant un stress mécanique spécifiquement dirigé, via les intégrines, vers le cytosquelette des cellules endothéliales (définir un modèle d'endothélium stressé mécaniquement)
- 2) Décrire les modifications structurales et moléculaires associées à ces modifications de la tension intracellulaire, notamment remaniement (réarrangement structural) des éléments du cytosquelette et remodelage (redistribution spatiale) des protéines d'adhésion (caractériser la relation entre modification des propriétés mécaniques des cellules stressées et réarrangement structural et moléculaire).
- 3) Evaluer les conséquences de ces modifications mécaniques et structurales sur la fonction cellulaire et notamment la perméabilité de la monocouche cellulaire endothéliale (caractériser les relations croisées : structure-fonction-tension intracellulaire).

Matériel et Méthodes

III. Matériel et Méthodes

Nous présentons dans ce chapitre l'ensemble des méthodes qui ont été utilisées, adaptées ou développées pour être mises en œuvre dans le cadre de cette thèse.

III. 1 Outils biologiques et d'imagerie

Les réactifs utilisés dans les expériences ont été acquis auprès de Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO ; USA) sauf mention spécifique.

III. 1.1 Culture cellulaire

Les cellules choisies pour constituer le modèle d'endothélium microvasculaire pulmonaire soumis au stress mécanique sont les cellules primaires microvasculaires pulmonaires humaines (ou Human Pulmonary Microvascular Cells : HPMEC) (Promocell GmbH, Allemagne).

Les toutes premières mises au point ont été réalisées sur des cellules endothéliales issues de cordon (noté HUVEC pour Human Umbilical Vein Endothelial Cells) (Lonza Group Ltd., Suisse)

Le fait d'utiliser des cellules primaires nous permet de conserver une sensibilité cellulaire plus proche des conditions cliniques que l'utilisation de lignées. Ce choix présente néanmoins quelques inconvénients. Contrairement aux lignées cellulaires, ces cellules primaires ne peuvent se diviser qu'un nombre fini de fois qui dépend de leur état physiologique, de leur maturité, etc. De plus, elles cessent de croître lorsqu'elles sont confluentes. Seules les cellules entre les passages 3 et 9 ont été utilisées pour réaliser les manipulations présentées dans cette thèse. Il est à noter qu'une variabilité considérable apparaît dans les résultats obtenus entre les différents lots de cellules.

Les milieux de culture cellulaire ont été acquis auprès de Promocell (Promocell GmbH, Allemagne).

Les HPMECs sont mises en culture dans des flasques plastiques traitées pour l'adhésion cellulaire (25 ou 75 cm² ; Techno Plastic Products AG, Suisse). Le milieu de culture

Matériel et Méthodes

utilisé pour l'amplification cellulaire est le MV2 (Endothelial Cells Growth Medium MV2 Kit) contenant 5% de sérum. Elles sont décollées à l'aide de trypsine-EDTA (invitrogen, USA) à subconfluence et centrifugées à 200g dans du milieu à 10% de sérum. Le culot cellulaire est resuspendu dans le milieu MV2 à 5% de sérum etensemencées dans de nouvelles flasques pour amplification ou sur les supports spécifiques à chaque type d'expérience et cultivées jusqu'à confluence. Les milieux sont changés toutes les 24 à 48 heures.

III. 1.2 Perméabilité

Un gel de matrice extra cellulaire (ECM Gel) déposé sur des inserts Transwell® (Transwell Permeable Supports, Corning, France). Ce dépôt ou coating est effectué à froid (0 à 8°C) sur chaque filtre, et l'excès est aspiré afin de laisser un film fin. Les plaques avec les inserts "coatés" sont incubées 1h à 37°C afin de laisser la MEC polymériser (polymérisation à partir de 15-20°C). La membrane des inserts possède des pores calibrés de 0,4 µm de diamètre empêchant le passage des cellules mais permettant le passage des solutés. Les inserts sont suspendus dans les puits, créant ainsi un compartiment apical et un compartiment basal (voir Figure 28).

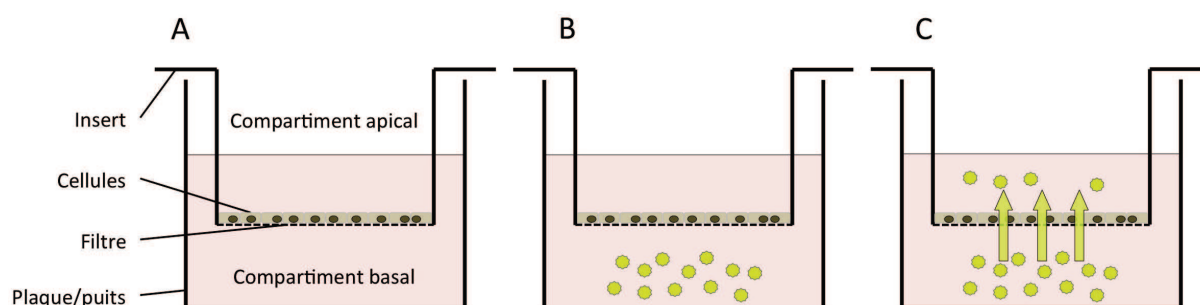


Figure 28. Schéma de la culture des cellules sur les inserts perméables.

A) Les cellules sont cultivées jusqu'à atteindre la confluence sur les inserts. B) Pour les expériences de perméabilité le dextran-FITC est ajouté au compartiment basal. C) Diffusion du dextran au travers de la monocouche de HPMEC ; des échantillons de milieu sont prélevés à différents temps dans le compartiment apical.

Les HPMEC sontensemencées sur les inserts à une densité de 2×10^4 à 4×10^4 cellules/cm², un secondensemencement est effectué 24 heures après à une densité de 2×10^4 à 4×10^4 cellules/cm². Le doubleensemencement de chaque insert permet d'obtenir un tapis cellulaire à confluence, plus dense qu'avec un seulensemencement. Une fois à

Matériel et Méthodes

confluence les cellules sont « starvées » au minimum 24 heures avant les expériences dans un milieu dépourvu de VEGF et appauvri contenant 1% de sérum (noté MV1 ; Endothelial Cells Growth Medium MV Kit).

Le jour de la manipulation les billes sont démagnétisées et fixées 45 minutes aux cellules et l'excédent est rincé au MV1 (voir protocole détaillé dans les sections III. 2.2.3.1 et III. 2.2.3.2 ci-dessous). Au besoin les cellules sont traitées en les exposant 10 minutes au Y27632 ou au ML9, puis elles sont rincées 3 fois au MV1. Le Y27632 est utilisé à 10 μM , il inhibe la Rho kinase (Ki RhoKinase= 0.14 μM) ; le ML9 est utilisé à 15 μM , il inhibe la MLCK (Ki MLCK= 4 μM).

Le dextran-FITC de 3kDa est dilué à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans du milieu MV1 et ajouté dans le compartiment basal (Figure 28-B). 20 μL de milieu sont prélevés à différents temps dans le compartiment apical (Figure 28-C). Les échantillons sont ensuite dilués au 1/300^e analysés à l'aide d'un fluorimètre (LS50B ; Perkin Elmer, France) et du logiciel FL Winlab (Ver.: 4.00.03 ; Perkin Elmer, France). La valeur de luminosité mesurée est exprimée en unités arbitraires.

III. 1.3 Etude d'expression protéique

III. 1.3.1 Western blot

III. 1.3.1.1 Traitements des échantillons

Après avoir été rincées à 2 reprises dans du PBS, les cellules sont lysées dans 200 μL de tampon de lyse cellulaire pendant 10 minutes à 4°C (Cell Lysis Buffer, Cell Signaling) supplémenté avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases et un inhibiteur de phosphatases, le fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF). Le tampon de lyse cellulaire contient les éléments suivants : 20mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM de NaCl, 1mM d'EDTA et EGTA, 1% de Triton X-100, 2.5mM de pyrophosphate de sodium, 1mM de β -glycérophosphate, 1mM d'orthovanadate de sodium Na₃VO₄, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptine. Après incubation, l'échantillon est collecté puis passé au moins 10 fois dans une seringue à cathéter de 26G (disruption des structures membranaires résiduelles), puis centrifugé 15 minutes à 12 000 x *g*. Le surnageant est collecté puis stocké à -80°C jusqu'à utilisation.

Matériel et Méthodes

III. 1.3.1.2 SDS-PAGE

La concentration en protéines présentes dans le lysat cellulaire est évaluée grâce au kit de dosage colorimétrique BCA (Pierce Technology, Rockford, USA). Le réactif utilisé est l'acide bicinchoninique. La réaction chimique consiste à incuber l'échantillon de protéines en présence d'une solution de cuivre (II) et de BCA, les protéines ont la capacité de réduire le cuivre (II) en cuivre (I) qui interagit avec le BCA pour former un composé pourpre. L'intensité de coloration ainsi obtenue est donc proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon.

Chaque mesure est réalisée en duplicats sur 10 μ L d'échantillon en présence de 200 μ L de réactif BCA/cuivre (II), le mélange est incubé 30 minutes à 37°C à l'obscurité en microplaque 96 puits. Après incubation, la plaque est refroidie à la température de la pièce et l'absorbance est mesurée à 562nm (possible entre 540nm et 592 nm) sur un spectrophotomètre POLARstar Optima (BMG Labtech GmbH). La concentration en protéines est évaluée en réalisant une gamme d'étalonnage à l'aide d'une protéine de référence (ici Albumine Sérique Bovine, BSA). La droite d'étalonnage est établie par régression linéaire à 4 paramètres à l'aide du logiciel fourni avec l'appareil. Les concentrations calculées sont exprimées en μ g/ μ L. La limite de linéarité de ce dosage est comprise entre 0.125 μ g/ μ L et 2 μ g/ μ L.

A un volume de 25 μ L d'extrait protéique de concentration connue sont ajoutés 5 μ L de tampon de charge 6X contenant 375mM de Tris-HCl, 12% de SDS, 50% de glycérol, 300nM de DTT et 0.2% de bleu de bromophénol. Les échantillons sont ensuite dénaturés à 98°C pendant 5 minutes. Un marqueur de poids moléculaire (All Blue[®], Biorad) est déposé sur chaque gel afin de vérifier la taille de la protéine d'intérêt. La séparation des protéines est réalisée par électrophorèse en conditions dénaturantes selon la méthode de Laemmli dans un gel de polyacrylamide en présence de SDS (gel de séparation à 10 ou 12,5% d'acrylamide/bisacrylamide selon la protéine étudiée). Les échantillons sont soumis à une migration à voltage constant (150 Volts) pendant 1 heure.

Matériel et Méthodes

III. 1.3.1.3 Electro-transfert sur membrane et révélation

Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de fluorure de polyvinylidène (PVDF, Biorad) dans une cuve de transfert (Biorad) contenant un tampon de transfert (25mM de Tris-Base, 192mM de glycine et 20% de méthanol) pendant 1 heure à 100 Volts. La membrane est ensuite saturée 1 heure dans un tampon Tris-Buffered Saline-Tween TBST (25mM Tris-Base, 150mM NaCl, 0,05% Tween® 20) contenant 5% de BSA. La membrane est ensuite rincée 5 fois 10 minutes par du tampon TBST puis incubée sur la nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire (IgG) (voir Tableau 5) dirigé contre la protéine d'intérêt et dilué dans du TBST contenant 5% de BSA.

Après incubation avec l'anticorps primaire, la membrane est lavée 5 fois 10 minutes avec du tampon TBST puis incubée 1 heure à température ambiante en présence d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase de Raifort dirigé contre l'anticorps primaire et dilué dans du TBST contenant 5% de lait écrémé en poudre. La membrane est lavée 5 fois 10 minutes dans du TBST puis révélée sur une station d'imagerie G :Box Chemi-XT4 (Syngene, USA) avec un substrat chimioluminescent de la peroxydase de Raifort (GE Healthcare, USA). Les intensités lumineuses des protéines d'intérêt sont rapportées à celles correspondant à l'actine.

Protéine cible	Type d'anticorps	Espèce	Fournisseur de l'anticorps	Facteur de dilution
VE-cadhérine	Primaire monoclonal	Souris	R & D	10 ³
Sous-unité α_v de l'intégrine	Primaire polyclonal	Lapin	R & D	10 ³
Sous-unité β_3 de l'intégrine	Primaire polyclonal	Lapin	R & D	10 ³
β -Actine	Primaire monoclonal	Souris	Cell Signaling	5×10 ³
Anti-souris couplé HRP	Secondaire polyclonal	Ane	Cell Signaling	5×10 ³
Anti-souris couplé HRP	Secondaire polyclonal	Chèvre	Cell Signaling	5×10 ³
Anti-lapin couplé HRP	Secondaire polyclonal	Ane	Cell Signaling	5×10 ³

Tableau 5. Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés en western blot.

III. 1.3.1.4 Analyse densitométrique

Les images générées lors de la révélation sont analysées à l'aide du logiciel d'analyse Image J (Open source, NIH, USA). L'intensité des bandes est quantifiée et convertie en valeurs

Matériel et Méthodes

numériques (unités arbitraires). Les analyses densitométriques sont ensuite représentées en exprimant le rapport suivant pour un échantillon donné :

$$\frac{\text{Densité de la protéine d'intérêt}}{\text{Densité de l'actine}}$$

III. 1.4 Immunofluorescence et imagerie

III. 1.4.1 Immunofluorescence

L'immunofluorescence est une technique d'immunomarquage utilisée en biologie pour mettre en évidence par microscopie optique ou confocale, les biomolécules d'intérêt présentes à la surface d'une cellule ou au niveau intracellulaire. Elle repose sur la complémentarité d'un anticorps pour son antigène cible.

Les marquages sont réalisés immédiatement après les expériences de magnétostimulation avec une première étape de fixation des cellules au paraformaldéhyde à 4% pendant 15 minutes. Les cellules sont perméabilisées 3 minutes à l'aide de Triton X100 à 0,2% afin de permettre le passage des anticorps au sein du cytoplasme. La troisième étape consiste à bloquer les sites aspécifiques pendant 30 minutes à 37°C à l'aide des anticorps présents dans du sérum de chèvre (Goat Serum : GS) dilué à 10% dans du PBS (Invitrogen, USA). Selon le marquage désiré les anticorps primaires utilisés sont soit un anticorps de souris anti-VE-Cadherin humaine soit un anticorps de souris anti-intégrine $\alpha_v\beta_3$ (R&D, France) ; ils sont dilués dans du PBS et GS à 5% et incubés 1 heure à 37°C. Les échantillons sont ensuite rincés à l'aide de PBS et GS à 5%.

Les anticorps secondaires utilisés sont dirigés contre les épitopes des anticorps primaires et sont couplés à un fluorochrome (Alexa 488) (Invitrogen, USA) ; ils sont dilués dans du PBS et GS à 5% et incubés 45 minutes à 37°C à l'abri de la lumière. Les échantillons sont rincés 3 fois 5 minutes et le cytosquelette d'actine est marqué à la rhodamine-phalloïdine dilué au 1/1000 dans du PBS et GS à 5% durant 20 minutes. Les échantillons sont rincés 3 fois 5 minutes et sont montés entre lame et lamelle dans un milieu de montage (Vectashield ; Vector, USA) pour observation.

III. 1.4.2 Microscopie confocale

Le principe du microscope confocal est illustré sur la Figure 29. Un mince faisceau laser, émettant généralement dans le domaine du visible ou de l'ultraviolet, est focalisé à l'aide d'un objectif sur l'échantillon marqué par les fluorochromes préalablement choisis en fonction de leurs propriétés à se fixer sur les molécules d'intérêt. Ce faisceau laser va exciter ces fluorochromes en un point de l'échantillon, le signal lumineux émis en ce point est récupéré sur un photomultiplicateur. La fluorescence est excitée sur la totalité du trajet du faisceau dans l'échantillon, les plans inférieurs et supérieurs au plan de focalisation émettent un signal indésirable. Afin d'en éliminer la majorité, un diaphragme variable appelé sténopé ou « pinhole » est placé avant le détecteur dans le plan focal image de l'objectif de microscope. Il permet de sélectionner les rayons émis par un seul plan de la préparation et d'éliminer le signal provenant d'autres plans. La résolution spatiale maximale est obtenue par l'ajustement du diamètre du diaphragme à iris à la limite de diffraction. L'image est construite point à point par balayage (X, Y) du champ à l'aide de miroirs de déflexion de la source lumineuse.

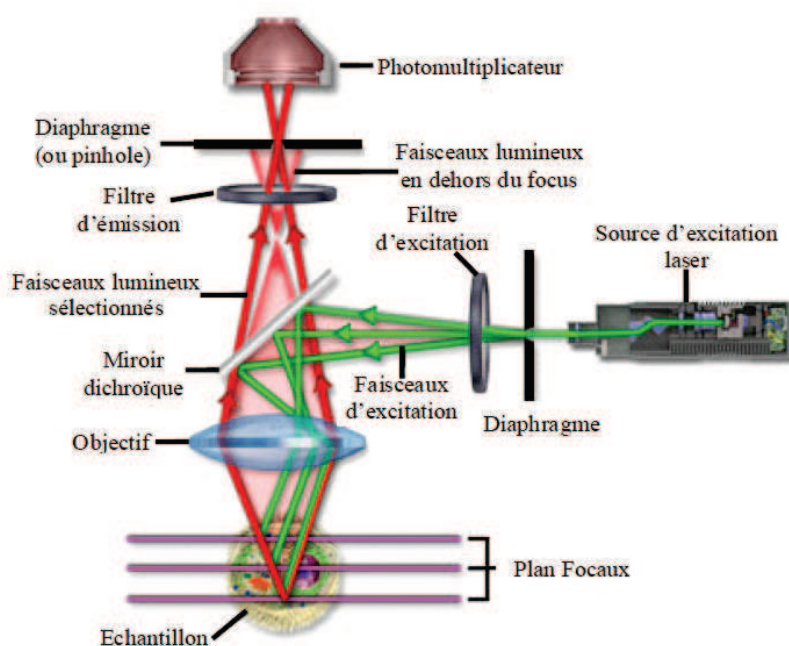


Figure 29. Principe de la microscopie confocale permettant l'obtention d'un empilement d'images dans différents plans focaux.

Les échantillons sont observés grâce à un microscope confocal LSM 410 (Zeiss, France) équipé de LASER Helium, Néon et Argon, et à l'aide d'un objectif $\times 40$ à air ou $\times 63$ à

Matériel et Méthodes

immersion à huile. Les champs observés ont été sélectionnés au hasard dans les échantillons. L'épifluorescence est détectée pour l'excitation à 488 nm avec une ré-émission à 515-520 nm (vert) ainsi que pour une excitation à 543 nm avec une ré-émission à 570 nm (rouge). Les sections optiques d'une épaisseur de 0,3 à 0,5 μm sont réalisées de la face basale à la face apicale des cellules

III. 1.4.3 Analyse d'images et quantification

Les images obtenues en microscopie confocale sont d'abord déconvoluées à l'aide d'un module spécifique du logiciel Amira 5.2 (Visage Imaging, San Diego, CA). La même correction de l'intensité lumineuse a été appliquée à toutes les piles d'images (z-stack). Une vue projetée est réalisée à partir du z-stack pour les longueurs d'ondes observées. Les images sont ensuite seuillées avec le logiciel Image J (Open source, NIH, USA) avec une valeur de référence de 40 (i.e. entre 0 et 255). La quantification des clusters d'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est effectuée en comptabilisant les régions d'une surface strictement supérieure à 40 pixels.

III. 2 Outils de mesure et de stimulation mécanique

III. 2.1 Techniques de micromanipulation cellulaire

Cette partie concerne les techniques mises au point au sein du Laboratoire et qui ont été mises en œuvre dans ce travail de thèse pour permettre la micromanipulation des cellules endothéliales en monocouche. La mesure des propriétés mécaniques a été faite par magnétocytométrie (MTC) sur la composante réversible du signal MTC suivant en cela une approche classique. La composante non réversible a été pour la première fois analysée avec des outils théoriques décrivant *in fine* la probabilité de détachement en réponse au cisaillement des liens moléculaires induits par le couple magnétique appliqué. Ceci a permis d'estimer les paramètres cinétiques de l'adhésion matricielle, la bille étant vue par la cellule comme une mini matrice par laquelle transitent les forces de cisaillement conduisant au détachement partiel des liens.

III. 2.2 Magnétocytométrie

III. 2.2.1 Principe de la Magnétocytométrie

La magnétocytométrie (MTC) donne classiquement une mesure des propriétés mécaniques des cellules adhérentes à partir de la mesure de la déviation angulaire de billes ferromagnétiques (fermement attachées à des mécanorécepteurs transmembranaires de type intégrines) en réponse à un couple magnétique appliqué sur ces billes. Cette technique comprend 3 étapes (Figure 30).

La première étape consiste à lier aux cellules des microbilles (diamètre 4,5 μm) ferromagnétiques fonctionnalisées avec un peptide synthétique RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique) (Ac-G(dR)GDSPASSK(G)₄S(dR)(L)(dR)-NH₂; PepTite-2000; les initiales en majuscules correspondent aux acides aminés) reconnu comme ligand matriciel par les intégrines cellulaires, récepteurs transmembranaires qui sont en relation avec le cytosquelette au travers des sites d'adhésion. Ces cellules sont cultivées à confluence dans des puits de 0,32 cm² de surface (\approx 50000 cellules par puits)

La seconde étape consiste à magnétiser les microbilles selon le plan de culture à l'aide d'un champ magnétique élevé et transitoire (150 mT durant 150 μs).

La troisième étape consiste à appliquer à ces billes un couple magnétique au moyen d'un second champ magnétique uniforme perpendiculaire au premier et d'intensité beaucoup plus faible (entre 1 et 6mT) sous forme d'un plateau d'une durée d'une minute. Ce plateau est établi via une rampe de pente positive de 400 ms et disparaît avec une rampe de pente négative en 1000 ms. Au cours de cette étape, les microbilles ont tendance à tourner plus ou moins pour tenter de s'aligner avec le champ magnétique perpendiculaire. La déviation angulaire de cette rotation dépend des propriétés mécaniques de la cellule.

Matériel et Méthodes

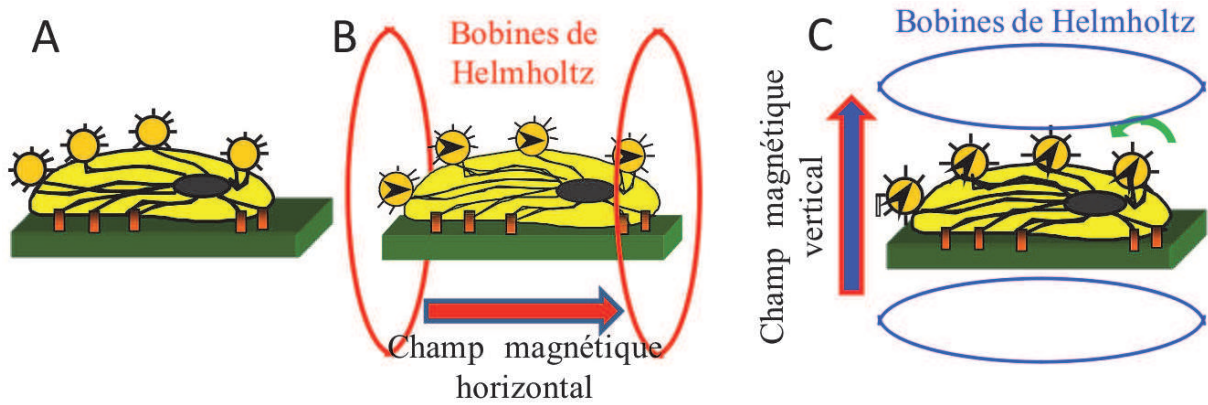


Figure 30. Les 3 étapes de la magnétocytométrie.

A) les microbilles ferromagnétiques sont fixées aux cellules (reliées au cytosquelette via des récepteurs transmembranaires de type intégrines spécifiques du réseau d'actine). B) les billes sont magnétisées dans le plan de la culture par un champ magnétique bref mais puissant (150 mT). C) les billes sont soumises à un champ magnétique vertical de faible intensité (6 mT). Le couple généré par ce champ sur les billes entraîne une rotation de ces dernières dont l'amplitude dépend des caractéristiques mécaniques du CSK

III. 2.2.2 Dispositif expérimental

Le banc expérimental (Figure 31) est composé d'un puits de culture cellulaire (diamètre 6 mm), d'un système de magnétisation des microbilles, d'un système permettant de créer un champ magnétique uniforme et perpendiculaire au plan de culture des cellules, d'un dispositif de mesure du champ rémanent des microbilles, d'un système de traitement du signal ainsi qu'un dispositif d'acquisition des signaux et enfin d'un programme spécifique d'analyse des données.

Le champ magnétique perpendiculaire est obtenu via un système de bobines de Helmholtz. Ces bobines de Helmholtz ont un diamètre de 62 mm, elles sont composées chacune de 7 spires de fil de cuivre vernis (de section 1,8 mm) et sont distantes d'environ 31 mm. L'utilisation de ce type de bobines permet de garantir l'uniformité d'un champ magnétique au niveau du puits de culture. Le champ magnétique généré par les bobines au niveau du puits cellulaire peut être calculé théoriquement via la loi de Biot et Savart et dépend de l'intensité du courant traversant les bobines, du nombre de spires et du rayon des bobines. Pratiquement une calibration a été effectuée en utilisant un capteur à effet Hall pour déterminer la relation entre l'intensité du courant et le champ magnétique (H_{\perp}).

$$H_{\perp} = B_{\perp} / \mu_0 = I(A) \times \frac{63 \cdot 10^{-4} / (4\pi \cdot 10^{-07})}{15} \text{ A} \cdot \text{m}^{-1} \text{ Eq II.1 ; } I \text{ est l'intensité du courant en ampère}$$

et μ_0 la perméabilité magnétique du vide.

Matériel et Méthodes

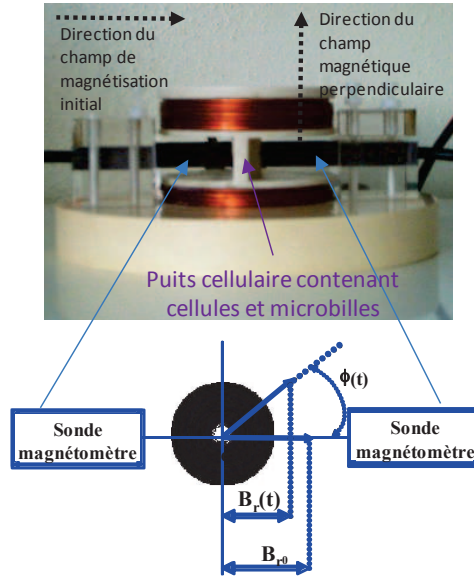


Figure 31. Magnétocytométrie : en haut, dispositif ; en bas, principe de la mesure de déviation angulaire.

La mesure par un magnétomètre (Magnetoscop 1.068 Forster, Allemagne) de la projection dans le plan des sondes du champ rémanent des microbilles permet d'évaluer la déviation angulaire des billes. En effet si avant l'application du champ magnétique vertical le champ rémanent des billes est B_{r0} , le champ rémanent lorsque les billes sont mises en rotation est :

$$B_r(t) = B_{r0} \cdot \sum_{i=1}^n \frac{m_i \cdot \cos \phi_i(t)}{m_{tot}} = B_{r0} \cdot \langle \cos \phi_i(t) \rangle \quad \text{Eq II.2}$$

Où m_i désigne le moment magnétique de la bille i , m_{tot} le moment magnétique de l'ensemble des billes, ϕ_i l'angle de rotation de la bille i et n le nombre de billes dans le puits de culture. En supposant que toutes les billes tournent approximativement du même angle ϕ , l'estimation du déplacement angulaire moyen des microbilles induit par l'application du champ magnétique perpendiculaire peut approximativement être donnée par le rapport :

$$\phi(t) = \text{Arcos} \left(\frac{B_r(t)}{B_{r0}} \right) \quad \text{Eq II.3}$$

Le champ rémanent mesuré est extrêmement faible (de l'ordre du nT) inférieur de plus de 3 ordres de grandeur au champ magnétique terrestre. De plus, ce champ rémanent est extrêmement bruité par les sources magnétiques extérieures (appareils électriques environnants) ou intérieures (échauffements des bobines modifiant la géométrie du système bobines + sonde). De telles conditions ont rendu nécessaire l'utilisation d'une détection

Matériel et Méthodes

synchrone (Lock-in Amplifier, SR 830 DSP Stanford Research systems, USA) pour réduire au maximum le bruit magnétique environnant. Très brièvement la détection synchrone consiste à faire osciller le signal recherché à une fréquence connue (ici 10 Hz), alors que le bruit lui est supposé n'avoir pas de composante à cette fréquence. L'utilisation d'un filtre passe bande centré sur cette fréquence permet alors d'extraire le signal recherché du bruit. L'oscillation du signal est obtenue par rotation du puits cellulaire (Figure 32).

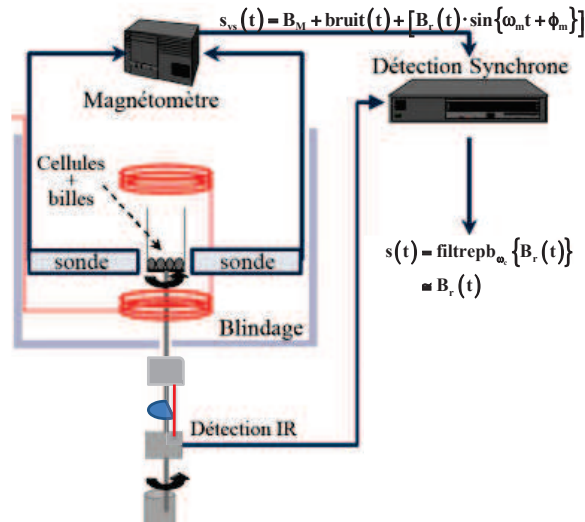


Figure 32. Magnétocytométrie : dispositif de la détection synchrone.

Les billes (Spherotech, USA) constituées d'un cœur de polystyrène recouvert d'oxyde de chrome (Cr_2O_3) ont un diamètre moyen de $4,5 \mu\text{m}$. Leur moment magnétique a été déterminé par calibration en utilisant la méthode de Föner (cf. Thèse V Laurent 2000).

$$m = 2,3 \cdot 10^{-13} \text{ A} \cdot \text{m}^2$$

Le couple magnétique exercé sur une bille est donné par :

$$\vec{C}(t) = \mu_0 \cdot \vec{m} \wedge \vec{H}_\perp(t) \quad t \text{ est le temps}$$

$$C(t) = \mu_0 \cdot H_\perp \cdot m \cdot \frac{B_r(t)}{B_{r0}} \quad \text{Eq II.4}$$

$$\text{avec } \mu_0 = 4 \cdot \pi \cdot 10^{-7} \text{ N} \cdot \text{A}^{-2}$$

Si on se place dans des conditions quasi-statiques, en négligeant l'inertie de la bille de masse négligeable, ce couple magnétique doit toujours être contrebalancé par le couple viscoélastique exercé par le milieu intracellulaire sur la bille (Laurent, Henon et al. 2002). Le rapport direct entre le déplacement (rotation angulaire de la bille) et ce couple viscoélastique donne la raideur apparente du milieu cellulaire mais ne donne pas le module

Matériel et Méthodes

élastique vrai qui nécessite la connaissance précise de la contrainte exercée par le milieu sur la bille. Les auteurs ont montré que cette contrainte dépendait non seulement du rayon de la bille (Laurent, Henon et al. 2002) mais aussi de son angle d'enfouissement et de la hauteur de cellule restant sous la bille (Mijailovich, Kojic et al. 2002). En utilisant une approche tridimensionnelle par éléments finis Ohayon et coll. (Ohayon and Tracqui 2005) ont établi un abaque général permettant d'introduire un coefficient de correction (C_{cor}) prenant en compte l'effet de la hauteur de la cellule ainsi que le degré d'enfouissement de la bille dans la cellule pour le calcul de la contrainte.

La contrainte est alors donnée par :

$$\sigma(t) = \frac{\mu_0 \cdot H_{\perp} \cdot m \cdot (B_r(t)/B_{r0})}{\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot R^3 \cdot C_{cor}} \quad \text{Eq II.5}$$

III. 2.2.3 Protocole cellulaire

Les cellules sontensemencées à une densité de 10×10^3 cellules/cm² dans des puits en polycarbonate traité pour l'adhérence (Corning Costar, Allemagne) et mises en culture jusqu'à obtenir une monocouche confluente, le milieu de culture MV2 est changé toutes les 24 à 48 heures.

III. 2.2.3.1 Fonctionnalisation des microbilles

Les billes (Spherotech, USA) sont prétraitées par le constructeur. Elles présentent à leur surface des groupements COOH. Les microbilles sont fonctionnalisées à l'aide d'un peptide RGD. La séquence « RGD » reconnue par les intégrines est présente dans certaines protéines de la matrice extra cellulaire. Les microbilles sont incubées deux heures à température ambiante sous agitation, à raison de 2 mg de billes / 0,2 mg de peptide /mL dans du tampon phosphate de sodium à 100 mM et à pH 5 contenant de l'EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) à 1 mg/mL. Le Tampon Phosphate est préparé avec 3,95 mL de Na₂HPO₄ et de 46,05 mL de NaH₂PO₄ pour 50 mL de tampon, le pH est ajusté avec du HCl. Les microbilles sont rincées plusieurs fois au PBS afin d'éliminer l'excès de ligand, elles sont remises en suspension dans du PBS à raison de 1,5 mg/ml et conservées à 4°C.

Matériel et Méthodes

III. 2.2.3.2 Fixation des microbilles sur les cellules

Les cellules sont « starvées » au minimum 24 heures avant les expériences dans un milieu dépourvu de VEGF et appauvri en sérum MV1. Les microbilles sont démagnétisées afin d'homogénéiser la distribution de celles-ci sur la monocouche cellulaire. Les billes sont diluées au 30^{ème} dans du milieu de culture MV1 et laissées 30 à 45 minutes sur les cellules afin d'obtenir une adhésion optimale. Après 3 lavages dans le MV1, on obtient entre 2 et 15 billes par cellule.

III. 2.2.4 Analyse des mesures au travers de modèles bio-rhéologiques et d'adhésion

La Figure 33 présente un exemple de mesures associées de contrainte-déformation obtenue avec la MTC réalisée comme indiqué aux paragraphes précédents. L'enregistrement de cette expérience de MTC comporte 3 périodes : une première période avant l'application du couple magnétique qui dure une trentaine de secondes; la période d'application du couple magnétique (1 minute) ; une troisième période dite de relaxation suivant l'application du couple qui est enregistré pendant une minute.

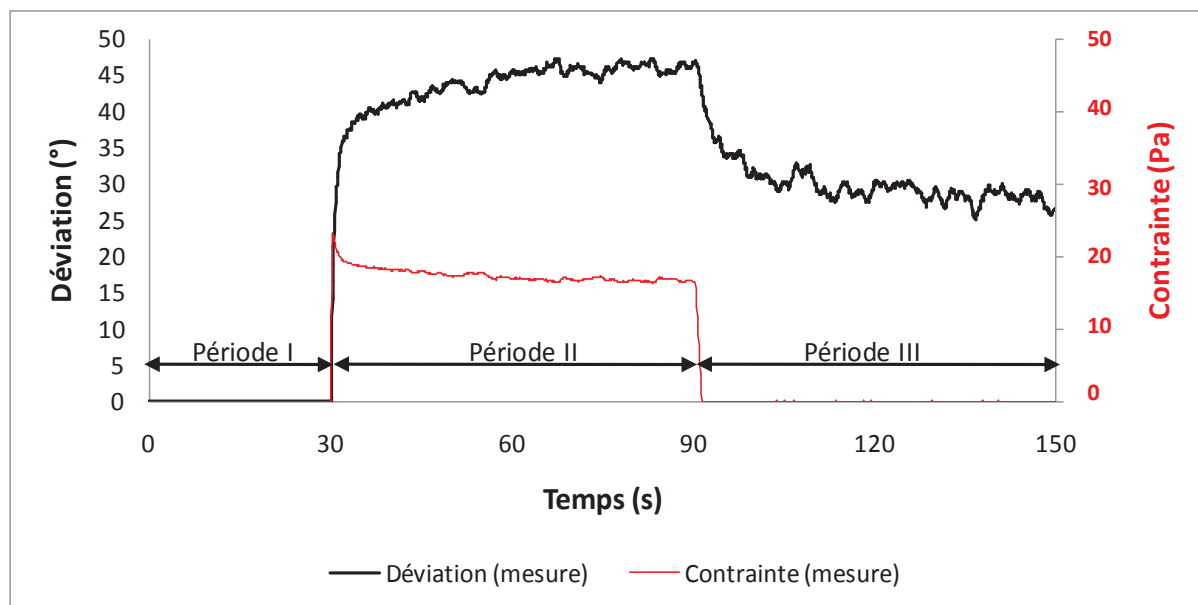


Figure 33. Exemple de mesures associées de contrainte-déformation obtenue avec la MTC.

Comme on peut le constater sur la Figure 33 les signaux de MTC restent relativement bruités et ce malgré les diverses précautions que l'on peut prendre (détection synchrone, blindage, ...). Aussi, et dans la mesure où les différents paramètres mesurés dépendent du

Matériel et Méthodes

rapport $B_r(t)/B_{r0}$ (Eq II.3 et II.5), nous avons été amené à définir de manière semi-empirique une valeur minimale de B_{r0} en-dessous de laquelle les mesures ont été systématiquement rejetées. Cette valeur a été fixée à 0.42 nT.

L'analyse du comportement mécanique des cellules, dans les expériences de magnétocytométrie, se fait grâce à l'utilisation de modèles rhéologiques viscoélastiques déjà décrits au paragraphe 3.5 de l'étude bibliographique. Ces modèles rhéologiques analysent la déformation ($\phi(t)$) donnée par l'équation II. 3) des matériaux sous l'effet d'une contrainte appliquée ($\sigma(t)$) donnée par l'équation II.5). Ces modèles donnent ainsi accès aux propriétés d'élasticité et de viscosité du cytosquelette.

D'une manière générale, si on considère que la cellule et son cytosquelette se comporte comme un corps viscoélastique, la relation contrainte-déformation au cours du temps est donnée par :

$$\phi(t) = f(t) \cdot \sigma(0) + \int_0^t f(t-t') \cdot \frac{d\sigma}{dt'} dt'$$

$f(t)$ est la fonction "creep" c'est-à-dire la déformation générée par un pur échelon de contrainte normalisée.

Dans le cadre de la MTC, 2 modèles visco-élastiques ont été principalement utilisés pour décrire l'expérience : modèle simple Voigt (Wang, Butler et al. 1993) et modèle double Voigt (Laurent, Planus et al. 2003)

III. 2.2.4.1 Modèle simple Voigt

Un composant viscoélastique comprend une composante élastique pure E (représentée par un ressort) en parallèle avec une composante visqueuse pure ν (représentée par un amortisseur) (cf. Figure 34 ci-dessous et paragraphe II. 3.5 page 74).

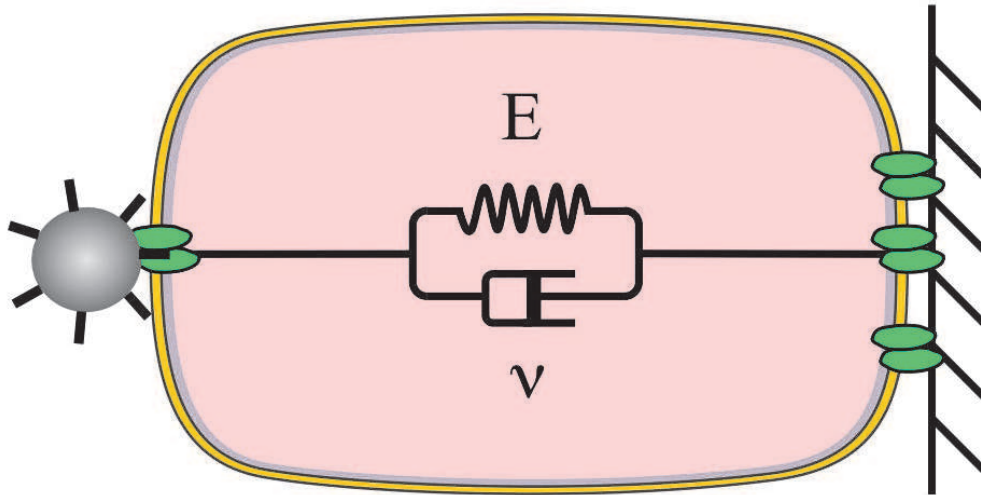


Figure 34. Modèle simple Voigt : représentation schématique d'une cellule par un modèle simple Voigt.

Son équation est la suivante :

$$\sigma(t) = E \cdot \left(\phi(t) + T \frac{d\phi(t)}{dt} \right) \text{ avec } T = \frac{\nu}{E} \quad \text{Eq II.6}$$

E est le module élastique et ν la viscosité. T est la constante de temps du modèle encore appelé temps caractéristique ou temps de relaxation.

Si la contrainte varie linéairement avec le temps ($\sigma(t) = a \cdot t + b$, condition à laquelle on peut toujours se ramener par partie) il est assez facile d'avoir l'expression analytique de la déformation en fonction de la contrainte

$$\phi(t) = \left(\phi_{t=0} - \frac{b - T \cdot a}{E} \right) \cdot e^{-\frac{t}{T}} + \frac{a}{E} \cdot t + \frac{b - T \cdot a}{E} \quad \text{Eq II.7}$$

$\phi_{t=0}$ est la déviation initiale à l'instant $t=0$.

Dans l'analyse des expériences de MTC, on considère que la contrainte appliquée peut être modélisée par une série de segments de droites (Figure 35).

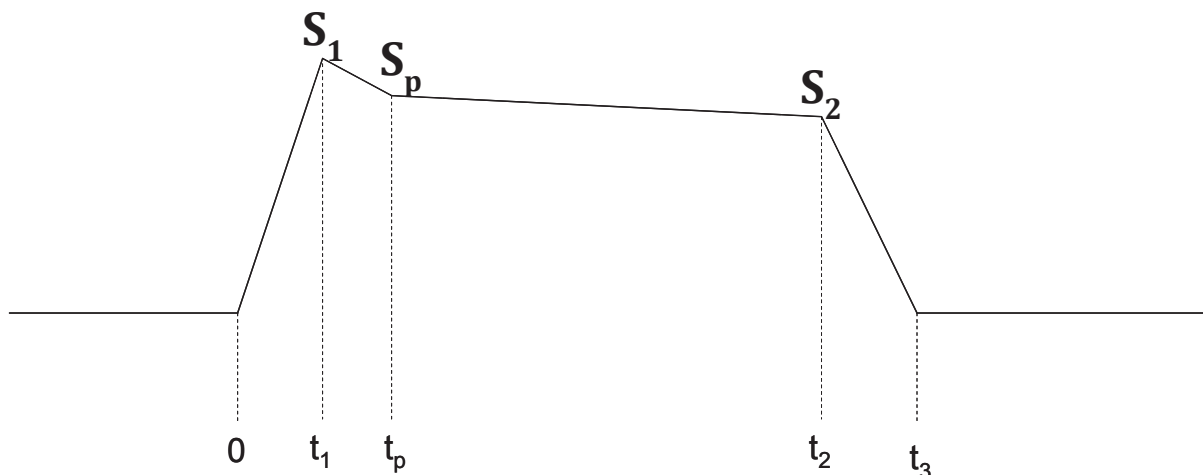


Figure 35. Schéma représentatif de la contrainte appliquée considérée comme une série de segments de droites.

On va donc pouvoir calculer la déformation théorique sur l'ensemble de l'expérience cycle en décomposant l'expérience de MTC en 5 parties :

1. la montée en contrainte caractérisée par $0 \leq t \leq t_1$ et $\sigma = r_1 t$,
2. puis le début du fluage pour $t_1 \leq t \leq t_p$, avec $\sigma = \sigma_1 + r_p(t - t_1)$,
3. puis le plateau du fluage pour $t_p \leq t \leq t_2$ et $\sigma = \sigma_p + r_2(t - t_p)$,
4. puis la relaxation précoce pour $t_2 \leq t \leq t_3$, avec $\sigma = \sigma_2 + r_3(t - t_2)$,
5. et enfin la relaxation après fin de contrainte pour $t \geq t_3$ ($\sigma = 0$).

Le calcul des paramètres (E , T et ν) du modèle s'effectue alors en minimisant l'écart entre la déviation mesurée $\phi_{mes}(t)$ et son modèle $\phi(t)$.

III. 2.2.4.2 Modèle double Voigt

Le modèle double Voigt (Figure 36) assimile le cytosquelette à deux composants viscoélastiques montés en série permettant la distinction de deux compartiments. Ces deux compartiments s'expriment différemment sur le plan mécanique avec un compartiment à réponse rapide et un compartiment à réponse lente.

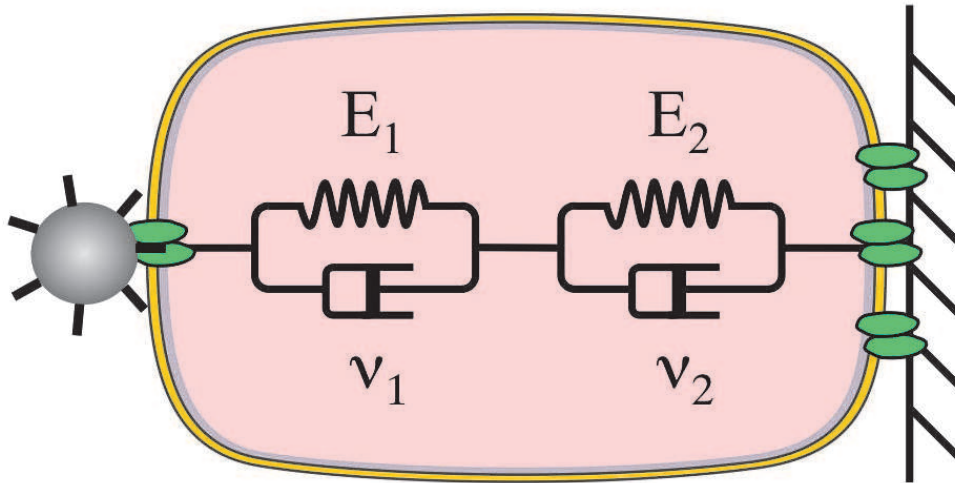


Figure 36. Modèle double Voigt : représentation schématique d'une cellule par un modèle double Voigt.

Son équation est la suivante :

$$\sigma(t) = E_1 \left(\phi_1(t) + T_1 \frac{d\phi_1(t)}{dt} \right) = E_2 \left(\phi_2(t) + T_2 \frac{d\phi_2(t)}{dt} \right) \quad \text{avec } T_1 = \frac{\nu_1}{E_1} \quad \text{et } T_2 = \frac{\nu_2}{E_2} \quad \text{Eq II.8}$$

Tout comme dans le cas du simple Voigt la contrainte appliquée peut être modélisée par une série de segments de droites sur lesquels il est possible de calculer la déformation et le calcul des paramètres ($E_1, E_2, T_1, T_2, \nu_1$ et ν_2) du modèle s'effectue alors en minimisant l'écart entre la déviation mesurée $\phi_{mes}(t)$ et son modèle $\phi(t)$.

III. 2.2.4.3 Introduction de la notion de glissement pour l'analyse des résultats d'expériences MTC

Un modèle de solide viscoélastique de type Voigt se caractérise, grâce à sa composante élastique, par un retour du système à son état initial après relaxation de la contrainte appliquée. Les expériences de MTC, comme on peut le voir sur l'exemple du paragraphe III. 2.2.4.5 Figure 37 se caractérisant par une non-réversibilité après relaxation, nous avons d'abord introduit dans les modèles des termes de glissement (approche empirique) pour analyser la non-réversibilité du signal MTC.

La déviation est alors liée à la contrainte par le modèle de structure (simple Voigt ou double Voigt) auquel peut s'ajouter un glissement :

Matériel et Méthodes

$$\phi(t) = w(\sigma(t)) + g(t)$$

$w(\sigma)$ désigne la fonction donnant la déformation en fonction de la contrainte pour le modèle simple Voigt ou double Voigt et $g(t)$ la déformation lié au glissement.

Si on considère qu'il y a un pourcentage "x = % Slip Bonds" de billes qui sont attachées aux cellules par des liaisons faibles (immatures ou spontanément glissantes), la déviation de ces billes sera de 90° et la déviation des billes attachées par des liaisons fortes donc reflétant les propriétés mécaniques du cytosquelette sera donnée par:

$$\cos(\phi_x(t)) = \frac{B_r(t)}{B_{r0}(1 - \% \text{ Slip Bonds})}$$

Et la contrainte :

$$\sigma_x(t) = \frac{\mu_0 \cdot H_{\perp} \cdot m \cdot \cos(\phi_x(t))}{\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot R^3 \cdot C_{cor}} = \frac{\mu_0 \cdot H_{\perp} \cdot m \cdot \frac{B_r(t)}{B_{r0} \cdot (1 - \% \text{ Slip Bonds})}}{\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot R^3 \cdot C_{cor}} \quad \text{Eq II.9}$$

Dans ce cas, on peut toujours modéliser la contrainte par une succession de droites $\sigma_{Mx}(t)$ et la relation entre la déviation et la contrainte sera :

$$\phi_a(t) = w(\sigma_{Mx}(t)) + g(t) \quad \text{Eq II.10}$$

Expression dans laquelle $g(t)$ dépend de l'adhésion cellulaire. $g(t)$, qui ne peut que croître, représente le glissement irréversible et prend la valeur notée Teta Gliss à la fin de l'expérience de MTC.

On notera que le modèle $\sigma_{Mx}(t)$ correspond à $\frac{\sigma_M(t)}{(1 - \% \text{ Slip Bonds})}$ en appelant $\sigma_M(t)$ la modélisation de la contrainte par une succession de droites. Cependant, l'équation (II.9) fait intervenir le paramètre "x = % Slip Bonds", on ne peut donc pas considérer qu'il s'agit d'une grandeur qui puisse être directement déduite par le calcul. On préfère alors recalculer le champ correspondant au modèle de structure en partant de l'expression :

$$B_{ra}(t) = B_{r0}(1 - \% \text{ Slip Bonds}) \cdot \cos(\phi_a(t))$$

Puis, en minimisant l'écart entre le champ mesuré $B_r(t)$ et son modèle $B_{ra}(t)$, on obtient alors un paramètre "x = % Slip Bonds" qui est spécifique de chaque modèle. Lorsqu'on applique une série de twists, ce paramètre ne doit être calculé que pour le premier cycle. Pour les cycles suivants, on doit prendre comme référence non plus B_{r0} , mais $(1-x)B_{r0}$.

Matériel et Méthodes

III. 2.2.4.4 Introduction de la notion d'adhésion pour l'analyse des résultats d'expériences

MTC

Le glissement $g(t)$ peut être lui-même approché par un modèle théorique prenant en compte la probabilité de détachement (dé-adhésion) des liens intégrine-RGD soumis à des forces de cisaillement lors de l'application du couple magnétique. Pour un type cellulaire donné, nous supposons qu'il y a N liens entre une bille donnée et la cellule. La constante de dissociation pour un lien donné est caractérisée à force nulle par k_{off}^0 .

Lorsqu'on applique une force f sur ce lien la constante de dissociation augmente exponentiellement et peut être estimée par la formule de l'équation I.1:

$$k_{off}(f) = k_{off}^0 e^{f/f_\beta}$$

La force f peut être constante ou varier au cours du temps.

La probabilité pour ce lien de subsister (si l'on néglige le « rebinding » en raison des déplacements micrométriques induits par l'expérience MTC) s'écrit alors (Evans and Kinoshita 2007) :

$$P(t) = e^{-\int_0^t k_{off}(f(t')) dt'} \quad \left(\frac{dP}{P} = -k_{off}(f(t)) dt \right),$$

ou encore :

$$P(t) = e^{-\int_0^t k_{off}^0 e^{f(t')/f_\beta} dt'}$$

Lorsque la force appliquée est une fonction linéaire du temps (cas d'une rampe de force $f = rt$). L'expression de la probabilité d'existence des liens est alors :

$$P(t) = e^{-\int_0^t k_{off}^0 e^{rt'/f_\beta} dt'}$$

que l'on peut écrire :

$$P(t) = e^{-k_{off}^0 \int_0^t e^{rt'/f_\beta} dt'}$$

Ce qui s'intègre en :

$$P(t) = e^{-k_{off}^0 \frac{f_\beta}{r} (e^{rt/f_\beta} - 1)}$$

Si on pose $\tau = f_\beta/r$, où f_β est une échelle de force définie par le rapport entre l'énergie

Matériel et Méthodes

thermique et la distance critique à laquelle apparaît la barrière d'énergie, on obtient finalement :

$$P(t) = e^{-k_{off}^0 \tau (e^{t/\tau} - 1)}$$

Si on suppose maintenant que :

- les liens n'étant soumis à aucune force, ils sont stables, c'est-à-dire que la probabilité d'existence des liens est constante en raison de l'équilibre supposé entre association (rebinding) et dissociation (unbinding),
- Si ces liens sont soumis à une force de dissociation, on peut négliger le « rebinding » au bénéfice d'une dissociation (unbinding) très rapidement augmentée quand la force appliquée augmente,
- La surface de contact bille-cellule ne varie pas au cours d'une expérience MTC, on peut donc remplacer la formulation du taux de dissociation en fonction de f par une formulation en fonction de σ ($\sigma = f/S$) - l'absence de liens effectifs correspond à un glissement de $\pi/2$ alors que la présence de la totalité des liens correspond à un glissement nul.

Dans ce cas, le terme de rotation irréversible $g(t)$ est donné par ;

$$g(t) = \frac{\pi}{2} (1 - P(t)) = \frac{\pi}{2} \left(1 - e^{-k_{off}^0 \tau (e^{t/\tau} - 1)} \right) \text{ Eq II .11}$$

et

$$\phi_a(t) = w(\sigma_{Mx}(t)) + g(t) \text{ Eq II.10}$$

Tout comme dans le cas des simple et double Voigt, la contrainte appliquée peut être modélisée par une série de segments de droites sur lesquels il est possible de calculer la probabilité d'existence des liens et le calcul des paramètres $E_1, E_2, \nu_1, \nu_2, T_1, T_2, k_{off}^0, \% \text{ Slip bond et } f_\beta$ (cas modèle double Voigt pour w) ou $E, \nu, T, k_{off}^0, \% \text{ Slip bond et } f_\beta$ (cas modèle simple Voigt pour w) du modèle s'effectue toujours en minimisant l'écart entre la déviation mesurée $\phi_{mes}(t)$ et son modèle $\phi_a(t)$.

III. 2.2.4.5 Critères de qualité et exemples d'ajustements modèle-expérience MTC

Au total, nous avons développé une analyse des expériences de MTC basée sur une partition entre une composante viscoélastique et une composante de glissement irréversible en fonction du temps, reflet de la probabilité de détachement partiel des liens soumis à des

Matériel et Méthodes

forces de cisaillement. La composante viscoélastique est représentée par les modèles simple ou double Voigt, ce dernier permettant de tenir compte du comportement du cytosquelette profond et de celui du cytosquelette cortical. La composante glissement est, soit interprétée comme un simple "patin" qui glisse de manière quasi-instantanée avec le début de la contrainte, soit interprétée comme étant la résultante des propriétés d'adhésion/de-adhésion cellulaires sur l'ensemble de l'expérience MTC.

Quelque soit le modèle retenu pour l'analyse de l'expérience de MTC, la détermination des paramètres du modèle se fait en utilisant les techniques classiques de minimisation. La cohérence entre les données expérimentales et le modèle, c'est-à-dire la capacité du modèle à représenter l'expérience, est alors évaluée à partir du coefficient de détermination (r^2). Les données conduisant à un r^2 inférieur à 0,95 seront rejetées. De manière rassurante, on constate que ce dernier critère ($r^2 > 0,95$) conduit à une sélection des données proche de celle engendrée par la condition $B_{r0} > 0,42$ nT. La Figure 37 présente un exemple de données expérimentales ajustées avec divers modèles d'analyse : modèle viscoélastique à deux compartiments et glissement ; modèle viscoélastique à deux compartiments et adhésion; modèle viscoélastique à un compartiment et adhésion. Dans ce graphe en fonction du temps, la déviation a été remplacée par le champ rémanent : $B_r = B_{r0} \cdot \cos(\phi(t))$

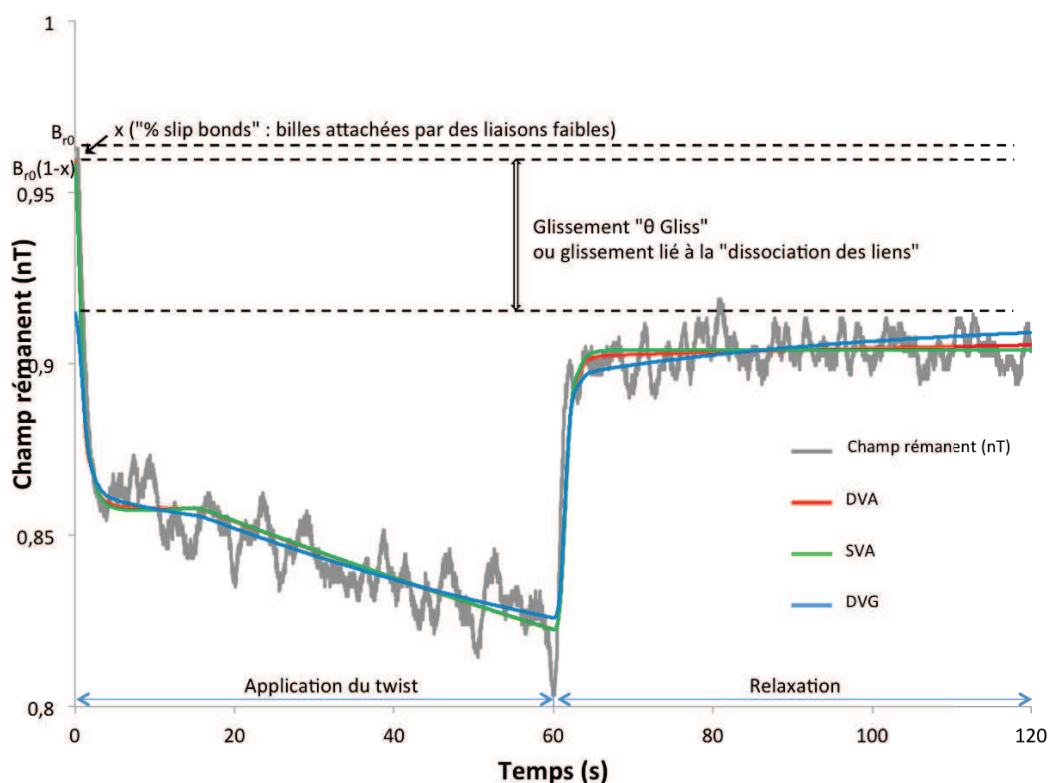


Figure 37. Représentation d'une mesure du champ magnétique rémanent et des modèles viscoélastiques. Les 60 premières secondes correspondent à la période d'application de la contrainte, cette période est suivie de 60 secondes de relaxation durant lesquelles les billes tendent à revenir à leur état initial (B_0). Il existe cependant une composante non réversible au retour des billes à leur état initial (indiqué par la ligne pointillée horizontale). La mesure brute du champ rémanent des billes (en nT) est représentée en gris. Le modèle à deux compartiments et adhésion (DVA) est représenté en rouge. Le modèle à deux compartiments et glissement (DVG) est représenté bleu. Le modèle à un compartiment et adhésion (SVA) est représenté en vert.

Les différents modèles d'analyse correspondent bien aux mesures brutes du champ rémanent des microbilles. La composante non réversible de la rotation des billes est visualisée par la différence entre B_{r0} et B_r en fin de la relaxation. Cette composante non réversible inclue le pourcentage de billes attachées par des liaisons faibles (% slip bonds).

III. 2.3 Magnétostimulation

III. 2.3.1 Principe de la Magnétostimulation

La magnétostimulation (MTS) initialement proposée par Chen et coll. (Chen, Fabry et al. 2001) consiste à exercer sur des cellules adhérentes une contrainte mécanique oscillante par l'intermédiaire de billes ferromagnétiques fonctionnalisées pour les mécanorécepteurs

Matériel et Méthodes

transmembranaires spécifiques du cytosquelette. Cette technique comprend 3 étapes dont les 2 premières sont similaires aux étapes utilisées en MTC.

La première étape consiste à lier aux cellules des microbilles (diamètre 4,5 μm) ferromagnétiques fonctionnalisées avec un peptide synthétique RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique) reconnu comme ligand matriciel par les intégrines cellulaires, récepteurs transmembranaires qui sont en relation avec le cytosquelette au travers des sites d'adhésion. Ces cellules sont cultivées à confluence soit dans des puits de MTC soit dans des boîtes de Pétri pouvant atteindre un diamètre de 100 mm.

La seconde étape consiste à magnétiser les microbilles dans le plan de culture à l'aide d'un champ magnétique élevé et transitoire (150 mT durant 150 μs).

La troisième étape consiste à appliquer à ces billes un couple magnétique oscillant au moyen d'un second champ magnétique oscillant perpendiculaire au premier et d'intensité beaucoup plus faible (entre 1 et 6mT).

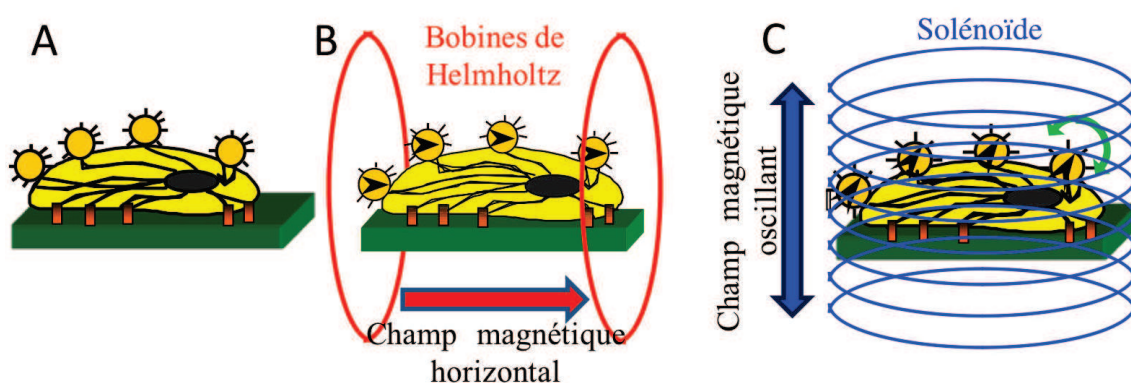


Figure 38. Les 3 étapes de la Magnétostimulation.

A) Les microbilles ferromagnétiques sont fixées aux cellules (reliées au cytosquelette via des récepteurs transmembranaires de type intégrines spécifiques du réseau d'actine). B) Les billes sont magnétisées dans le plan de la culture par un champ magnétique bref mais puissant (150mT). C) les billes sont mises en mouvement oscillant par un champ magnétique vertical oscillant de beaucoup plus faible amplitude ($\leq 6\text{mT}$).

III. 2.3.2 Dispositif expérimental

Le banc expérimental est composé d'un porte boîtes pouvant accueillir jusqu'à 5 boîtes de Pétri (diamètre 100 mm), d'un système de magnétisation des microbilles, d'un système permettant de créer un champ magnétique oscillant et perpendiculaire au plan de culture des cellules, d'un dispositif de contrôle de la température (refroidissement pour contrebalancer l'effet Joule dans les bobines magnétiques) et enfin d'un incubateur

Matériel et Méthodes

permettant de contrôler le taux de CO₂ (Figure 39).

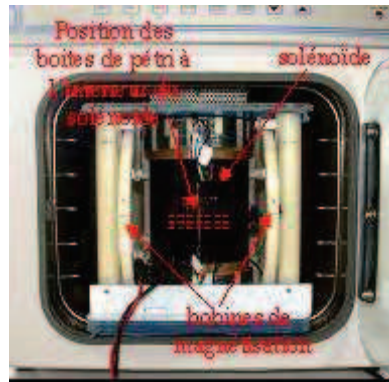


Figure 39. Magnétostimulation : banc de stimulation mécanique en place dans l'incubateur.

Le champ magnétique perpendiculaire (H_{\perp}) est obtenu via un solénoïde (diamètre 125 mm longueur 230 mm) dont les 2 extrémités ont été "renforcées" par un bobinage plus important. Ce renforcement est un artifice qui permet de réduire les effets de bords et donc de minimiser les dimensions du solénoïde dans le but de pouvoir placer l'ensemble dans un incubateur de taille limitée.

Les images suivantes (Figure 40) montrent l'intérêt d'un tel renforcement. Elles représentent le champ magnétique avec et sans "renforcement" simulé via un solveur 2D aux éléments finis (femm 4).

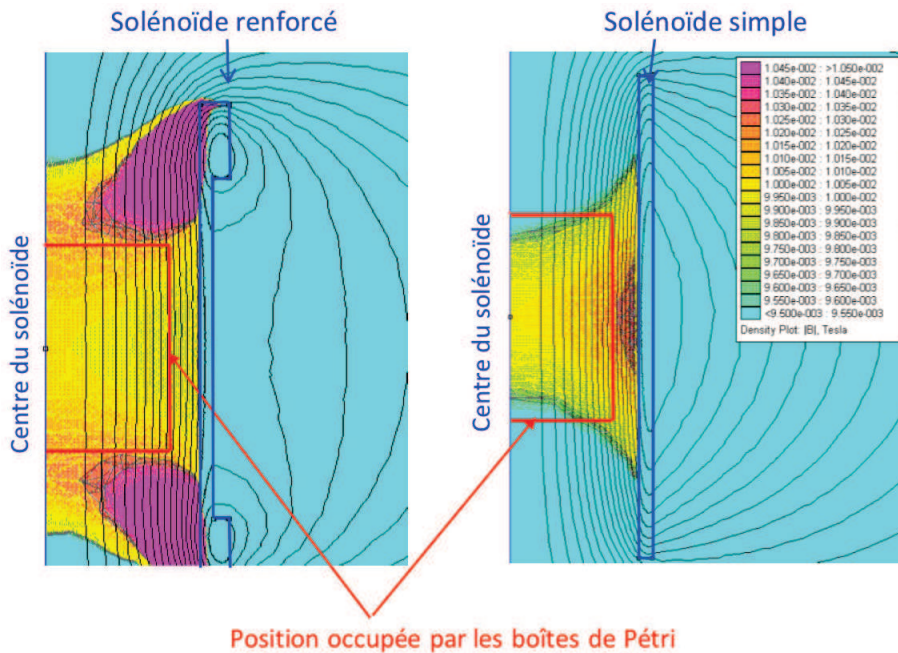


Figure 40. Simulation comparative des champs magnétiques obtenus avec un solénoïde simple (à gauche) ou renforcé (à droite).

Matériel et Méthodes

Pour un même champ au centre des bobines (10 nT), la solution avec renforcement des têtes de bobines fait apparaître une bien meilleure homogénéité du champ magnétique dans le volume d'étude. D'un point de vue pratique, des mesures faites avec des capteurs à effet Hall ont montré que le système réalisé permettait de générer le champ magnétique désiré de manière homogène (à moins de 5 % près) sur l'ensemble du volume occupé par les 5 boîtes de Pétri. Lors de l'expérience, le système permet de maintenir pendant plusieurs heures un champ oscillant (intensité pic à pic de 1 à 12 nT) spatialement homogène. L'amplitude de la contrainte oscillante associée est donnée par :

$$\sigma(t) = \frac{\mu_0 \cdot H_{\perp} \cdot m \cdot}{\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot R^3 \cdot C_{cor}}$$

Ce système est complété par 2 bobines de Helmholtz permettant de magnétiser les billes aussi souvent que nécessaire et par un système de refroidissement liquide sous forme de tubulures enroulées à l'intérieur du solénoïde permettant de dissiper la chaleur apportée par les bobines et de maintenir les cellules à 37 °C.

Le protocole utilisé, incluant la fonctionnalisation des microbilles ainsi que la fixation des microbilles sur les cellules est identique à celui décrit pour la technique de MTC (décrite dans le chapitre III. 2.2.3).

III. 2.4 Analyse statistique

Les analyses statistiques sont faites à l'aide du logiciel Statistica (ver. 7.1 Stat-Soft, Maison Alfort). Les données moyennes entre plusieurs groupes sont comparées en analysant la variance (ANOVA) et d'un test Post-hoc de Kruskal-Wallis. Une "p value" inférieure à 0.05 a été prise comme niveau minimum de significativité. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (sauf mention spécifique).

Résultats

IV. Résultats

Les résultats présentés dans cette thèse concernent les effets structuraux, mécaniques, biologiques et fonctionnels d'une contrainte mécanique cyclique (MTS) ciblant spécifiquement le cytosquelette des HPMEC car utilisant les récepteurs transmembranaires de type intégrines (voir Matériels et Méthodes section III. 2.3). Les paramètres mécaniques de la stimulation sont restés les mêmes pour toutes les expériences en étant maintenus à un niveau d'environ 20 Pa d'amplitude, une forme sinusoïdale de contrainte, une fréquence de 3 Hz et une durée physiologique inférieure ou égale à 2 heures. Les conditions étudiées concernent (1) l'état de base soit 2 heures d'adhérence des billes sans contrainte appliquée, (2) l'état stimulé après 1 à 2 heures de contraintes sans traitement bloquant, (3) l'état stimulé après 1 à 2 heures de contrainte et un traitement initial avec des inhibiteurs chimiques des voies d'activation du couplage acto-myosine.

L'état d'enfouissement des billes dans la structure d'actine des HPMEC est montré sur la Figure 41 pour un état intermédiaire de confluence. Cette image est une reconstruction tridimensionnelle de l'actine corticale marquée à la rhodamine-phalloïdine. On remarque que les billes ferromagnétiques (sphères en gris clair) sont enfouies sur plus de 50% de leur surface, ce qui correspond à un demi-angle d'immersion dans le cytoplasme variant entre 90 et 180°. Les billes sont magnétisées dans l'état montré sur cette figure ce qui permet l'application d'une contrainte mécanique tridimensionnelle ciblant le CSK d'actine au travers des intégrines. Le nombre de billes liées au CSK varie entre 2 et 15 par cellule. Ces mêmes billes servent aussi de sondes micro-rhéologiques pour les mesures des propriétés du CSK d'actine.

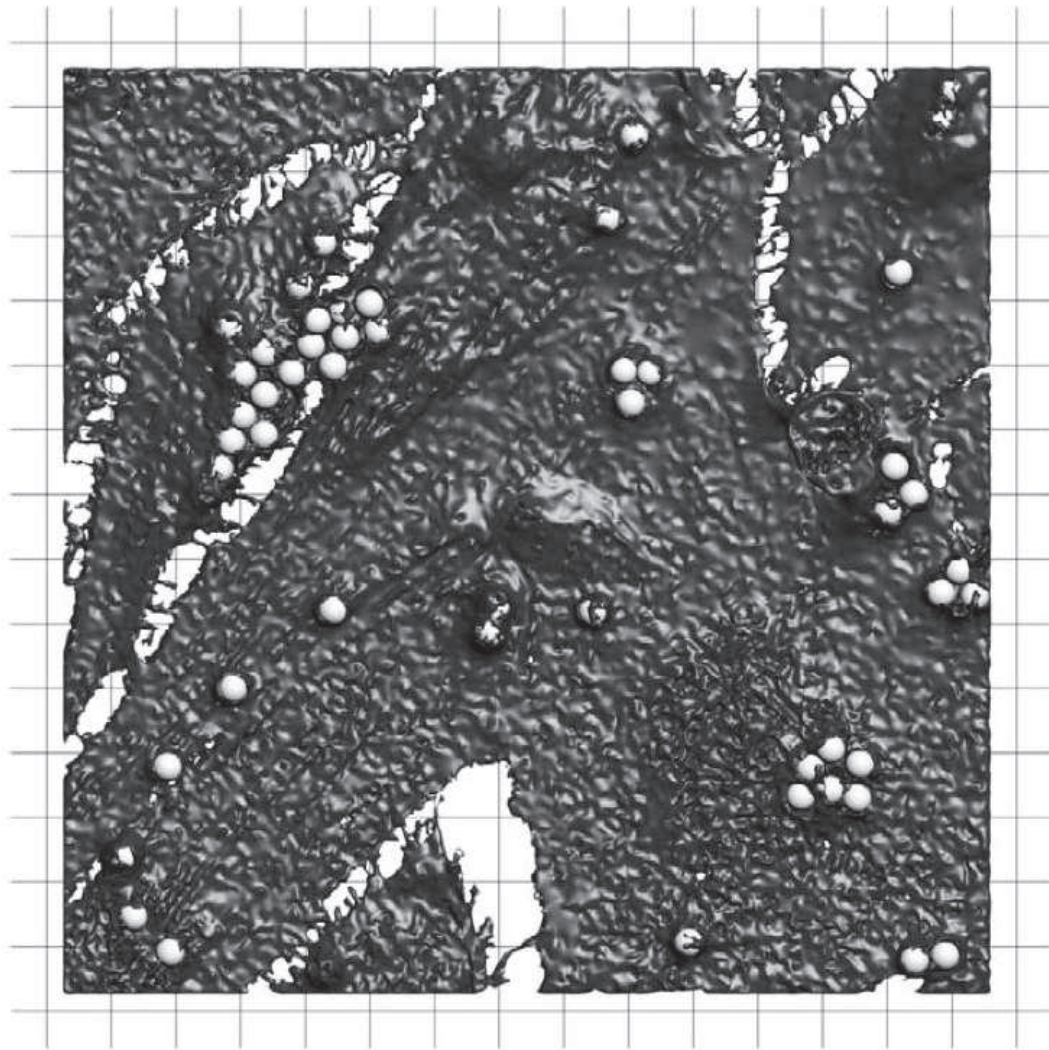


Figure 41. Reconstruction tridimensionnelle de l'actine montrant l'insertion des microbilles dans une monocouche de cellules primaires microvasculaires pulmonaires humaines (HPMEC). La reconstruction de l'actine en gris (marquage à la rhodamine phalloïdine) est réalisée à partir de l'empilement d'images confocales ; vue de dessus. Les billes ferromagnétiques (diamètre $\approx 4,5\mu\text{m}$; gris clair) apparaissent immergées dans le cytosquelette (CSK) d'actine et servent à exercer des contraintes mécaniques sur le CSK au travers de la liaison RGD-intégrine. Le quadrillage est fait de carrés de $10\ \mu\text{m}$ de côté. Extrait de Wang, Caluch et coll. (Wang, Caluch et al. 2012).

IV. 1 Effets sur la structure d'actine d'une contrainte mécanique cyclique ciblant le CSK

Les marquages nous permettent de visualiser la structure d'actine F au sein des HPMEC soumises à une contrainte mécanique cyclique ciblant le cytosquelette (MTS). Les modifications de cette réponse cellulaire mécaniquement induite par MTS sont également étudiées en présence des inhibiteurs chimiques de ROCK (Y27632) et de la MLCK (ML9).

Résultats

Nous présentons sur la Figure 42 une visualisation des modifications du cytosquelette d'actine dans la région du pôle basal des cellules HPMEC (tranche optique d'épaisseur variant entre 0,3 et 0,5 μm à partir du plan de base), en fonction de la durée de contrainte mécanique cyclique ciblant le CSK (MTS). Les groupes observés sont : 2h sans MTS (Contrôle), 1h de MTS (MTS 1h) et 2h de MTS (MTS 2h).

La situation contrôle se caractérise par de longues et fines fibres d'actine parallèles parcourant la plupart des cellules. Les bords cellulaires sont relativement peu incurvés et les cellules sont très étalées. La situation stimulée après 1h de MTS se caractérise par l'apparition de fibres de stress plus épaisses et plus courtes, notamment dans la région des billes. La situation stimulée après 2h de MTS montre un réel épaissement et un raccourcissement des fibres de stress, une augmentation du nombre de ces dernières notamment dans la zone sous les billes.

De plus, dans les situations stimulées MTS 1h et MTS 2h, les bords cellulaires apparaissent plus incurvés vers l'intérieur de la cellule entre les points d'ancrage au substrat que dans la situation contrôle.

L'empreinte actinique circulaire des billes est visible dans les 3 situations mais on observe un renforcement des connections entre empreintes actiniques et fibres d'actine dans les situations stimulées MTS 1h et MTS 2h.

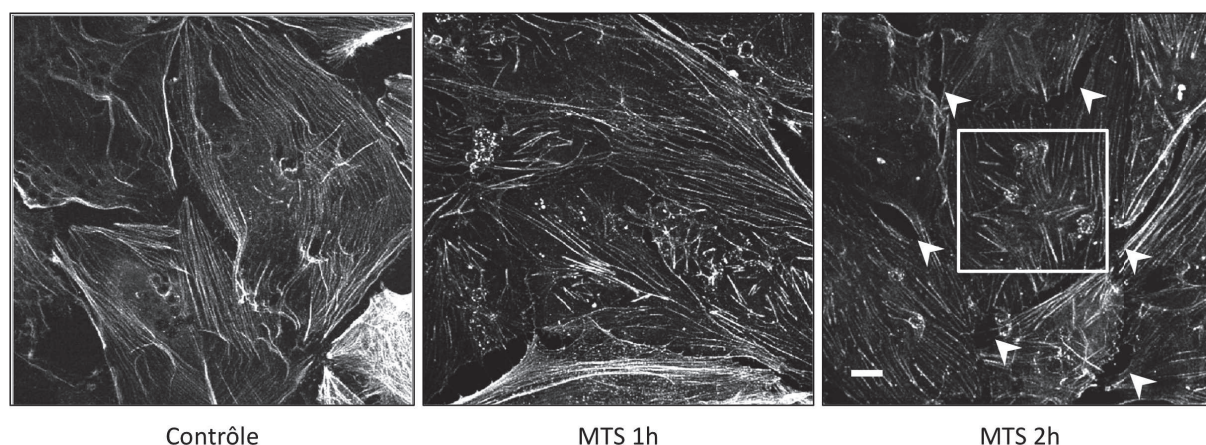


Figure 42. Vues en microscopie confocale de l'actine marquée à la rhodamine-phalloïdine au pôle basal d'une monocouche de HPMEC.

Sans stimulation mécanique (Contrôle) certaines cellules présentent de nombreux filaments d'actine parallèles et très fins. Après 1h de stimulation (MTS 1h) toutes les cellules présentent un nouveau réseau de fibres de stress organisés dans des directions différentes. Après 2h de stimulation (MTS 2h), les cellules présentent un nombre important de fibres de stress renforcées et raccourcies notamment dans la région située sous les billes (encadré) ; les flèches présentent les trous intercellulaires. Échelle = 10 μm .

Résultats

La Figure 43 montre l'évolution du cytosquelette d'actine au pôle basal des cellules avant (situation contrôle) et après une stimulation mécanique ciblant le CSK (MTS) et pour différents traitements altérant la contraction actomyosine. On observe sur la Figure 43 de gauche à droite: témoins correspondent à l'absence de traitement; puis le traitement à l'Y27632 et enfin le ML9.

Comme indiqué précédemment, on observe des modifications de la structure d'actine dans les trois situations (Témoin, Y27632 et ML9) lorsqu'on expose les cellules aux contraintes mécaniques. Les fibres de stress apparaissent après stimulation par MTS dans la région centrale alors qu'elles sont corticales dans les conditions contrôle. L'empreinte actinique autour des microbilles est diminuée par les traitements au Y27632 et ML9.

On observe dans les groupes traités par Y27632 et ML9 une altération du cytosquelette d'actine avec une diminution de la densité des fibres de stress par rapport aux groupes témoin que ce soit au repos ou après MTS. La diminution apparaît particulièrement marquée dans le groupe traité au ML9 dans les conditions de repos. De ce fait, seul le traitement au ML9 sera conservé dans la suite du travail.

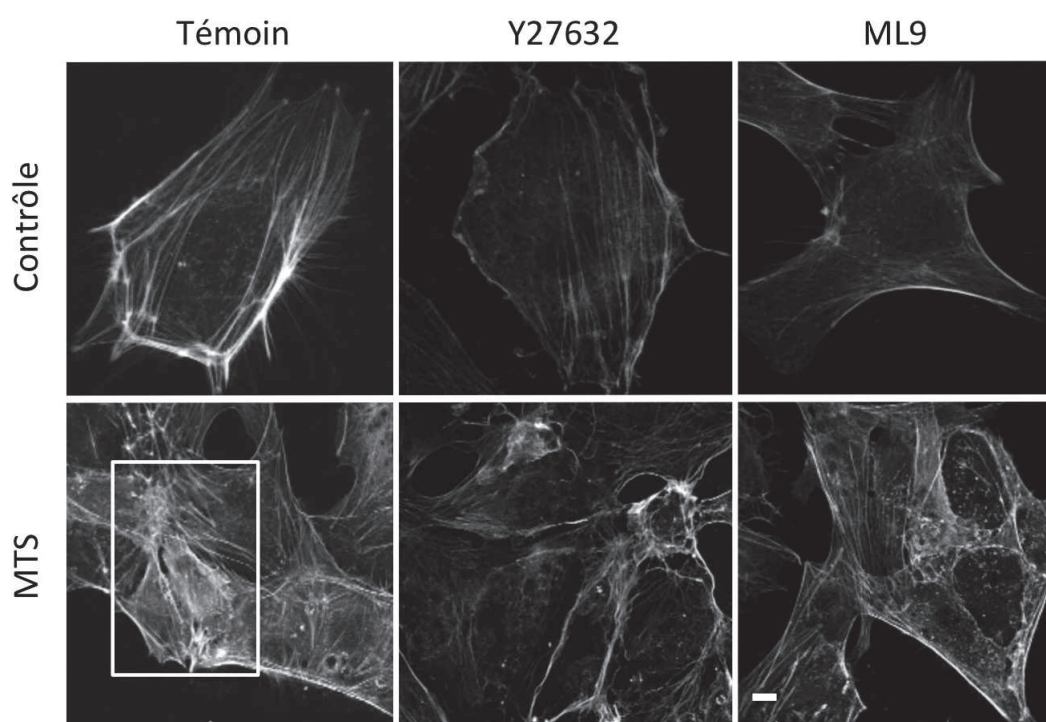


Figure 43. Visualisation de l'évolution du cytosquelette d'actine au pôle basal des cellules avant et après stimulation mécanique (2h) dans différentes conditions de traitement.

Le nombre de fibres de stress augmente dans les trois conditions (Témoin, Y27632, ML9) de cellules exposées à la magnéto-stimulation (MTS) et celles-ci apparaissent centrales dans les cellules. Le cadre indique le renforcement actinique après stimulation ; celui-ci est amoindri dans les conditions de traitement au Y27632 et ML9. Échelle = 10 µm.

IV. 2 Effets sur la mécanique et la cinétique d'adhésion matricielle d'une contrainte mécanique cyclique ciblant le CSK

Les résultats obtenus par MTC nous permettent de caractériser l'effet de 2 h de stimulation mécanique sur les propriétés mécaniques du CSK des HPMEC ainsi que la cinétique des liens intégrines-ligand matriciel.

La réponse mécanique du CSK est caractérisée par soit 3 paramètres (T , E , ν) (simple Voigt), soit par 6 paramètres (T_1 , E_1 , ν_1) et (T_2 , E_2 , ν_2) correspondants respectivement aux composantes corticale et profonde du CSK (double Voigt). La constante de temps définie globalement ou par compartiment étant obtenue par ($T = \nu/E$), seulement 2 paramètres mécaniques sur 3 sont indépendants.

La cinétique des liens "intégrine-ligand matriciel" est caractérisée par deux types d'approches: une approche empirique prenant en compte l'angle de glissement global de la bille et une approche basée sur la théorie physique des liens moléculaires soumis à des forces de cisaillement. Les paramètres propres à chacun de ces modèles sont respectivement: l'angle de glissement θ Gliss (voir paragraphe III. 1.1 ci-dessus), et le taux de dissociation global (k_{off}^0) (paragraphe IV. 2.2 et IV. 2.3) représentant l'énergie chimique des liens "intégrines-ligand matriciel" à force nulle. A ces paramètres obtenus par ajustement des modèles d'analyse sur les courbes expérimentales MTC (voir matériels et méthodes III. 2.2), il convient d'ajouter un paramètre estimant le nombre de liens intégrines-ligand matriciel immatures (% Slip Bonds) dont la caractéristique est de rompre à l'instant même de l'application du couple magnétique.

IV. 2.1 Analyse par le modèle viscoélastique à deux compartiments et un angle de glissement global

Nous comparons sur la Figure 44 les réponses mécaniques et les paramètres de l'adhésion cellule-matrice dans 3 situations: 2h sans MTS, 2h de MTS, et 2h de MTS sur des cellules traitées préalablement au ML9. Il apparaît que le compartiment profond du cytosquelette subit une augmentation significative de son module de rigidité (E_2) après stimulation mécanique (+43,6% par rapport au groupe contrôle ; $p < 0,05$). ML9 n'empêche

Résultats

pas cette augmentation (+55,2% par rapport au groupe contrôle ; $p < 0,01$). La viscosité du compartiment profond augmente de manière significative pour les cellules traitées au ML9 (+58,9% par rapport au groupe contrôle ; $p < 0,05$) sans toutefois être modifié par la seule stimulation mécanique. Au bilan, la constante de temps (T2) subit une diminution significative après stimulation mécanique seule (80 s pour le groupe contrôle et 50 s lors de l'exposition au stress). Le ML9 modère cette diminution du T2 (63 s pour le groupe traité à comparer au 80 s du groupe contrôle), à cause des augmentations significatives de ν_2 en présence de ML9.

En revanche, la constante de temps (T1) du compartiment cortical est fortement diminuée après stimulation sans et avec traitement par ML9 (-58% et -52% respectivement ; $p < 0,01$). Etant donné que le module de rigidité E1 ne varie pas entre les conditions étudiées, ce changement au niveau du cytosquelette cortical est essentiellement lié à une diminution significative du module de viscosité (ν_1) observée sans et avec traitement par ML9 (respectivement -64,6% et -58,7% par rapport au groupe contrôle : $p < 0,01$).

La stimulation mécanique a par ailleurs un effet important sur la composante non réversible de la rotation de la bille, ici mise en évidence par une diminution significative de θ Gliss après stimulation mécanique, sans et avec traitement par ML9 (respectivement -50% et -37,7% par rapport au contrôle ; $p < 0,05$).

Résultats

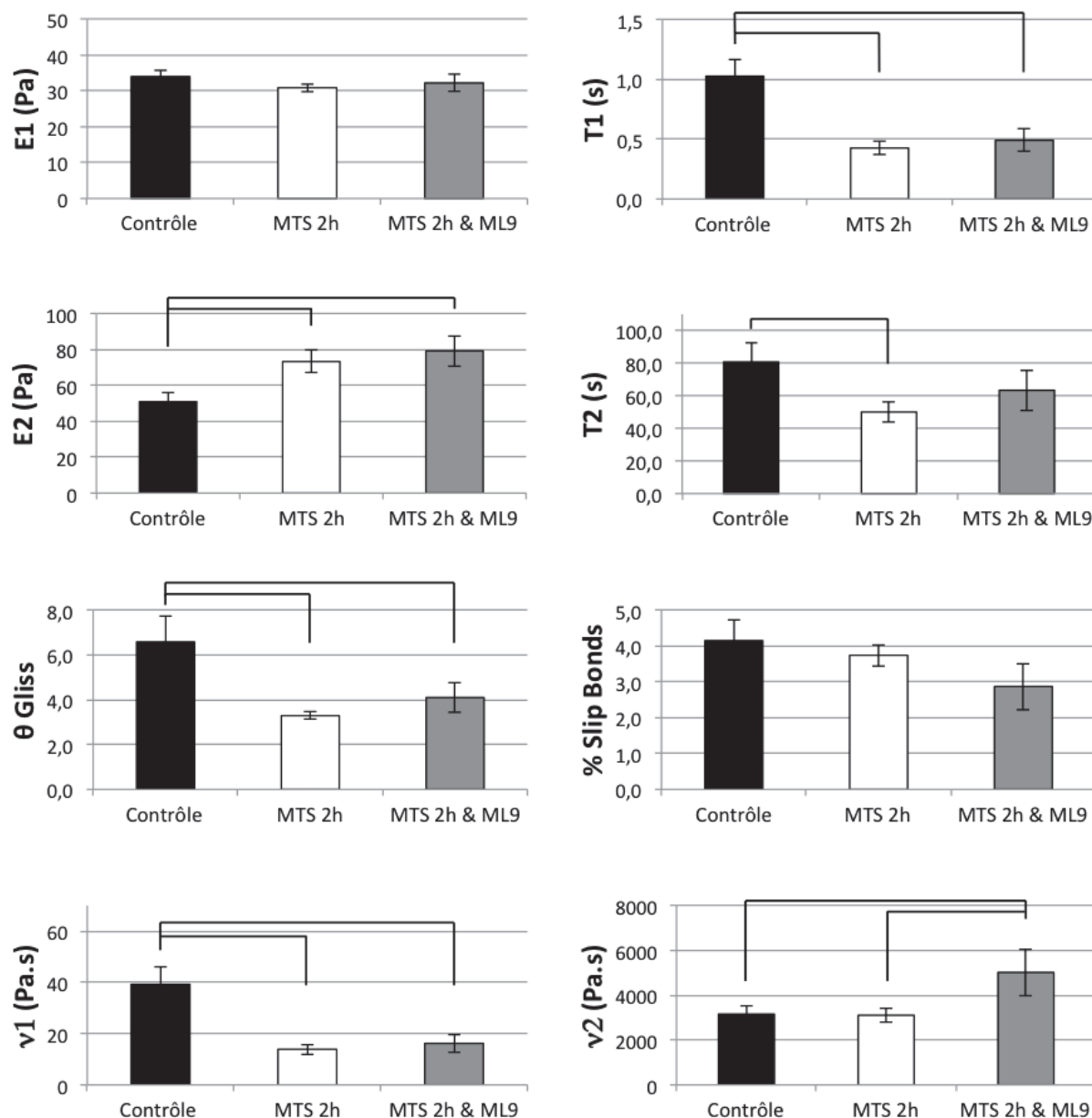


Figure 44. Mesures rhéologiques obtenues en utilisant le modèle d'analyse par modèle viscoélastique à deux compartiments et glissement (DVG).

Par ces mesures on obtient les valeurs : de rigidité du CSK du compartiment cortical (E1), de sa constante de temps (T1) et de son module de viscosité ($\nu 1$) ; les valeurs de rigidité du CSK du compartiment profond (E2), de sa constante de temps (T2) et de son module de viscosité ($\nu 2$) ; du pourcentage de liens immatures (% Slip Bonds) ; de l'angle de glissement de la bille par rapport à la cellule (θ Gliss). n = 25 pour le groupe Contrôle ; n = 31 pour le groupe MTS 2h ; n = 14 pour le groupe MTS 2h & ML9

Ces résultats suggèrent que la stimulation mécanique (MTS) de deux heures induit un remaniement important de la structure cytosquelettique et des interactions intégrines-ligand matriciel que nous allons tenter de caractériser d'un point de vue plus fondamental avec le modèle d'adhésion basé sur la probabilité de détachement des liens.

Résultats

IV. 2.2 Analyse par le modèle viscoélastique à deux compartiments et paramètre cinétique d'adhésion

Comme précédemment nous comparons sur la Figure 45 les situations suivantes : 2h sans MTS, 2h de MTS, et 2h de MTS sur des cellules traitées au ML9.

Avec cette analyse, nous observons que le cytosquelette subit une augmentation non significative de rigidité du compartiment profond (E2) suite à une stimulation mécanique (MTS 2 h). Cette augmentation devient significative pour les cellules traitées au ML9. Il n'y a pas de changement significatif dans le temps de réponse (T2) du compartiment profond. Cependant la viscosité (ν_2) du compartiment profond des cellules stimulées mécaniquement et traitées au ML9 semble augmenter bien que la dispersion des mesures ne permette pas d'observer des variations significatives sur ces données.

Il n'y a pas de différences significatives de rigidité du compartiment cortical (E1) entre les trois conditions. Toutefois les deux autres paramètres caractérisant la réponse viscoélastique du compartiment cortical que sont T1 et ν_1 sont fortement modifiés par rapport au groupe contrôle après stimulation. Le traitement par ML9 n'apportant qu'une légère modération.

Le taux de dissociation (k_{off}^0) s'avère significativement diminué suggérant un renforcement des liens intégrines-ligand matriciel pour les cellules exposées à la stimulation mécanique avec et sans traitement au ML9. Enfin, le pourcentage de liens immatures (% Slip Bonds) varie relativement peu et de manière non significative.

Résultats

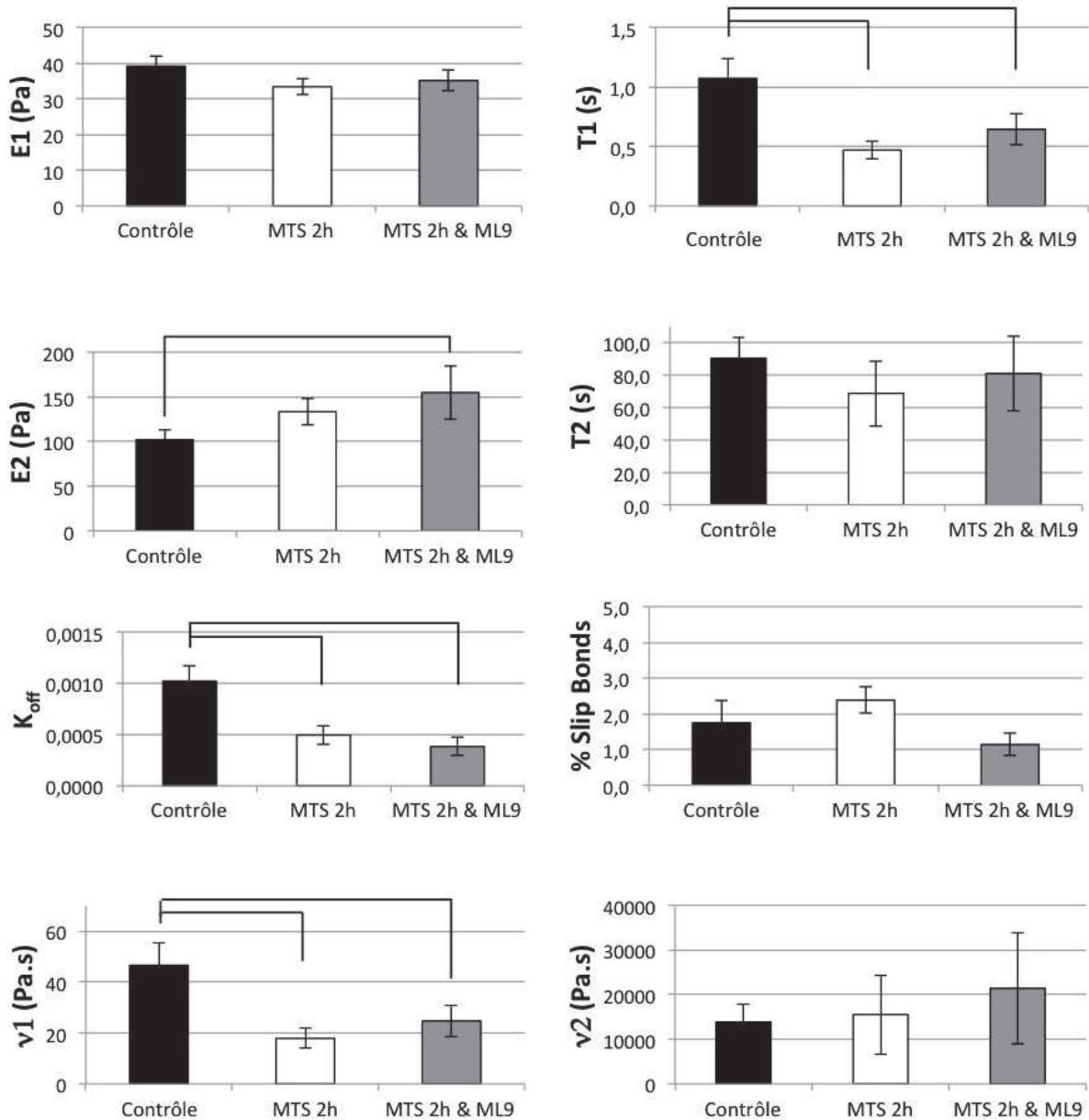


Figure 45. Mesures rhéologiques obtenues en utilisant le modèle d'analyse par modèle viscoélastique à deux compartiments et adhésion (DVA).

Par ces mesures on obtient les valeurs : de rigidité du CSK du compartiment cortical (E1), de sa constante de temps (T1) et de son module de viscosité ($\nu 1$) ; les valeurs de rigidité du CSK du compartiment profond (E2), de sa constante de temps (T2) et de son module de viscosité ($\nu 2$) ; du pourcentage de liens immatures (% Slip Bonds) ; du taux de dissociation des liens intégrines-billes (K_{off}). n = 23 pour le groupe Contrôle ; n = 23 pour le groupe MTS 2h ; n = 13 pour le groupe MTS 2h & ML9.

Au bilan, cette analyse des données MTC renforce l'hypothèse d'un remaniement du cytosquelette cellulaire bien mis en évidence par le modèle double Voigt et paramètre de glissement. De plus, la diminution du taux de dissociation (k_{off}^0) confirme que la barrière d'énergie des liens "intégrine-ligand matriciel" est augmentée dans les cellules stimulées mécaniquement. Le traitement par ML9 ne permet pas d'empêcher ce renforcement.

Résultats

Nous vérifions dans le paragraphe ci-dessous que le renforcement de l'adhésion présentement observé dans les HPMEC après stimulation mécanique n'est pas spécifiquement dépendant du modèle mécanique choisi. En l'occurrence nous testons une nouvelle analyse des mêmes données MTC avec un modèle simple Voigt avec adhésion (modèle à un compartiment et paramètre d'adhésion).

IV. 2.3 Analyse par le modèle viscoélastique à un compartiment et paramètre d'adhésion

Sur la Figure 46 sont comparées les mêmes situations que précédemment : 2h sans MTS, 2h de MTS, et 2h de MTS sur des cellules traitées au ML9.

Le résultat important obtenu avec cette analyse est de constater que les diminutions du k_{off}^0 après stimulation mécanique sont conservées avec ce modèle et cela de manière significative comme on le voit dans les groupes sans et avec traitement par ML9 (respectivement -29,2% et -39,7% par rapport au groupe contrôle ; $p < 0,01$).

D'autre part les modifications de la réponse mécanique du cytosquelette sont attestées par une diminution de la constante de temps (T) significative (respectivement -54,2% et -45,2% groupes stimulés sans et avec traitement par ML9) lorsque les cellules sont stimulées mécaniquement et ceci essentiellement en raison de la diminution du module de viscosité (ν) (respectivement -57,9% et -52,3% pour les groupes stimulés sans et avec traitement au ML9). Le traitement par ML9 ne modifie pas les résultats. Le pourcentage de liens immatures (% Slip bonds) reste constant dans les trois groupes.

Résultats

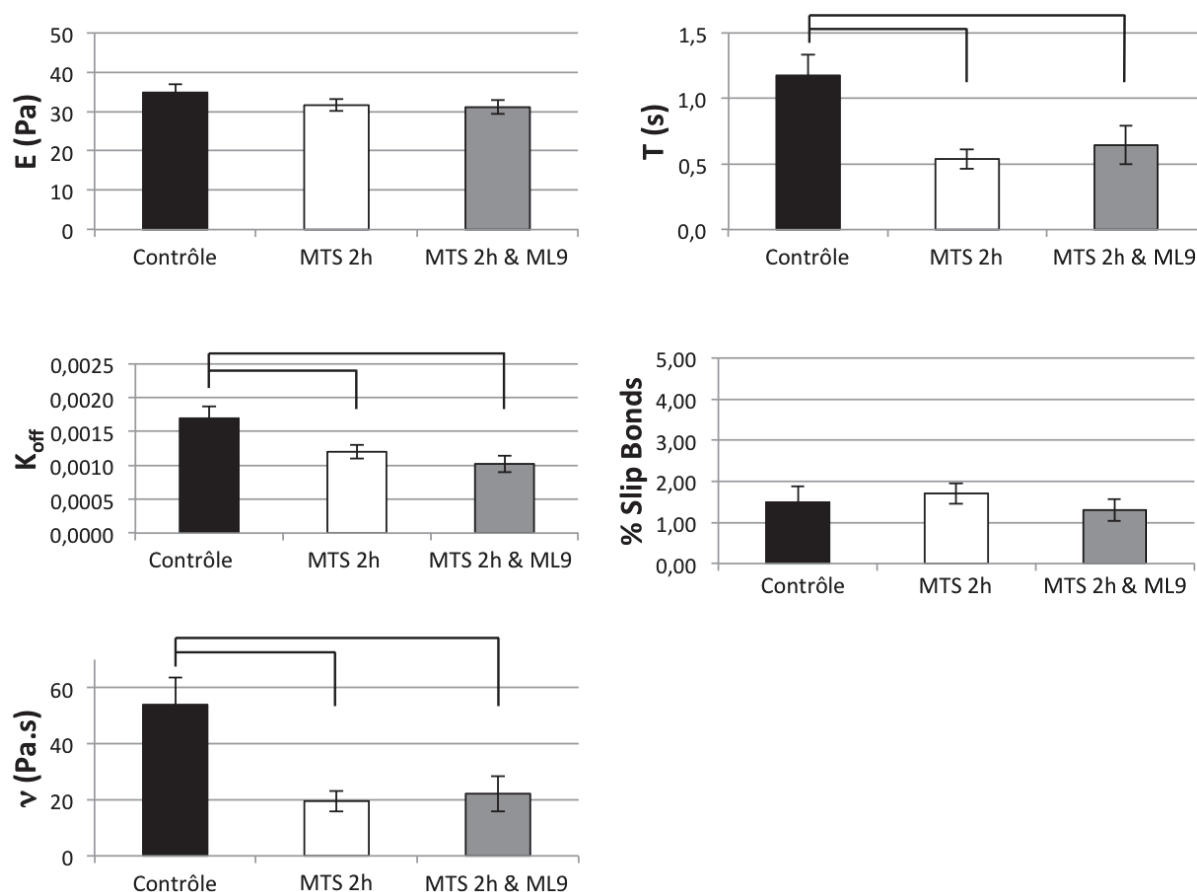


Figure 46. Mesures rhéologiques obtenues en utilisant le modèle d'analyse par modèle viscoélastique à un compartiment et adhésion (SVA).

Par ces mesures on obtient les valeurs : de rigidité du CSK (E) ; de la constante de temps du CSK (T) ; du pourcentage de liens immatures (% Slip Bonds) ; du taux de dissociation des liens intégrines-billes (K_{off}) et du module de viscosité (ν). $n = 26$ pour le groupe Contrôle ; $n = 33$ pour le groupe MTS 2h ; $n = 20$ pour le groupe MTS 2h & ML9.

En résumé de l'analyse des résultats expérimentaux MTC par les trois modèles proposés, nous observons des évolutions globalement cohérentes de la réponse mécanique du cytosquelette et d'un paramètre essentiel de l'adhésion à savoir le k_{off}^0 .

IV. 3 Effet d'une contrainte mécanique cyclique ciblant le CSK sur la redistribution des molécules d'adhésion

Les conséquences moléculaires de la MTS sont étudiées par un marquage immunofluorescent de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et de la VE-cadhérine. La Figure 47 montre l'évolution des clusters d'intégrines $\alpha_v\beta_3$ dans les trois conditions : 2h sans MTS (Contrôle), 2h de MTS (MTS 2h), et 2h de MTS sur des cellules traitées au ML9 (MTS 2h +ML9).

Résultats

Sur la Figure 47-a, on remarque une augmentation notable de la "clusterisation" des intégrines $\alpha_v\beta_3$ au pôle basal cellulaire entre la situation Contrôle et les cellules exposées à 2 heures de MTS. On note que cette "clusterisation" est localisée aux extrémités des fibres de stress apparaissant dans les cellules après MTS. Le traitement de la culture par ML9 diminue la quantité de "clusters" mais pas au point de revenir à la situation Contrôle.

La quantification des tailles de "clusters" sur la Figure 47-b montre une augmentation par 16 du nombre de clusters d'intégrine > 40 pixels² entre la situation Contrôle et la situation MTS 2h ($p < 0,01$). Le traitement de la culture au ML9 empêche en partie la "clusterisation" de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ avec une quantité de clusters diminué de 50,2% ($p < 0,01$) entre la situation MTS 2h et la situation MTS 2h +ML9. La différence du nombre de clusters entre la situation Contrôle et la situation MTS 2h +ML9 reste significative, ce qui indique que le traitement au ML9 ne permet pas de prévenir totalement la "clusterisation" des intégrines $\alpha_v\beta_3$.

Résultats

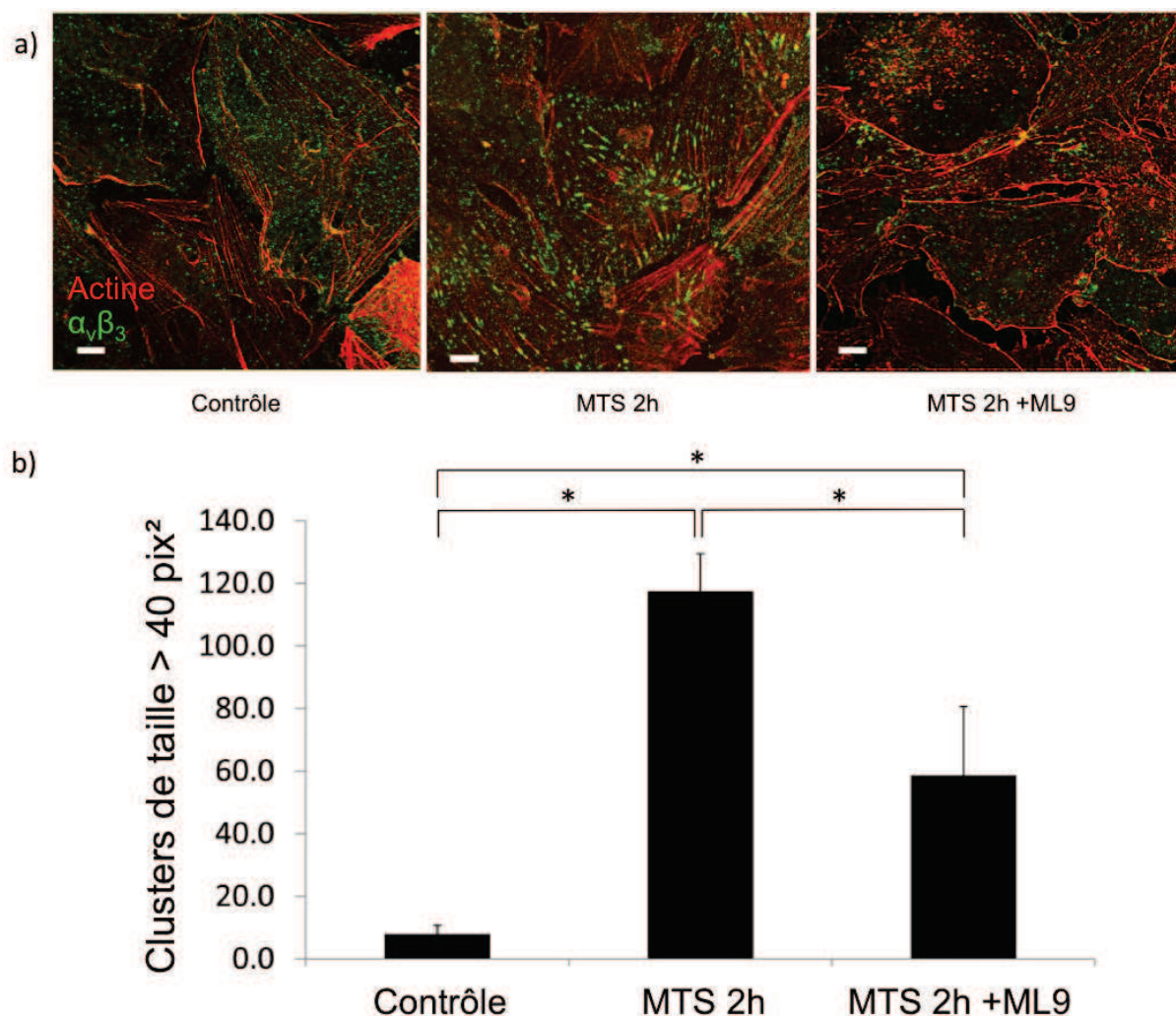


Figure 47. Marquages de l'actine et de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et quantification de ses clusters.

a) Vues en microscopie confocale de l'actine (en rouge) et de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (en vert) en fonction du temps de stimulation et du traitement avec le ML9. Échelle = 10 μm . b) Quantification des clusters d'intégrine $\alpha_v\beta_3$ de taille > 40 pixels² au pôle basal des HPMEC. En a) et b) les groupes Contrôle correspondent au cellules non stimulées ; le groupe MTS 2h correspond au cellules exposées à 2 heures de magnéto-stimulation ; le groupe MTS 2h + ML9 correspond au cellules traitées au ML9 comme décrit dans Matériel et Méthodes puis exposées à 2 heures de magnéto-stimulation. Valeurs moyennes \pm SD

Dans l'ensemble ces résultats montrent que les contraintes mécaniques cycliques ciblant le cytosquelette entraînent une redistribution d'ampleur des molécules jouant un rôle clé dans l'adhésion cellule-matrice, les billes étant "vues" par la cellule comme des mini-matrices et servant par la même occasion de capteurs des paramètres décrivant la cinétique de l'adhésion matricielle.

D'autres molécules d'adhésion sont modifiées par MTS comme la VE-cadhérine, molécule de jonctions intercellulaires. Nous comparons sur la Figure 48 les marquages de la

Résultats

VE-cadhérine dans les HPMEC dans les conditions suivantes : 2h sans MTS (Contrôle) et 2h de MTS (MTS 2h).

On remarque un ensemble de jonctions continues en forme de "fermeture éclair" pour les cellules de la situation Contrôle. En revanche, les cellules exposées à 2 heures de MTS présentent des courbures convexes augmentées entre les points de contacts intercellulaires et une internalisation des cadhérines marquées qui se concentrent (1) dans la région centrale de la cellule aux dépens de la périphérie et (2) dans les sites d'adhérence entre cellules. Les courbures forment des espaces intercellulaires d'une taille comprise entre 2 et 12 μm largement suffisante pour permettre le passage de solutés voire de larges macromolécules.

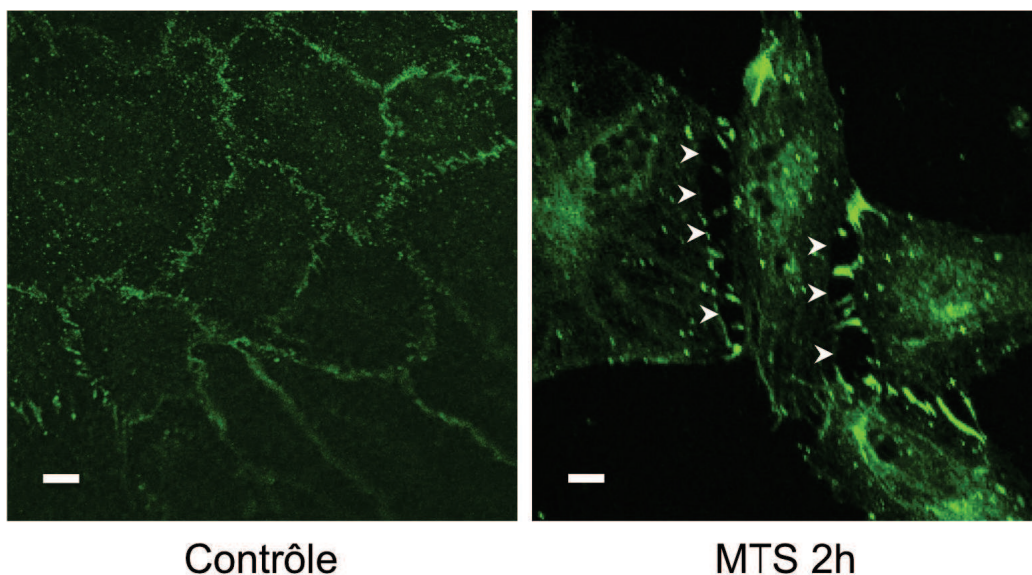


Figure 48. Vues en microscopie à fluorescence du marquage de la VE-cadhérine sur les HPMEC.

Sur les cellules laissées au repos (Contrôle) il y a une continuité des liaisons intercellulaires en forme de fermeture éclair mettant en jeu la VE-cadhérine. Les cellules stimulées mécaniquement (MTS 2h) ne présentent plus cette continuité jonctionnelle et seulement quelques points de contacts très marqués ; les flèches indiquent les trous intercellulaires. Échelle = 10 μm .

Ces résultats suggèrent que la MTS de 2 heures induit des redistributions moléculaires allant dans des sens opposés entre les sites d'adhésion cellule-matrice et les sites d'adhésion cellule-cellule.

IV. 4 Effet d'une contrainte mécanique cyclique ciblant le CSK sur l'expression protéique

Nous avons voulu vérifier si cette redistribution de la VE-cadhérine observée après MTS (Figure 48) était due à une baisse de la quantité de VE-cadhérine. Nous avons donc réalisé des expériences de Western Blot pour quantifier le niveau de VE-cadhérine total. La Figure 49 présente cette quantification de VE-cadhérine totale au sein des HPMEC en fonction de la durée de MTS. Les situations quantifiées sont : 2h sans MTS (Contrôle), 1h de MTS (MTS 1h) et 2h de MTS (MTS 2h).

La MTS de 1 à 2 heures entraîne une diminution significative de la VE-cadhérine dans les HPMEC. Ainsi, après 1 heure de MTS, nous observons une baisse de 27,5% ($p < 0,05$) de la quantité de VE-cadhérine par rapport à la situation Contrôle. Après 2 heures de MTS, nous observons une diminution de 40,9% ($p < 0,05$) de la quantité de VE-cadhérine par rapport à la situation Contrôle. Il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre les situations MTS 1h et MTS 2h.

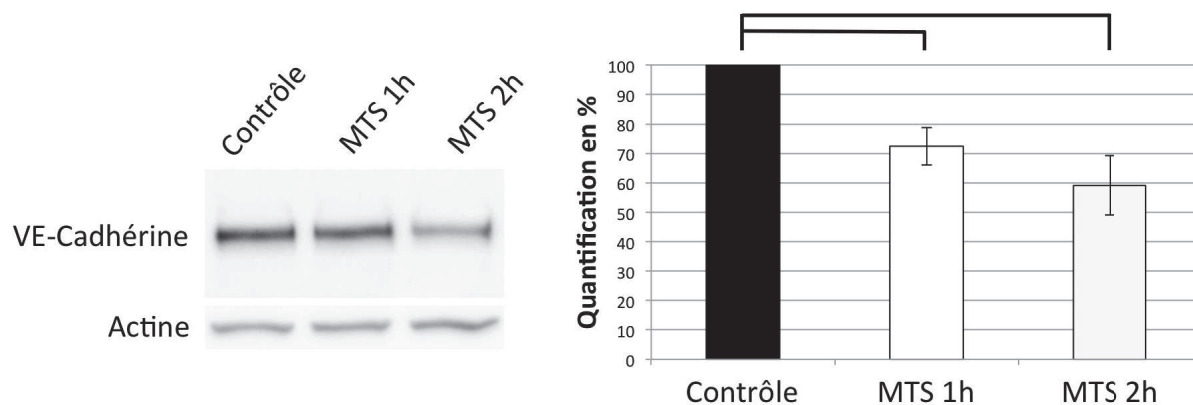


Figure 49. Western blot et quantification de la VE-cadhérine dans les cultures de HPMEC selon les conditions de stimulation.

La quantification des westerns blots indique une diminution de la VE-cadhérine de 27,5% par rapport au contrôle après 1 heure de stimulation (MTS 1h) et de 40,90% après 2 heures (MTS 2h). Valeurs moyennes \pm SD ; n = 4 pour chaque groupe.

La diminution de la quantité de VE-cadhérine présentement mesurée au sein des HPMEC stimulées pose la question des causes de cette disparition partielle. D'autre part, le remaniement des cadhérines induit par la stimulation pourrait être associé à cette disparition partielle.

Résultats

Nous avons voulu vérifier, si en parallèle à la diminution de la VE-cadhérine aux jonctions, existait un renforcement des intégrines $\alpha_v\beta_3$ tel que fortement suggéré par les observations effectuées en microscopie confocale. La Figure 50 présente la quantification des deux sous-unités de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ en fonction de la durée de MTS. Les groupes sont les mêmes que précédemment, à savoir : 2h sans MTS (Contrôle), 1h de MTS (MTS 1h) et 2h de MTS (MTS 2h).

Nous n'avons observé aucune variation de la quantité de deux sous-unités α_v et β_3 dans les situations stimulées (MTS 1h et MTS 2h) par rapport à la situation Contrôle. Nous n'avons pas non plus observé de variation significative du rapport des quantités entre la sous-unité α_v et la sous-unité β_3 dans les trois conditions suggérant que la quantité globale d'intégrines $\alpha_v\beta_3$ est conservée au cours de la MTS.

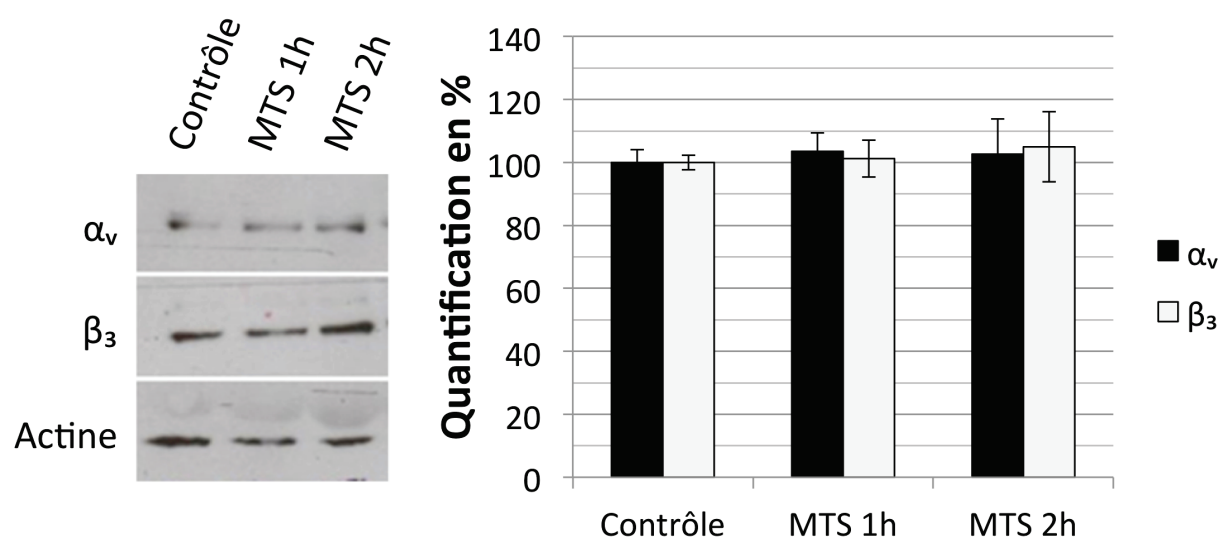


Figure 50. Western blot et quantification des deux sous-unités de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans les cultures de HPMEC selon les conditions de stimulation. Valeurs moyennes \pm SD.

Ces résultats indiquent que le phénomène de renforcement et de clusterisation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ne semble pas mettre en jeu une variation de la quantité de cette dernière au cours des deux heures de stimulation mais plutôt une relocalisation au sein de la cellule. Ceci suggère que le renforcement des sites d'adhésion cellule-matrice qui mettent en jeu les intégrines $\alpha_v\beta_3$ passe par un recrutement local de ces intégrines déjà présentes à l'intérieur du cytoplasme.

IV. 5 Effet d'une contrainte mécanique cyclique ciblant le CSK sur la perméabilité d'une monocouche endothéliale

La perméabilité d'une monocouche de HPMEC exposée à différents temps de MTS a été quantifiée par le passage d'un traceur fluorescent (Dextran-FITC) au travers d'une monocouche cellulaire confluyente cultivée sur un support perméable. Sachant que le substrat cellulaire et ses propriétés peuvent influencer sur le cytosquelette et la forme cellulaire, nous avons au préalable vérifié que les cellules présentaient des phénotypes comparables sur les supports perméables et sur les supports de MTC.

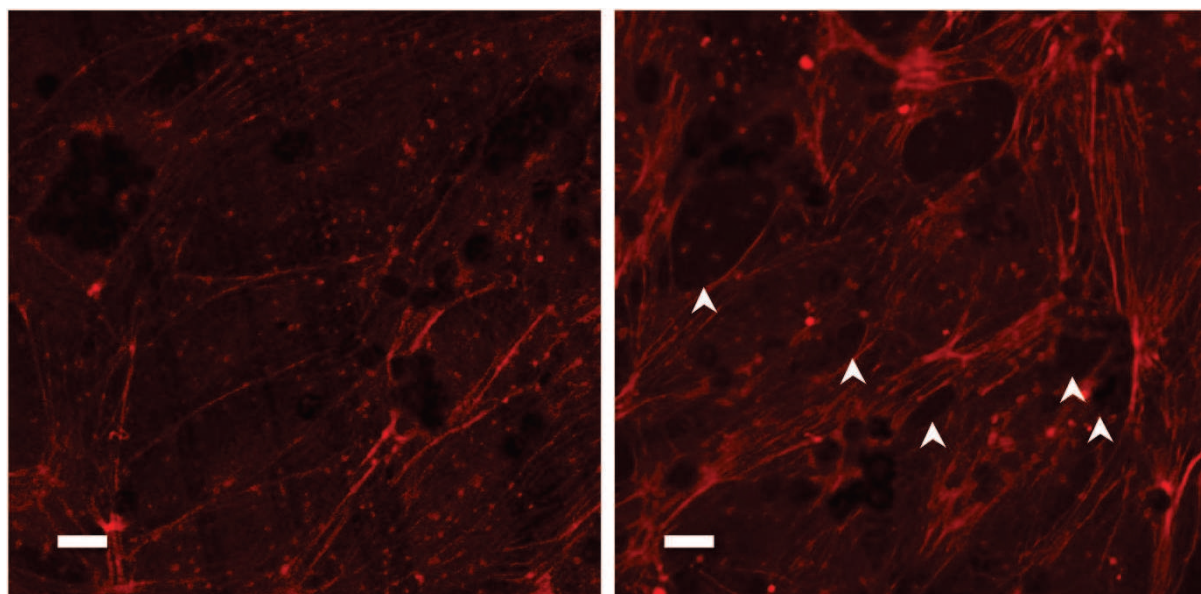
La Figure 51 présente les marquages de l'actine sur des HPMEC cultivées à confluence sur les supports perméables et (1) exposés à 2 h de magnétostimulation (MTS 2h) ou (2) laissées au repos (Contrôle).

Dans la situation Contrôle, les cellules apparaissent confluentes et présentent peu ou pas de fibres d'actine sauf en périphérie. Dans la situation MTS 2h, les cellules présentent des fibres de stress largement répandues dans les cellules.

Les cellules qui sont jointives dans la situation Contrôle sont au contraire disjointes dans la situation stimulée où des espaces intercellulaires apparaissent. Ces espaces (indiqués des flèches) ont une taille variable de 1 à plus de 15 μm dans leur plus grande dimension.

Les points rouges d'une taille de 0,4 μm correspondent aux pores des supports perméables.

Résultats



Contrôle

MTS 2h

Figure 51. Vues en microscopie du marquage de l'actine des HPMEC cultivées sur les supports poreux servant aux expérimentations de mesure de perméabilité.

Le groupe Contrôle présente peu ou pas de fibres de stress. Le groupe MTS 2h présente de nombreuses fibres de stress. Les taches circulaires sombres sont les empreintes des microbilles (4,5 μm) sur les cellules. Les flèches indiquent les trous intercellulaires ; les points rouges (0,4 μm) correspondent aux pores du support de culture. Échelle = 10 μm .

Les résultats présentés dans la Figure 52 correspondent à la quantification du dextran-FITC passant au travers d'une monocouche de HPMEC en fonction du temps. Les situations présentées correspondent à : cellules sans MTS (Contrôle), cellules MTS sans traitement chimique (MTS) et cellules MTS préalablement traitées au ML9 (MTS + ML9).

Le passage du traceur au travers de la monocouche de HPMEC est significativement augmenté après 1 heure de stimulation par rapport à la situation Contrôle. En effet, on observe une augmentation de 39,1% ($p < 0,01$) pour la situation MTS, et une augmentation de 20,3% ($p < 0,05$) pour la situation MTS + ML9.

Cette différence se poursuit après 2 heures de stimulation avec une augmentation de 45,3% ($p < 0,01$) du passage du traceur dans la situation MTS par rapport à la situation Contrôle, et une augmentation de 25,5% ($p < 0,01$) dans la situation MTS + ML9 par rapport à la même situation Contrôle. On note une tendance du traitement par ML9 à limiter les effets de la MTS sur le passage du dextran-FITC au travers de la couche de HPMEC. En effet à deux heures, il y a une diminution de 13,6% (avec $p = 0,057$) du passage de dextran entre le groupe MTS et le groupe MTS + ML9.

Résultats

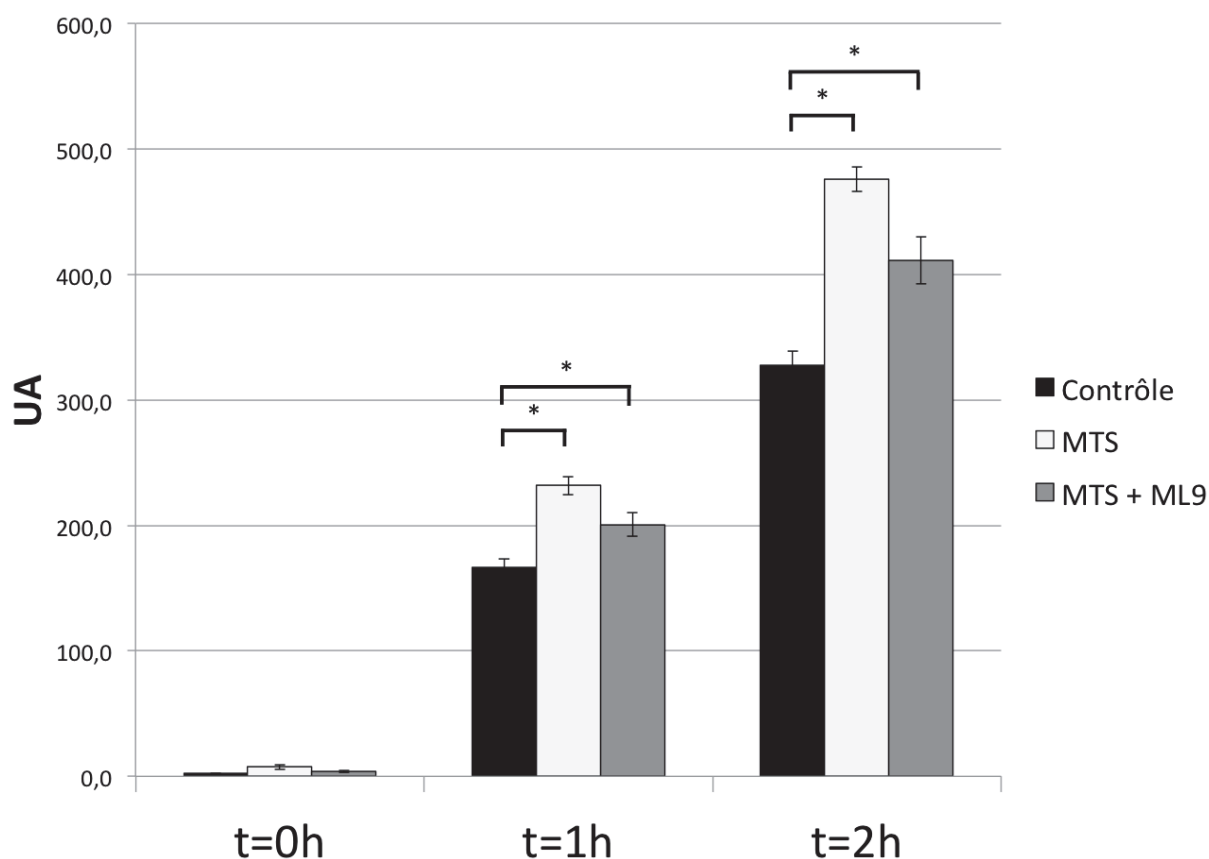


Figure 52. Quantification en unités arbitraires (UA) du passage d'un dextran-FITC en fonction du temps d'exposition des monocouches de HPMEC à la magnétostimulation.
Contrôle : cellules non exposées à la magnétostimulation ; n = 14. MTS : Cellules exposées à la magnétostimulation ; n = 8. MTS + ML9 : cellules exposées à la magnétostimulation, préalablement traitées au ML9 ; n = 17.

Les expériences de perméabilité conduites dans ce travail montrent qu'il existe une fuite à l'état basal dans le modèle de monocouche de HPMEC. Cette fuite peut être considérée comme physiologique dans la mesure où un passage continu de fluide allant du compartiment sanguin vers le milieu interstitiel existe *in vivo*. Le surplus de liquide est récupéré par le réseau lymphatique, empêchant la création d'un œdème à l'état basal.

Un point important du modèle étudié est que nos données montrent clairement une augmentation de la fuite au travers de la monocouche lorsque les cellules sont exposées aux contraintes cycliques ciblant le CSK et appliqué par MTS. Les présentes données fonctionnelles sont à mettre en relation avec les observations sur les changements morphologiques et mécaniques du cytosquelette d'actine et des molécules d'adhésion (cellule-substrat et cellule-cellule) au cours de la stimulation mécanique.

Discussion

V. Discussion

Nous avons dans ce travail étudié la réponse structurale, mécanique, moléculaire et fonctionnelle d'une monocouche confluyente de cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines en la soumettant à des contraintes mécaniques cycliques ciblant spécifiquement le cytosquelette. Il s'agit d'une culture de cellules primaires choisies pour conserver un phénotype proche d'une réalité physiologique et biologique rencontrée lors de la ventilation mécanique cyclique de patients atteints d'une défaillance respiratoire gravissime appelée Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë (SDRA). Il s'agissait au départ de cette étude de savoir si un tel modèle de cellules endothéliales des territoires pulmonaires profonds étudiées *in vitro* était capable de reproduire, au moins en partie, certaines manifestations supposées du versant cellulaire du SDRA. La réponse à cette question est affirmative. L'augmentation du passage d'une molécule fluorescente au travers de la monocouche de cellules endothéliales est un argument fort en faveur de la capacité du modèle cellulaire à reproduire les causes d'un œdème pulmonaire caractérisé par le passage exagéré du plasma sanguin des capillaires dans les territoires alvéolaires. Encouragés par ce résultat, une deuxième question posée au modèle est sa capacité à reproduire les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de cette augmentation du passage transendothélial. La réponse à cette deuxième question est discutée en détail dans les paragraphes qui suivent mais la réponse globale à cette question est également affirmative. En effet, la cohérence trouvée entre les résultats structuraux, mécaniques, moléculaires et fonctionnels laisse à penser que le modèle cellulaire développé dans cette thèse permet de préciser les causes des dysfonctionnements de la monocouche endothéliale une fois stimulée mécaniquement et d'échafauder des hypothèses plus précises sur les mécanismes physiopathologiques et biologiques qui conduisent à cette situation clinique gravissime. En résumé, nous trouvons que la stimulation mécanique cyclique ciblant le cytosquelette entraîne un remaniement structural et moléculaire profond caractérisé par (1) une augmentation de la tension interne des cellules endothéliales, (2) une redistribution des molécules d'adhésion au bénéfice des adhésions cellules-matrice et aux dépens des adhésions cellule-cellule, (3) une perte de l'intégrité et de la confluence de la couche

Discussion

endothéliale responsable du dérèglement de la perméabilité inter/paracellulaire de la couche endothéliale. Dans les paragraphes qui suivent, nous discutons l'effet de la contrainte mécanique sur les différents systèmes cellulaire et moléculaire mis en jeu dans cette augmentation de perméabilité, à savoir les modifications induites par le stress mécanique sur les différentes interactions cellule-substrat, cellule-cellule, sur la tension interne (interactions actine-myosine), et la perméabilité endothéliale.

- Contrainte mécanique et interactions cellule-matrice

Un des modèles explicatifs les plus avancés concernant la régulation de la barrière endothéliale vasculaire pulmonaire est celui de Dudek et Garcia (Dudek and Garcia 2001). Ce modèle accorde au cytosquelette un rôle capital dans la régulation de la perméabilité endothéliale en considérant que, le déséquilibre des forces "intracellulaires et contractiles" d'un côté et "péricellulaires et adhésives" de l'autre va être à l'origine du dysfonctionnement de la barrière endothéliale. Cependant ce modèle ne fait appel au remaniement des interactions cellule-matrice qui sont un des points forts de nos résultats. Les résultats obtenus sur notre modèle apportent un faisceau d'arguments en faveur d'un renforcement des adhésions cellule matrice dans la monocouche endothéliale soumise au stress mécanique. Le renforcement des sites d'adhésion mettant en jeu l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ montré à la fois par la MTC et par le développement du nombre et de la taille des clusters de cette intégrine suite à une mobilisation du stock d'intégrines disponible, est la réponse à la stimulation mécanique externe apportée par notre modèle. A noter que la clusterisation et l'activation des intégrines $\alpha_v\beta_3$ ont déjà été montrées sur des cellules endothéliales exposées à des contraintes de cisaillement (Li, Haga et al. 2005), étant particulièrement présente dans les capillaires alvéolaires pulmonaires (Singh, Fu et al. 2000). Cette activation de $\alpha_v\beta_3$ par la contrainte de cisaillement se faisant dès la première minute et se poursuivant pendant 6 h après exposition au stress mécanique (Li, Haga et al. 2005), suggère que l'activation de l'intégrine est plus longue que le temps sur lequel nous l'avons étudiée. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ n'est pas la seule intégrine concernée par la réponse au stress mécanique. Par exemple les intégrines $\alpha_v\beta_5$ jouent un rôle important dans la réponse au stress mécanique et la régulation de la perméabilité (Su, Hodnett et al. 2007). Néanmoins, l'implication de $\alpha_v\beta_3$ dans l'angiogénèse (Sheppard 2004) en fait un candidat idéal dans le cadre du remodelage de la couche endothéliales induit dans notre étude par le stress mécanique. A noter que de

Discussion

nombreuses études ont montré que le stress mécanique active les intégrines dans l'endothélium favorisant le clustering (Wang, Miao et al. 2002), la migration (Lauffenburger and Horwitz 1996, Lock, Wehrle-Haller et al. 2008), les processus physiopathologiques cardiovasculaires et d'oncogénèse (Schwartz and Ginsberg 2002). D'ailleurs, dans notre modèle cellulaire comme dans nombre d'expériences utilisant les billes RGD (Wang, Butler et al. 1993, Hu and Wang 2006, Na, Collin et al. 2008), nous utilisons les intégrines pour transmettre les forces mécaniques cycliques au cytosquelette et nous ne pouvons que constater l'efficacité de cette voie moléculaire pour transférer la force au niveau intracellulaire.

- Contrainte mécanique et tension interne

Le rôle du cytosquelette d'actine dans la perméabilité endothéliale a été largement évoqué par Dudek et Garcia (Dudek and Garcia 2001) sur la base d'un rôle avéré de la cytochalasine D qui en altérant le cytosquelette d'actine augmente la perméabilité endothéliale (Shasby, Shasby et al. 1982) alors que la phalloïdine, qui stabilise l'actine, prévient les dysfonctions induites par la thrombine (Phillips, Lum et al. 1989). Dans notre étude, nous trouvons que la structure d'actine est fortement remaniée - renforcée - en réponse à la contrainte mécanique imposée et que ce remaniement est associé à une modification des propriétés mécaniques mesurées par MTC. A noter que la réponse au stress mécanique des cellules épithéliales se caractérise par une corrélation entre rigidification et recrutement d'actine (Icard-Arcizet, Cardoso et al. 2008). Dans notre étude, au moins l'un ou les deux paramètres mécaniques suivants sont modifiés: constante de temps viscoélastique, modules de rigidité, de viscosité. Pour des raisons évoquées dans la Bibliographie (section II. 3.5), il est actuellement difficile de relier quantitativement les changements dans la structure d'actine aux changements de ses propriétés rhéologiques, mais ce qui est sûr c'est que le sens des évolutions structurelles est cohérent avec les changements mécaniques. Les augmentations du module rigidité de la composante profonde du CSK (Figure 44) suggèrent fortement une augmentation de la tension interne dans les cellules endothéliales. Les changements du module de viscosité du CSK parfois observés dans nos cellules sont également le signe de changements dans l'organisation des filaments d'actine. Par exemple, une baisse des interactions signerait une augmentation de la fluidité de glissement des filaments entre eux (Humphrey, Duggan et al. 2002). Il est bien

Discussion

connu que les protéines liées à l'actine comme la myosine sont susceptibles de générer des forces de tension intracellulaire par couplage avec le cytosquelette (Wong and Gotlieb 1990, Dudek and Garcia 2001). En présence d'une contrainte unidirectionnelle, les cellules s'alignent dans la direction des contraintes en même temps que la myosine II est activée et que leurs fibres de stress se réorganisent dans le sens de la contrainte (Zhao, Laschinger et al. 2007, Jungbauer, Gao et al. 2008). Dans les expériences présentées dans ce travail, la MTS génère des contraintes tridimensionnelles qui diffèrent des cisaillements unidirectionnels apportés par l'écoulement sanguin ou les écoulements laminaires des chambres à flux. C'est probablement la raison pour laquelle nous n'observons pas de direction privilégiée dans l'organisation des fibres de stress sauf peut-être par la création de structures de type fibres de stress apparaissant et probablement reliant les billes. Concernant les temps nécessaires à la mise en œuvre de ces réorganisations, il est connu que quelques secondes après l'application d'un écoulement sur les cellules endothéliales, apparaît une activation des canaux ioniques (Potassium channels), et l'activation de la voie contractile au travers de la signalisation par les Rho GPTases (Nobes and Hall 1995). Les travaux fondamentaux de Choquet et coll. (Choquet, Felsenfeld et al. 1997) ont démontré l'existence d'une régulation cellulaire rétroactive entre les forces intra et extracellulaires. Cette régulation fait que les forces extracellulaires peuvent activer des modifications au niveau de l'organisation du CSK (Icard-Arcizet, Cardoso et al. 2008) ainsi que la réorganisation des sites d'adhésion (Choquet, Felsenfeld et al. 1997, Heil and Spatz 2010). A noter que, *in vivo*, les forces de cisaillement s'exercent sur la couche de glycocalyx qui recouvre les cellules endothéliales et qui est liée aux récepteurs transmembranaires responsables de la mécanotransduction (Davies 1995).

- Contrainte mécanique et interactions cellule-cellule

Le rôle des jonctions cellule-cellule est considéré d'une façon générale comme essentiel au maintien de l'intégrité de la couche endothéliale, sa perméabilité étant augmentée lorsqu'on inhibe la VE-cadhérine avec un anticorps dirigé contre celle-ci (Corada, Mariotti et al. 1999, Dejana, Bazzoni et al. 1999, Dudek and Garcia 2001). Comme pour les intégrines, l'inhibition de la VE-cadhérine par un anticorps va aboutir à la réorganisation du CSK d'actine (Hordijk, Anthony et al. 1999). En accord avec ces travaux, nos résultats montrent que l'augmentation de la perméabilité de la monocouche endothéliale est effectivement associée à une diminution de la VE-cadhérine attestée par marquage et

Discussion

Western Blot et à une réorganisation de l'actine et des molécules d'adhésion. Les liens contrôlant l'adhésion cellule-cellule forment une chaîne dynamique entre les molécules de cadhérine, les caténines cytosoliques et les filaments d'actine (Chu, Thomas et al. 2004). C'est dans ce cadre que les cadhérines régulent le cytosquelette et qu'en retour, ce dernier permet la stabilisation des liaisons cellule-cellule en réponse aux forces extérieures appliquées et/ou autres changements environnementaux (Mege, Gavard et al. 2006, Thoumine, Lambert et al. 2006). Il a été montré que le niveau de force transmis par le CSK aux cadhérines dépend de la rigidité de l'environnement extracellulaire, plus la matrice est rigide, plus le niveau de force transmise augmente (Tsai and Kam 2009, Ladoux, Anon et al. 2010, Chopra, Tabdanov et al. 2011). Cependant, les mesures de force de rupture effectuées sur les cadhérines montrent qu'il s'agit de liens faibles ($F^*=35-55$ pN pour la liaison cadhérine-cadherine). Notre approche théorique du problème des liens multiples (Isabey, Fereol et al. 2013) confirme que les cadhérines, en tant que liens faibles, doivent s'associer pour travailler collectivement au maintien des liaisons intercellulaires (Baumgartner, Hinterdorfer et al. 2000, Tsukasaki, Kitamura et al. 2007).

Un des mécanismes du contrôle des "adhésions médiées par les cadhérines" est l'immobilisation des cadhérines dans la membrane obtenue en associant leur domaine cytoplasmique au réseau des filaments d'actine. Nous ne savons dans quel sens cette immobilisation des cadhérines est modifiée dans notre modèle cellulaire par l'application du stress mécanique. On peut en outre considérer (Baumgartner, Hinterdorfer et al. 2000) que le stress mécanique appliqué aux jonctions intercellulaires de cellules organisées en tissu est moins intense et que de hauts niveaux d'affinité ne sont pas nécessaires pour maintenir l'adhésion intercellulaire de cellules en tissus car elles sont en équilibre relatif et au repos (contrairement aux liaisons leucocytes-cellule endothéliales qui doivent contrebalancer les contraintes de cisaillement générées par l'écoulement sanguin sur ces liaisons). Nous pouvons donc supposer que, dans notre modèle, la rupture partielle des liens cellule-cellule apparaît lorsque les forces de traction intracellulaire deviennent supérieures à celle des liaisons cellule-cellule, et ceci en dépit de leur organisation collective (coopérative ou non coopérative, parallèle ou zipper... (Evans 2001, Williams 2003, Isabey, Fereol et al. 2013). En d'autres mots, l'augmentation de tension interne mesurée dans notre modèle cellulaire en réponse au stress appliqué, va dans le sens d'une augmentation des forces de contraction centripètes qui vont s'appliquer aux protéines transmembranaires des jonctions

Discussion

intercellulaires et potentiellement les affaiblir (Bazzoni 2006). A noter aussi que les bas niveaux d'affinité entre jonctions de type cadhérines créent une configuration favorable au remaniement cellulaire et au remodelage du cytosquelette d'actine que par ailleurs nous observons dans notre modèle cellulaire en réponse au stress mécanique (Sato, Schwarz et al. 1987). L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ qui interagit physiquement avec les nectines avant que les cadherines ne prennent le relais (Figure 7) a un rôle ambivalent. D'un côté, elle va jouer un rôle important dans l'adhésion intercellulaire initiale et l'inactivation de cette intégrine va inhiber les contacts intercellulaires favorisant certaines fonctions comme la migration ou la prolifération (Sakisaka, Ikeda et al. 2007). De l'autre, il a été montré que l'activation des intégrines $\alpha_v\beta_3$ est délétère pour les jonctions cellule-cellule car l'activation des intégrines $\alpha_v\beta_3$ rend les cellules hautement motiles, justifiant une perte des adhésions cellule-cellule que nous retrouvons aussi dans notre modèle (Sakamoto, Ogita et al. 2008). En réalité, les mécanismes conduisant à l'inactivation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ après la formation des jonctions adhérentes restent obscures (Sakamoto, Ogita et al. 2008). En revanche, la redistribution des intégrines $\alpha_v\beta_3$ en faveur des contacts cellule-matrice trouvée dans notre modèle pourrait bien se faire au détriment des jonctions intercellulaires, contribuant à augmenter les espaces intercellulaires. On notera aussi que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ active des protéines kinases dont PKC, FAK et c-Src (Sakisaka, Ikeda et al. 2007), elles-mêmes placées sous le contrôle des propriétés matricielles (Provenzano and Keely 2011) et des forces mécaniques (Mammoto, Huang et al. 2007, Mammoto, Mammoto et al. 2008). Ces molécules vont contribuer de façon complexe à la régulation des liaisons occlusives, tout comme les liaisons cadhérines sont placées sous le contrôle du complexe PAR3-PAR6-PKC (Sakisaka, Ikeda et al. 2007).

- Contrainte mécanique et perméabilité de l'endothélium

La vision actuelle des mécanismes contrôlant la perméabilité endothéliale considère que les changements structuraux et mécaniques au sein de la MEC peuvent réguler activement la perméabilité vasculaire en modifiant la formation à la fois des VE-cadherines et des jonctions occlusives (Dejana 2004). La régulation des jonctions intercellulaires cadhérines-dépendantes par les adhésions intégrines-dépendantes de la matrice est assez générale puisqu'elle a été observée dans différents types cellulaires (Clark 1994, Kawano, Katak et al. 2001, Marsden and DeSimone 2003, Janmey and McCulloch 2007). Le mécanisme par lequel la rigidité de la MEC modifie les jonctions cellule-cellule n'est pas

Discussion

réellement décrit, même si l'on sait que la localisation des VE-cadherine est changée d'une manière dépendante de la rigidité de la MEC, avec plus de VE-cadherine présentes dans le cytoplasme lorsque les substrats sont plus flexibles (Mammoto, Mammoto et al. 2013). Un mécanisme de contrôle possible considère le rôle des petites GTPases, Rho et rac, car la rigidité de la matrice (Provenzano and Keely 2011) et les forces mécaniques (Mammoto, Huang et al. 2007, Mammoto, Mammoto et al. 2008) contrôlent l'activité de ces petites protéines régulatrices alors que Rho et Rac ont été montrés réguler la localisation de la VE-cadherine et l'intégrité des jonctions cellule-cellule. On sait que tout changement dans l'état de phosphorylation de ces composants moléculaires intercellulaires va induire des changements conformationnels et altérer la perméabilité intercellulaire mais il reste à beaucoup à faire pour comprendre les liens entre l'activité des GTPases et l'intégrité des jonctions intercellulaire (Miyoshi and Takai 2005).

Notre étude suggère de décrire le mécanisme de régulation de l'endothélium en réponse au stress mécanique de la manière suivante (voir Figure 53) : la partie du stress mécanique directement perçue par le cytosquelette va induire une augmentation du niveau global de tension interne dans la structure du cytosquelette notamment au travers de l'activation des moteurs actomyosine. Les forces centripètes transmises par le cytosquelette et aboutissant aux sites d'adhésion augmentent dans l'ensemble de la structure. Les effets induits par cette augmentation des forces intracellulaires vont induire des effets opposés sur les jonctions cellule-cellule et les jonctions cellule-matrice. Les adhésions matricielles se renforcent au détriment des adhésions intercellulaires.

Stress mécanique

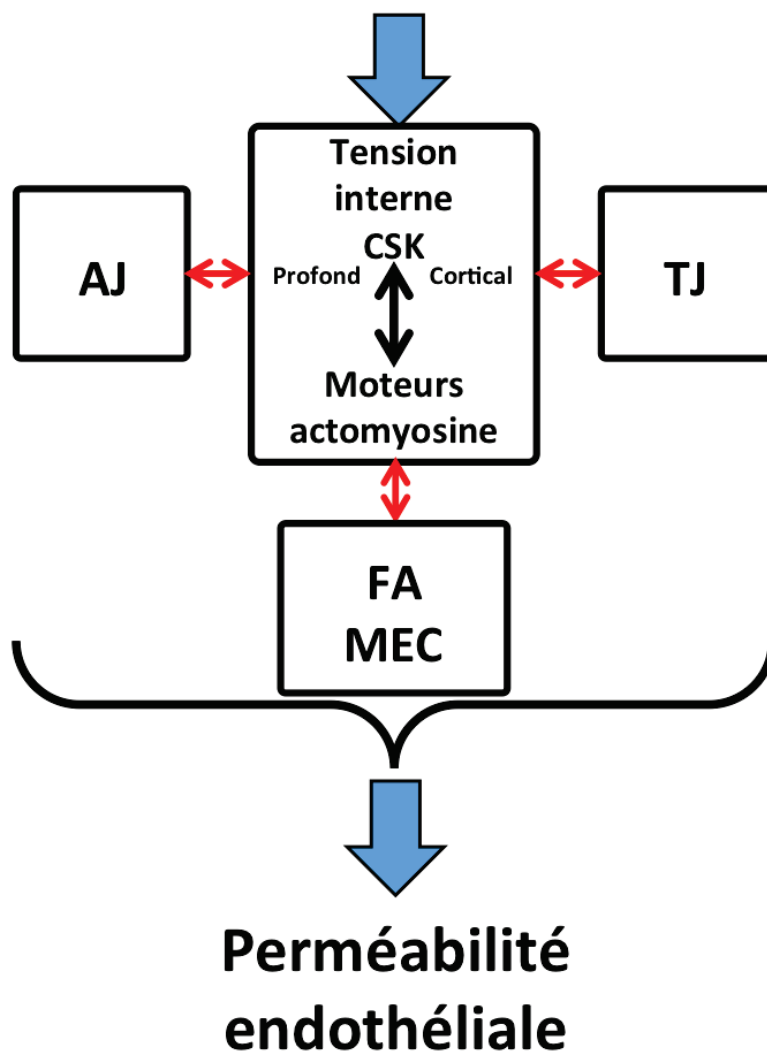


Figure 53. Schéma global du mécanisme proposé de régulation de la perméabilité par les changements de tension interne en réponse au stress mécanique.

AJ : jonctions adhérentes ; TJ : jonctions occlusives ; FA : adhésion focale ; MEC : matrice extra cellulaire.

Ceci est notamment dû aux hétérogénéités physiques et biologiques inhérentes à chaque type d'interface. Nous savons par exemple que le renforcement des sites d'adhésion est d'autant plus marqué que la rigidité du substrat est augmentée (Féréol, Fodil et al. 2009). Au remodelage du cytosquelette est donc associé une redistribution des adhésions dans la cellule qui s'opère au détriment des jonctions intercellulaires dont les conséquences sur la perméabilité sont d'aller vers une augmentation. Les systèmes de régulation cellule-cellule et cellule-matrice étant en fait interdépendants, ils sont à l'origine d'une séparation spatiale entre composantes d'adhésion cellule-cellule et cellule-matrice qui a récemment été montrée pour les cellules épithéliales (Burute and They 2012).

Discussion

Sur la base du présent travail, nous pouvons dire que le concept apporté par notre étude, à savoir cette polarisation latéro-basale des renforcements moléculaires sous l'effet d'une augmentation de la tension interne à l'échelle de la cellule, manquait à la compréhension des relations complexes entre stress mécanique et perméabilité de l'endothélium. Conclure que le transport paracellulaire à travers d'endothélium ne dépend que des fonctions et propriétés du CSK sous jacent aux jonctions intercellulaires paraît à juste titre une vision trop simplificatrice pour certains auteurs (Miyoshi and Takai 2005). Pour notre part, nous voyons dans l'augmentation de la tension interne du CSK des cellules endothéliales stressées un facteur intracellulaire commun à toutes ces évolutions, une cause commune à l'origine de toutes les défaillances induites par le stress mécanique.

Conclusion générale et perspectives

VI. Conclusion générale et perspectives

De nombreuses études cliniques ont suspecté le rôle du stress mécanique - au travers notamment de l'utilisation de modes/paramètres de ventilation mécanique inadaptés à l'état du patient - dans l'évolution des déficiences respiratoires majeures comme le poumon lésionnel aigu et sa forme la plus grave appelée SDRA. Les termes de "barotrauma" ou "volotrauma" ont ainsi été inventés pour conceptualiser les effets délétères respectivement d'un stress mécanique et de surdistensions alvéolaires excessives, sur l'intégrité de la barrière alvéolo-capillaire. Bien que les limites en termes de contrainte ou de déformation cellulaire ou tissulaire acceptables n'aient pas été réellement définies, chacun s'accorde sur la nécessité de ne pas bouleverser les équilibres physiques et physiologiques qui caractérisent les territoires pulmonaires particulièrement fragiles et sensibles à l'agression sous toutes ses formes. En effet, en raison d'une surface d'échange considérable permise par l'architecture vasculaire pulmonaire, l'endothélium pulmonaire qui fonctionne comme une barrière semi-perméable entre le compartiment sanguin et l'interstitium, est particulièrement sensible aux facteurs physiques et biologiques susceptibles de modifier la régulation de la barrière. Les hypothèses à la base des mécanismes physiopathologiques sont en général appuyées sur les résultats des nombreuses études expérimentales réalisées sur cellules endothéliales que nous avons essayé d'évoquer dans cette thèse et qui ont permis de mettre en évidence le rôle du stress mécanique sur la barrière endothéliale et sa régulation.

Pour répondre aux nombreuses questions posées par le contrôle de la perméabilité endothéliale pulmonaire, nous avons développé un modèle de cellules endothéliales dans le quel est imposé une contrainte cyclique durable ciblant spécifiquement le cytosquelette. Nous avons choisi d'imposer le stress cellulaire au moyen de billes ferromagnétiques ce qui à l'évidence diffère du stress imposé par l'écoulement laminaire du sang dans les capillaires mais présente toutefois quelques analogies puisque l'écoulement et le couple magnétique génèrent chacun du cisaillement, la différence résidant dans la direction de ces cisaillement qui sont tridimensionnels avec la bille et unidirectionnels en écoulement laminaire. Ce modèle nous a permis de répondre à notre premier objectif qui était de modifier le niveau

Conclusion générale et perspectives

de tension intracellulaire, ce que nous avons observé par des mesures mécaniques permettant d'évaluer les structures cellulaires profondes (la MTC) et ce qui a été confirmé par l'imagerie de la structure d'actine.

Le deuxième objectif concernait la caractérisation des retentissements structuraux, cellulaires et moléculaires associés à ces modifications de la tension intracellulaire qui nous a permis de mettre en évidence un mécanisme de redistribution spatiale des sites d'adhésion, au bénéfice de l'adhésion matricielle et au détriment des jonctions cellule-cellule. Un tel mécanisme suppose une interaction croisée entre les adhésions matricielles et les adhésions intercellulaires qui comme le suggère nos résultats serait médiée par le cytosquelette et notamment sa tension interne modifiée par le stress mécanique.

L'intérêt fonctionnel de notre modèle apparaît dans sa capacité à reproduire les changements de perméabilité induits par le stress mécanique, ce qui suggère qu'il pourrait être utilisé pour tester des médicaments susceptibles de limiter l'augmentation de perméabilité en évitant par exemple l'augmentation de la tension interne induite par le stress. On pourrait aussi imaginer tester avec ce modèle des cellules endothéliales primaires microvasculaires pulmonaires voire épithéliales exposées à des lavages bronchoalvéolaires.

Concernant les mécanismes gouvernant les changements de perméabilité induits par le stress, l'essentiel de nos résultats tient dans la confirmation des hypothèses les plus avancées sur la régulation de la barrière endothéliale à savoir que son adaptation permanente au stress mécanique est rendue possible grâce aux mécanismes de remodelage. Ce remodelage prend des formes différentes: augmentation de la tension interne par l'activation probable des moteurs acto-myosine, redistribution et mobilisation du stock d'intégrines disponibles pour renforcer les liaisons cellule-matrice, disparition partielle et redistribution avec affaiblissement des cadhérines au détriment de l'intégrité et de la barrière endothéliale, polarité et hétérogénéité spatiale caractérisées par les phénomènes de redistribution spatiale des molécules d'adhésion.

Pour conclure cette étude, nous pensons que le concept d'une réponse au stress médiée par une modification de la tension interne du cytosquelette est généralisable au delà de notre propre modèle de cellules endothéliales stressées mécaniquement. D'autres fonctions comme la migration ou la division cellulaires utilisent peut-être des processus comparables dans lesquels le changement de niveau de la tension interne permet de contrôler ces fonctions.

Publications

VII. Publications

Bio-Medical Materials and Engineering 22 (2012) 163–170
 DOI 10.3233/BME-2012-0703
 IOS Press

163

Force control of endothelium permeability in mechanically stressed pulmonary micro-vascular endothelial cells

Bin Wang^{a,b,c,d,*}, Adam Caluch^{a,b,c,*}, Redouane Fodil^{a,b,c}, Sophie Féréol^{a,b,c},
 Patricia Zadigue^{a,b,c}, Gabriel Pelle^{a,b,c,e}, Bruno Louis^{a,b,c} and Daniel Isabey^{a,b,c,**}

^a *Inserm, U955, E13, Biomécanique Cellulaire et Respiratoire, Créteil, France*

^b *CNRS, ERL 7240, Créteil, France*

^c *Université Paris Est, Faculté de Médecine, Créteil, France*

^d *Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, China*

^e *AP-HP, Hôpital Henri Mondor–Albert Chenevier, Physiologie, Créteil, France*

Abstract. Mechanical factors play a key role in the pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) and Ventilator-Induced Lung Injury (VILI) as contributing to alveolo-capillary barrier dysfunction. This study aims at elucidating the role of the cytoskeleton (CSK) and cell–matrix adhesion system in the stressed endothelium and more precisely in the loss of integrity of the endothelial barrier. We purposely develop a cellular model made of a monolayer of confluent Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells (HPMVECs) whose cytoskeleton (CSK) is directly exposed to sustained cyclic mechanical stress for 1 and 2 h. We used RGD-coated ferromagnetic beads and measured permeability before and after stress application. We find that endothelial permeability increases in the stressed endothelium, hence reflecting a loss of integrity. Structural and mechanical results suggest that this endothelial barrier alteration would be due to physically-founded discrepancies in latero-basal reinforcement of adhesion sites in response to the global increase in CSK stiffness or centripetal intracellular forces. Basal reinforcement of adhesion is presently evidenced by the marked redistribution of $\alpha_v\beta_3$ integrin with cluster formation in the stressed endothelium.

Keywords: Integrins, cytoskeleton, endothelial cells, permeability, mechanics

1. Introduction

Mechanical ventilation is required for treatment of patients with Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) but it is susceptible to exacerbate inflammation and lung injury [1–3]. This is basically due to mechanical factors which produce over distensions resulting in ventilator-induced lung injury (VILI) [4,5]. It has been shown that the use of small tidal volumes in mechanically ventilated patients decreases mortality presumably by reducing over-distensions at all scales, from the organ to the cellular levels [6]. In the ARDS patients, inflammation of the pulmonary circulation causes increase (i) in vascular permeability secondary to the release of pro-inflammatory cytokines (e.g., IL8), (ii) alteration of the

*The two first authors have contributed equally.

** Address for correspondence: Daniel Isabey, Inserm UMR955, IMRB, Cell and Respiratory Biomechanics Department (E13), 8, rue du Général Sarrail, Créteil 94010, France. Tel.: +33 149 81 37 00; Fax: +33 148 98 17 77; E-mail: daniel.isabey@inserm.fr.

alveolo-capillary barrier, (iii) leukocyte recruitment and platelet segregation [7]. Noteworthy, the injured alveolus typical to ARDS is characterized by a marked alteration of the endothelial cell function, e.g., the permeability, which definitely implies both remodeling of the cytoskeleton (CSK) structure and a change in adhesion system required for leukocyte adhesion [8]. Cellular and tissular lesions dramatically modify the tiny force equilibrium responsible for endothelium integrity. As earlier proposed by Dudek and Garcia [9], endothelium integrity critically depends on the balance between competing forces, namely (i) contractile forces responsible for centripetal intracellular tension and (ii) adhesion forces which control the preservation of both cell–cell and cell–matrix junctions. These two types of forces are intimately linked to the CSK and notably to the actin CSK structure which regulates cell shape and intracellular tension [10,11] and transduces signals within and between endothelial cells [12,13]. Although the role of cell–cell junctions in the cell barrier integrity has been largely studied [14–17], the role the cell–matrix junctions in the alteration of integrity of the stressed endothelium has been more rarely considered [18].

We presently propose a cellular model in which a confluent monolayer of human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMVECs) is exposed to sustained cyclic mechanical stress directly addressed to the CSK. We measure permeability after 1 and 2 h of stress application. In this model, we also characterize the role of cyclic stress on the remodeling of actin CSK as well as on the redistribution of a key transmembrane adhesion molecule for adhesion site activation, i.e., the $\alpha_v\beta_3$ integrins. Upon chemical activation, $\alpha_v\beta_3$ integrins form a receptor-ligand complex acting as a progenitor of focal complex during cell migration [19,20]. Moreover, $\alpha_v\beta_3$ integrin is a very important molecular link in regulating endothelial cells permeability during chemical stresses [21]. A key remaining question is the role of mechanical stress in this $\alpha_v\beta_3$ regulation.

Consistently with earlier works [22], present results show that rigidity of extracellular matrix favors strengthening of integrin-cytoskeleton linkages evidenced by the marked clustering of $\alpha_v\beta_3$ integrins in the stressed endothelium. Moreover, consistently with our previously published theoretical approach on the regulation of adhesion sites by both environmental reaction forces and intracellular forces [23], we find that the higher rigidity of the matrix compared to the softer adjacent endothelial cells, could be responsible for latero-basal differences in environmental forces, and therefore, latero-basal heterogeneities in adhesion site reinforcement. In our cellular model, enhanced traction forces would result in reinforcing cell–matrix junctions more than cell–cell junctions, consistently with the reported increase in permeability of the stressed endothelium.

2. Methods

The cellular model is made of primary HPMVEC grown at confluence in specific medium. Cyclic stretch is specifically directed toward the actin CSK by means of ferromagnetic beads (4.5 μm in diameter), coated with a synthetic peptide RGD which is recognized by transmembrane integrin receptors. This method has been efficiently used to study the long term cell responses (several hours) to CSK-specific cyclic homogeneous loading over a whole cell culture [24] as well as the short term cell response (less than a second) to a local stress imposed via integrins [25]. In present experiments, the HPMVEC culture is placed in a magnetic twisting stimulator providing one or two hours of mechanical stimulation in stable controlled conditions since the system is located inside an incubator. It allows generating a sustained mechanical stretch induced by a cyclic stress signal of fixed amplitude and frequency (presently of the order of 10 Pa and 3 Hz, respectively) which is exactly the same over the culture. Barrier function was detected with FITC-dextran flux in transwell model using a molecule of low molecular weight (~ 3 kDa).

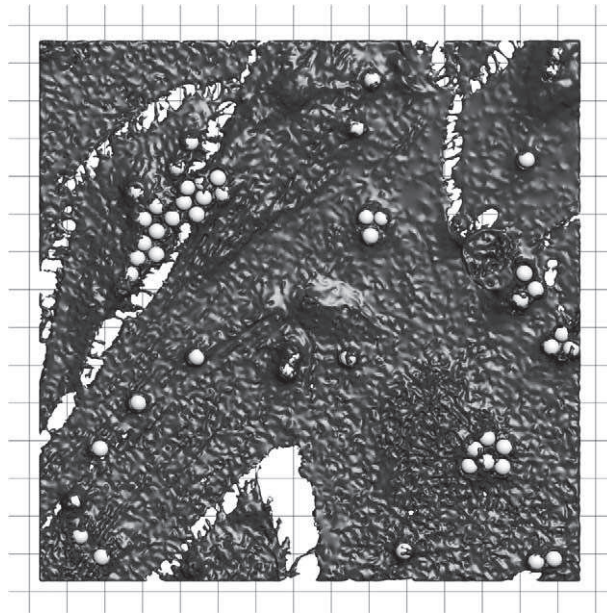


Fig. 1. Actin structure (dark grey) of human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMVECs) forming monolayer, reconstructed in 3D from z-stack of confocal images of cells stained for actin filaments by rhodamine-phalloidin (view from the top). Ferromagnetic beads (diameter $\approx 4.5 \mu\text{m}$, light grey) appear largely immersed in the actin CSK in this type of primary cells. Beads are used to exert a mechanical stimulation specifically addressed to the cytoskeleton (CSK) through RGD-integrin binding. Each square side is $10 \mu\text{m}$.

The interest of using a low molecular weight molecule is to take into account, in the cellular model, the semi-permeable property of the endothelial barrier [17,26]. Actin filaments and $\alpha_v\beta_3$ integrins were stained by immunofluorescence, observed by confocal microscope, and compared for different conditions of stress tested namely one and two hours. In some experiments, HPMVECs were pretreated by myosin light chain kinase inhibitor (ML9) (at $50 \mu\text{M}$) before exposure to mechanical stimulation. Intracellular tension was quantified from the change in cellular stiffness measured by Magnetic Twisting Cytometry using the same ferromagnetic beads [12]. The cellular mechanical response was measured with a compartmental analysis allowing to separate the cortical and deep CSK responses (in terms of rigidity and time constant) from the recoverable part of the bead rotation angle [27]. Figure 1 illustrates the method used to mechanically stimulate the cells and also to measure mechanical properties of adherent endothelial cells: several ferromagnetic beads (in light grey) functionalized by RGD are almost entirely embedded in the actin CSK structure (in dark grey). We have already shown that the degree of bead immersion in the cytoplasm actually depends on the cell type [27,28]. In primary HPMVEC, the degree of bead immersion remains important, i.e., between 90° and 180° for the half angle of bead immersion as shown in Fig. 1. Because the beads are magnetized, application of a spatially uniform but time-controlled magnetic field generates a magnetic torque resulting in three-dimensional cellular stress and deformation [29].

3. Results and discussion

Figure 2 shows that cyclic stress significantly enhances dextran filtration above the control value, after one and two hours of stress application on the CSK of endothelial cells. This suggests that endothelial

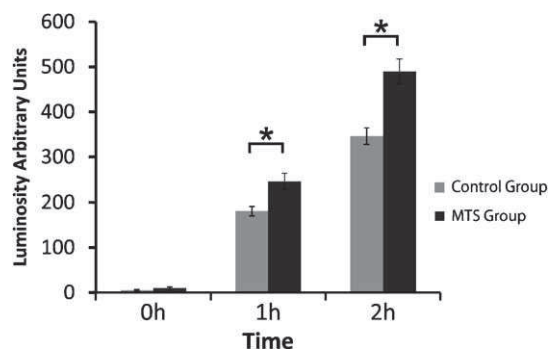


Fig. 2. Filtration of the tracer FITC-dextran of low molecular weight across the confluent pulmonary microvascular endothelial cell monolayer (in arbitrary units of fluorescence (AU)). MTS group corresponds to mechanically stressed cells during 1 or 2 h. This group is compared to the control group in which cells embedding the same ferromagnetic beads (see Fig. 1) are not mechanically stressed. Mechanical stress increases the permeability of HPMVECs monolayer after one and two hours compared to control conditions. Filtration measured in arbitrary fluorescence units (AU) may be seen as an index of permeability estimated during physiological (control) and pathological (mechanical stress) conditions. Each point represents the means \pm SEM of 28 measurements for each group. * $P < 0.05$.

permeability may be increased above physiological values in mechanically stressed endothelium. Comparison of Fig. 3D and G with A shows that a wide number of thick and short actin stress fibers are generated in between the beads and in between the beads and adhesion sites in the stressed endothelium. Note that the sole presence of adherent beads without the effect of mechanical stress is not sufficient to generate such a CSK remodeling (note that Fig. 3A also corresponds to Fig. 1 which exhibits the beads). Comparing Fig. 3E and H to B shows that, in parallel to the founded actin reinforcement, $\alpha_v\beta_3$ integrin is redistributed through clusters of $\alpha_v\beta_3$ integrins whose number increases in a time-dependent fashion. These clusters are formed near the basal cell face. These results suggest that direct mechanical stimulation of the CSK by ferromagnetic beads activates basal adhesion sites and most likely reinforce them in a stimulation-dependent manner. Merge images of actin fibers and $\alpha_v\beta_3$ integrin shown in Fig. 3C, F and I show that extremities of actin filaments and clusters of $\alpha_v\beta_3$ integrins are often close but do not really overlap, most likely because some additional molecules such as talin are used as molecular connectors [19]. Figure 4 shows that stiffness of the deep CSK compartment is significantly increased (by a factor of about 2.5) while stiffness of the cortical (not shown) is almost unchanged. Incidentally, time constant of the deep CSK is unchanged in stressed endothelium suggesting a parallel increase in viscous modulus. Treatment by low doses of myosin light chain kinase inhibitor (ML9) – a blocker of acto-myosin motors – results in a non significant decrease in the deep CSK rigidity while cortical rigidity is not significantly affected by stress application. The $\alpha_v\beta_3$ integrin clustering occurs through an increase in the number of adhesion plaques correlatively with the duration of mechanical stimulation, suggesting that direct CSK mechanical stimulation induces time-dependent focal adhesion reinforcement near the basal cell face (see Fig. 3E and H). Clustering of $\alpha_v\beta_3$ integrin at locations where actin stress fibers converge strongly suggest integrin activation with associated conformational change of integrins [19]. Present results reveal that mechanical stress is a powerful activator of this endothelial remodeling process. In addition to the diminution of clustering of $\alpha_v\beta_3$ integrins, treatment by ML9 also accompanies a reduction in stress fiber formation (data not shown) and a consistent limitation of the stress-induced increase in deep CSK stiffness (see Fig. 4). The ML9 results confirm the role of acto-myosin coupling in the cellular response to mechanical stress and therefore in the control of endothelial barrier integrity and cellular adhesion already suggested by Dudek et al. [9].

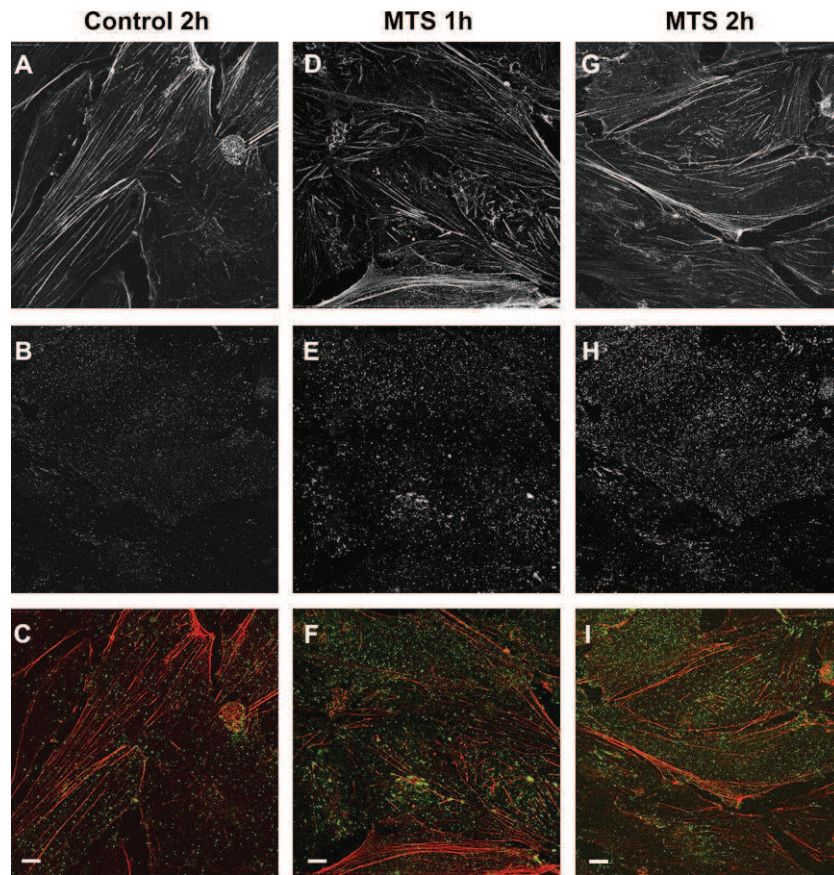


Fig. 3. The effect of mechanical stress after one (D, E, F) and two hours (G, H, I) of stress is shown by comparison to control conditions (A, B, C) on actin structure (A, D, G) and $\alpha_v\beta_3$ -integrin redistribution (B, E, H) as well as on the merge images (C, F, I). Primary HPMVEC were grown to confluence on glass coverslips coated with ECM gel and then mechanically stressed by ferromagnetic beads. Confocal images corresponding to optical cross-sections taken at 0.35 μm intervals demonstrate higher number of thick and short stress fibers and the formation of $\alpha_v\beta_3$ clusters near the basal face in response to mechanical stress. Horizontal white bars represent the common spatial scale for all images: 10 μm .

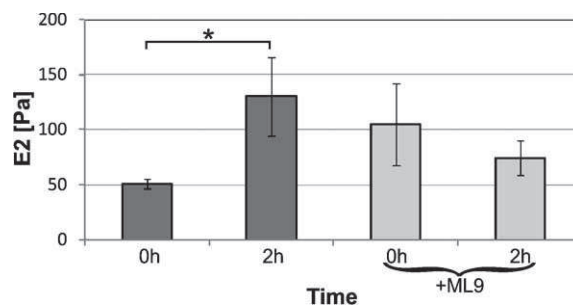


Fig. 4. The HPMVEC rigidity for the deep CSK component (E2 in Pascals) is measured by Magnetic Bead Cytometry using the same RGD-coated beads and the recoverable component of bead rotation. Results are shown for two-hour mechanical stress and compared to control. Treatment with low dose of ML9 – a blocker of actomyosin motors – tends to suppress the effect of mechanical stress on the endothelium. * $P < 0.05$.

Noteworthy, present results also reveal that the increase in endothelial permeability could be due to discrepancies in latero-basal reinforcement in response to external mechanical stress and an associated increase in CSK stiffness and centripetal intracellular forces. Such a mechanism can be understood based on our recent theoretical considerations on the force regulation of adhesion sites by extra and intracellular properties [23]. In response to higher centripetal forces, all adhesion sites would be exposed to higher traction forces. However, since rigidity of adjacent endothelial cells is still smaller than the rigidity of the matrix (even though partially increased by the cellular response to external stress), one can expect a stronger reinforcement for basal adhesion sites while lateral cell–cell adhesion site reinforcement would be less. We call this concept: differential latero-basal reinforcement of cell adhesion in response to mechanical stress. Weaker reinforcement of the lateral cell–cell junctions could advantageously explain why filtration is found to increase in the stressed endothelium.

The physiopathological relevance of the present results is explained below. The endothelial cell (EC) lining of the pulmonary vasculature forms a semi-permeable barrier between the blood and the interstitium of the lung whose filtration properties [17,26] are presently represented by control conditions in Fig. 2 (zero stress added). Disruption of this barrier occurs during mechanical ventilation and/or inflammatory state and results in higher movement of fluid and macromolecules into the interstitium and pulmonary air spaces. Present model shows that mechanical stimulation by itself – presently induced by twisted RGD-coated microbeads – is susceptible to increase the endothelial permeability (Fig. 2). A potential mechanism is then proposed to explain the underlying mechanism: because of the competition between contractile and adhesive forces which develop in the context of latero-basal polarity in adhesion site reinforcement, adhesive cell–cell forces fail to counterbalance the increase in contractile forces and let the endothelial permeability increase. By contrast, adhesive cell–matrix forces are strongly reinforced as presently suggested by the formation of clusters of $\alpha_v\beta_3$ integrins near the basal cell face of stressed endothelium.

To which extent the endothelial barrier exhibits *in vivo* such a rigidity-dependent latero-basal polarity in response to an increase in intracellular stress is beyond the scope of the present paper. What can be said is that any heterogeneity in mechanical properties between cells and extracellular matrix would result in latero-basal differential reinforcement with a possibility of losing endothelial integrity. Note also that the multiple forms of mechanical stresses exerted on lung cells are susceptible to generate heterogeneities especially in diseased lungs. For instance, the “shear” stress is reinforced at the alveolar level when edema fluid floods the airspace. Moreover, “normal” stresses which oppose elastic recoil during lung inflation, lead to tension in the alveolar septa and subsequent cell deformation. The latter could be considerably increased during acute lung injury because elastic recoil is increased by the disease [30]. Moreover, considering the marked heterogeneities in mechanical properties of the constituents of the deep lung structure (e.g., collagen/elastin fibers; different cell types . . .) [31], there are some reasons to consider that structural/mechanical heterogeneities, reinforced in pathophysiological conditions as suggested above, lead to an unequal reinforcement at cellular junctions in response to the increase in intracellular tension. Beyond, additional work is needed to assess the real amount of this differential reinforcement in the pathological lungs.

4. Conclusion

Taken together, present results reveal a critical role of mechanical forces in the regulation of pulmonary endothelial cell permeability. They strongly suggest considering, as a potential mechanism, the

heterogeneities in adhesion site activation between basal face (i.e., through $\alpha_v\beta_3$ integrin clustering) and lateral faces (i.e., through cell–cell junctions). These heterogeneities would occur in response to the global increase in intracellular centripetal forces induced by acto-myosin contraction while being potentialized by mechanical or chemical activation. One possible therapeutic approach would be to examine the effect of an antagonist of $\alpha_v\beta_3$ integrin, considering that limiting cell–matrix reinforcement might positively affect the strength of cell–cell junctions and farther preserve the integrity of the pulmonary microvascular endothelium. However this requires further confirmation studies.

Acknowledgement

The authors gratefully thank Alexis Soummer for his contribution to preliminary setting of the cellular model.

References

- [1] D. Dreyfuss and G. Saumon, Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157** (1998), 294–323.
- [2] B. Han, M. Lodyga and M. Liu, Ventilator-induced lung injury: role of protein–protein interaction in mechanosensation, *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2** (2005), 181–187.
- [3] R.D. Hubmayr, Ventilator-induced lung injury without biotrauma?, *J. Appl. Physiol.* **99** (2005), 384–385.
- [4] J.D. Ricard, D. Dreyfuss and G. Saumon, Ventilator-induced lung injury, *Eur. Respir. J. Suppl.* **42** (2003), 2s–9s.
- [5] V.M. Ranieri, P.M. Suter, C. Tortorella, R. De Tullio, J.M. Dayer, A. Brienza, F. Bruno and A.S. Slutsky, Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial, *JAMA* **282** (1999), 54–61.
- [6] The Acute Respiratory Distress Syndrome Network, Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome, *N. Engl. J. Med.* **342** (2000), 1301–1308.
- [7] L.B. Ware and M.A. Matthay, The acute respiratory distress syndrome, *N. Engl. J. Med.* **342** (2000), 1334–1349.
- [8] M.H. Wu, Endothelial focal adhesions and barrier function, *J. Physiol.* **569** (2005), 359–366.
- [9] S.M. Dudek and J.G. Garcia, Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability, *J. Appl. Physiol.* **91** (2001), 1487–1500.
- [10] N. Wang, I.M. Tolic-Norrelykke, J. Chen, S.M. Mijailovich, J.P. Butler, J.J. Fredberg and D. Stamenovic, Cell prestress. I. Stiffness and prestress are closely associated in adherent contractile cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282** (2002), C606–C616.
- [11] S. Féréol, R. Fodil, G. Pelle, B. Louis and D. Isabey, Cell mechanics of alveolar epithelial cells (AECs) and macrophages (AMs), *Respir. Physiol. Neurobiol.* **163** (2008), 3–16.
- [12] N. Wang, J.P. Butler and D.E. Ingber, Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton, *Science* **260** (1993), 1124–1127.
- [13] D.E. Ingber, Mechanosensation through integrins: cells act locally but think globally, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** (2003), 1472–1474.
- [14] J.B. Adkison, G.T. Miller, D.S. Weber, T. Miyahara, S.T. Ballard, J.R. Frost and J.C. Parker, Differential responses of pulmonary endothelial phenotypes to cyclical stretch, *Microvasc. Res.* **71** (2006), 175–184.
- [15] E. Dejana, G. Bazzoni and M.G. Lampugnani, Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue?, *Exp. Cell Res.* **252** (1999), 13–19.
- [16] N. Mochizuki, Vascular integrity mediated by vascular endothelial cadherin and regulated by sphingosine 1-phosphate and angiopoietin-1, *Circ. J.* **73** (2009), 2183–2191.
- [17] E. Vandenbroucke, D. Mehta, R. Minshall and A.B. Malik, Regulation of endothelial junctional permeability, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1123** (2008), 134–145.
- [18] D. Mehta, C. Tirupathi, R. Sandoval, R.D. Minshall, M. Holinstat and A.B. Malik, Modulatory role of focal adhesion kinase in regulating human pulmonary arterial endothelial barrier function, *J. Physiol.* **539** (2002), 779–789.
- [19] C. Cluzel, F. Saltel, J. Lussi, F. Paulhe, B.A. Imhof and B. Wehrle-Haller, The mechanisms and dynamics of $\alpha_v\beta_3$ integrin clustering in living cells, *J. Cell. Biol.* **171** (2005), 383–392.
- [20] J. Takagi, B.M. Petre, T. Walz and T.A. Springer, Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling, *Cell* **110** (2002), 599–511.

- [21] M. Guo, D. Daines, J. Tang, Q. Shen, R.M. Perrin, Y. Takada, S.Y. Yuan and M.H. Wu, Fibrinogen-gamma C-terminal fragments induce endothelial barrier dysfunction and microvascular leak via integrin-mediated and RhoA-dependent mechanism, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29** (2009), 394–400.
- [22] D. Choquet, D.P. Felsenfeld and M.P. Sheetz, Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin–cytoskeleton linkages, *Cell* **88** (1997), 39–48.
- [23] S. Féréol, R. Fodil, V.M. Laurent, M. Balland, B. Louis, G. Pelle, S. Hénon, E. Planus and D. Isabey, Prestress and adhesion site dynamics control cell sensitivity to extracellular stiffness, *Biophys. J.* **96** (2009), 2009–2022.
- [24] J. Chen, B. Fabry, E.L. Schiffrin and N. Wang, Twisting integrin receptors increases endothelin-1 gene expression in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280** (2001), C1475–C1484.
- [25] S. Na, O. Collin, F. Chowdhury, B. Tay, M. Ouyang, Y. Wang and N. Wang, Rapid signal transduction in living cells is a unique feature of mechanotransduction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105** (2008), 6626–6631.
- [26] Q. Shen, M.H. Wu and S.Y. Yuan, Endothelial contractile cytoskeleton and microvascular permeability, *Cell Health Cytoskelet.* **2009** (2009), 43–50.
- [27] V.M. Laurent, R. Fodil, P. Cañadas, S. Féréol, B. Louis, E. Planus and D. Isabey, Partitioning of cortical and deep cytoskeleton responses from transient magnetic bead twisting, *Ann. Biomed. Eng.* **31** (2003), 1263–1278.
- [28] S. Féréol, R. Fodil, B. Labat, S. Galiacy, V.M. Laurent, B. Louis, D. Isabey and E. Planus, Sensitivity of alveolar macrophages to substrate mechanical and adhesive properties, *Cell Motil. Cytoskeleton* **63** (2006), 321–340.
- [29] J. Ohayon, P. Tracqui, R. Fodil, S. Féréol, V.M. Laurent, E. Planus and D. Isabey, 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** (2004), 685–698.
- [30] P.T. Schumacker, Straining to understand mechanotransduction in the lung, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **282** (2002), L881–L882.
- [31] B. Suki, S. Ito, D. Stamenovic, K.R. Lutchen and E.P. Ingenito, Biomechanics of the lung parenchyma: critical roles of collagen and mechanical forces, *J. Appl. Physiol.* **98** (2005), 1892–1899.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Biomechanics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jbiomech
www.JBiomech.com

Force distribution on multiple bonds controls the kinetics of adhesion in stretched cells

D. Isabey^{a,b,c,*}, S. Féréol^{a,b,c}, A. Caluch^{a,b,c}, R. Fodil^{a,b,c}, B. Louis^{a,b,c}, G. Pelle^{a,b,c,d}^a Inserm UMR955, Mondor Institute of Biomedical Research, Cell and Respiratory Biomechanics Laboratory, Créteil 94010, France^b CNRS URL 7240, Cell and Respiratory Biomechanics Laboratory, Créteil 94010, France^c Université Paris Est Créteil, Faculté de Médecine, Créteil 94010, France^d AP-HP, Hôpital Henri Mondor, Service de Physiologie-Explorations Fonctionnelles, Créteil 94010, France

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 26 October 2012

Keywords:

Parallel bonds

Zipper bonds

Lifetime

Dissociation rate

Bond strength

ABSTRACT

We show herein how mechanical forces at macro or micro scales may affect the biological response at the nanoscale. The reason resides in the intimate link between chemistry and mechanics at the molecular level. These interactions occur under dynamic conditions such as the shear stress induced by flowing blood or the intracellular tension. Thus, resisting removal by mechanical forces, e.g., shear stresses, is a general property of cells provided by cellular adhesion. Using classical models issued from theoretical physics, we review the force regulation phenomena of the single bond. However, to understand the force regulation of cellular adhesion sites, we need to consider the collective behavior of receptor–ligand bonds. We discuss the applicability of single bond theories to describe collective bond behavior. Depending on bond configuration, e.g., presently “parallel” and “zipper”, the number of bonds and dissociation forces variably affect the kinetics of multiple bonds. We reveal a marked efficiency of the collective organization to stabilize multiple bonds by sharply increasing bond lifetime compared to single bond. These theoretical predictions are then compared to experimental results of the literature concerning the kinetic parameters of bonds measured by atomic force microscopy and by shear flow. These comparisons reveal that the force-control of bonds strongly depends on whether the force distribution on multiple bonds is homogeneous, e.g., in AFM experiments, or heterogeneous, e.g., in shear flow experiments. This reinforces the need of calculating the stress/strain fields exerted on living tissues or cells at various scales and certainly down to the molecular scale.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

It is widely accepted that mechanical forces control normal biological processes and their pathological alterations through cell–environment interactions (Discher et al., 2005). These interactions occur under dynamic conditions, e.g., the flowing blood; the internal tension, through adhesion sites which are protein assemblies through clusters which link the cytoskeleton to the extracellular environment (Geiger and Bershadsky, 2001). In particular, receptor–ligand bond anchoring cells in the presence of flowing liquids are stretched by tensile mechanical forces that balance the drag force on the bound cell. Therefore, stabilization under force and resisting removal to shear stresses – and to intra/extracellular stretching forces – are fundamental properties of cellular adhesion. Moreover, weakening or strengthening

adhesion by mechanical force remains an opened question if one wants to understand flow-controlled key cellular interactions such as: macrophage–epithelium, leukocyte–endothelium or bacteria–host cell (Thomas, 2008; Thomas et al., 2008).

A fundamental aspect to consider is the stochastic nature of molecular adhesion and the subsequent bond detachment under force which are extensively described in the literature (Bongrand and Golstein, 1983; Evans, 1998). A less considered aspect deals with the complexity of adhesion structures since cellular adhesion involves not only one but several bonds, which stabilize and resist mechanical forces through different strategies of association and reinforcement (Evans, 2001; Evans and Ritchie, 1994; Leckband et al., 1992). These strategies are most likely influenced by forces generated through the intracellular structure or transiting through the extracellular environment (Féréol et al., 2009) and a number of biochemical and biomechanical processes implicating many signaling pathways (Vogel and Sheetz, 2009). From initial adhesion to focal complex and beyond the mature focal adhesion, the adhesion site configuration changes and the maximal force supported by adhesion sites varies by six orders of

* Correspondence to: Inserm UMR 955, Equipe Biomécanique Cellulaire et Respiratoire, Faculté de Médecine, 8, rue du Général Sarrail, 94010 Créteil Cedex, France. Tel.: +33 1 49 81 37 00; fax: +33 1 48 98 17 77.

E-mail address: daniel.isabey@inserm.fr (D. Isabey).

magnitude (pN-μN) (Bruinsma, 2005). Although these adhesion sites are made of similar weak bond units – i.e., a non covalent molecular link given to support forces up to the pN – their collective organization allows them supporting a huge range of stress (Geiger and Bershadsky, 2001). The structural changes associated to stabilization and strengthening include: (i) increase in cell–substrate contact area (spreading) (Capo et al., 1981), (ii) recruitment of receptors to anchoring sites including their lateral association (clustering) (Andre et al., 1990; Bell et al., 1984; Cluzel et al., 2005), (iii) interaction with cytoskeleton elements that lead to enhanced force distribution among bound receptors via local cytoskeleton stiffening (focal adhesion assembly) (Pasternak and Elson, 1985). These mechanisms of adhesion strengthening are supported by numerous observations from various cellular systems (Balaban et al., 2001; Choquet et al., 1997; Galbraith et al., 2002; Giannone et al., 2003; Zhu et al., 2008). Trying to understand these mechanisms of adhesion stabilization or reinforcement, and how they are regulated by force, remains challenging questions which require new theoretical knowledge and pertinent analysis of data.

Recognizing the need to expose actions at the submicroscopic level, many research groups have employed ultrasensitive force techniques to probe extremely small regions of adhesive contact between surfaces functionalized by biological molecules (Evans and Ritchie, 1994; Leckband et al., 1992). Most direct measurements of single bond strength have been performed with three types of ultrasensitive probes: the Atomic Force Microscope (AFM) where force is sensed by deflection of a thin silicon nitride cantilever (Binnig et al., 1986), the Biomembrane Force Probe (BFP) where force is sensed by a glass microsphere glued to the pole of a micropipette-pressurized membrane capsule (Evans et al., 1995; Simson et al., 1998); and the laser optical tweezers where force is sensed by displacement of a microsphere trapped in a narrowly focused beam of laser light (Ashkin, 1992; Ashkin et al., 1990). Common limitations associated with these techniques deal with thermal fluctuations, hydrodynamic interactions, and noteworthy the difficulty of controlling the number and the configuration of bonds implicated.

Since most of adhesive interactions are initiated and then sustained under flow conditions (in priority blood but not only), cell resistance to removing by fluid shear stress using a “laminar flow chamber” has become a relevant method to measure the kinetics of receptor–ligand adhesion (Bongrand and Golstein, 1983; Pierres et al., 1996a, 1996b). Basically, particles or circulating cells covered by receptors are flowing near a surface coated by a ligand and arrested by the formation of limited number of adhesion bonds, e.g., one per cell in many experiments, as far as hydrodynamic forces do not exceed a few pNs (Kaplanski et al., 1993; Pierres et al., 1996a; Smith et al., 1999). The relationship between the number of arrested particles and the duration of their arrest allows (i) determining detachment curves whose initial slope provides the dissociation rate (Chang and Hammer, 1999; Smith et al., 1999; Tissot et al., 1992) and moreover (ii) studying the mechanisms of flow-enhanced cell adhesion (Zhu et al., 2008).

The present paper concerns some under considered aspects of the regulation by mechanical force of collective bond organization implicated in the structuration of different adhesion sites. We purposely apply theories of bond dissociation – issued from stochastic approaches – to different types of bond configurations, e.g., parallel or zipper bonds, on which dissociation forces are exerted. The experimental data purposely used are issued from two different methods: the atomic force microscopy (AFM) and the laminar (viscous) shear flow. It appears that force-control of multiple bonds strongly depends on whether the force distribution on multiple bonds is homogeneous, such as during certain

AFM experiments, or heterogeneous, such as during shear flow experiments. Thus, to understand the cell adhesion response to stretch, the knowledge of force distribution is needed down to the smallest scale possible. This reinforces the need of calculating the stress/strain fields exerted on living tissues or cells at various scales and certainly down to the molecular scale.

2. Methods

2.1. Kinetic theory of bond dissociation

2.1.1. Single bond

Weak noncovalent interactions between large molecules mediate many of life's functions in cells (Evans, 2001). The strength of interaction is the level of force to disrupt a bond on a particular time scale, knowing that these molecular interactions have limited lifetimes and thus fail under any level of force if pulled on for modest period of time (Evans, 1998). For instance, an isolated bond has no strength on times scales longer than its natural lifetime for spontaneous dissociation (entropy-driven): t_{off}^0 . On the other hand, when a bond is pulled apart faster than needed for diffusive relaxation, it is classically thought to resist to detachment by a force given by the maximum gradient, $f_{bond} \sim (\partial E(x)/\partial x)_{max}$, where is the interaction potential or energy contour defined along the distance of separation. Thus, from the slow limit set by spontaneous transition, t_{off}^0 , to the ultrafast limit for diffusive relaxation, t_D , ($\approx 10^{-10}$ – 10^{-9} s, i.e., the Brownian time), strength of non covalent bonds is governed by thermally activated kinetics under external force and depends on how force is applied over time. To describe bond kinetics, the simplest model of chemical binding is a single-sharp barrier model which takes into account the major impact of force on thermally activated kinetics that is an exponential amplification of the forward rate for dissociation characterized by a small force scale:

$$k_{off}(f) \sim \exp(-E_b(f)/k_B T) \quad (1)$$

$$E_b(f) = E_b^0 - f x_\beta \quad (2)$$

In this model, the energy barrier of a single bond is characterized in its simplest form by its height at zero force, E_b^0 , and the distance x_β in the direction of force (in nanometer or a fraction of nm) at which this energy barrier is located. The impact of a force depends on how the energy landscape is deformed by the force (given by Eq. (2)). For sharp energy barriers, the shape and location of transition state are insensitive to force and barrier is lowered by force in proportion to the thermally averaged projection of the barrier x_β (Eqs. (1) and (2)). Thus, thermal activation sets a small force scale, $k_B T/x_\beta$ given by:

$$f_\beta = \frac{k_B T}{x_\beta} \quad (3)$$

f_β (unit: picoNewton, pN) provides a reference force scale that remains rather small since the thermal energy per molecule is only: $k_B T \approx 4 \text{ pN} \times \text{nm}$, (with $k_B = 1.381 \times 10^{-23} \text{ J/K}$, Boltzman constant in Joule/Kelvin and T absolute room temperature in Kelvin), and $x_\beta \approx 0.1$ – 1 nm , (e.g., $f_\beta \approx 13 \text{ pN}$ for integrin-VCAM linkage (Evans and Kinoshita, 2007); $f_\beta \approx 3$ – 9 pN for adhesion between platelets and subendothelial matrix (Arya et al., 2005)). Using this scale, the rate of dissociation increases exponentially with force as proposed in the pioneering work by Bell (1978):

$$k_{off}(f) \sim k_{off}^0 \exp(-f/f_\beta) \quad (4)$$

Eq. (4) provides the dissociation rate of a single bond on which a force f is exerted. It describes a stochastic phenomena analog to the disintegration of radioactive substance. The dissociation rate $k_{off}(f)$ is linked to the probability $P(t)$ that the bond survives by a simple differential equation which provides the expression of $P(t)$:

$$\frac{dP(t)}{P(t)} = -k_{off}(f(t))dt \text{ or equivalently } P(t) = \exp\left[-\int_0^t k_{off}(f(t'))dt'\right] \quad (5)$$

The prefactor of the dissociation rate given by the Bell model (Eq. (4)) corresponds to the zero-force dissociation rate which classically depends on initial barrier height E_b^0 ,

$$k_{off}^0 = \frac{1}{t_D} \exp(-E_b^0/k_B T) \quad (6)$$

k_{off}^0 is the dissociation frequency for spontaneous escape in the absence of force already defined above. Note that due to the exponential dependence shown by Eq. (6), bond lifetime $t_{off}^0 = (k_{off}^0)^{-1}$ is considerably higher than t_D . For instance, an integrin-VCAM bond with an energy barrier of around $20 k_B T$ (Evans and Kinoshita, 2007) has a bond lifetime $t_{off}^0 \sim 1 \text{ s}$. Bond lifetimes would reach a few hours for energy barriers of $30 k_B T$. Due to the enormous gap in time scale between ultrafast Brownian diffusion and characteristic times of laboratory

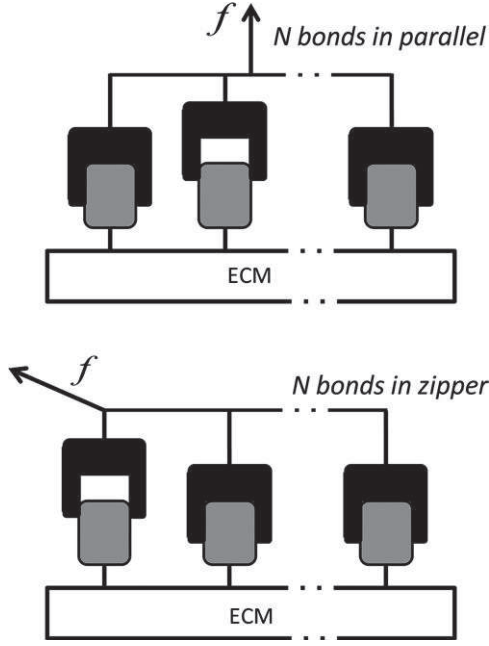


Fig. 1. The two main configurations considered in the present study of the kinetics of multiple bonds are the parallel configuration (upper schema) and the zipper configuration (lower schema). In the parallel configuration, the dissociation force, f , is uniformly distributed amongst identical bonds. After breaking, force is redistributed amongst the remaining bonds. In the zipper configuration, the leading bond experiences the entire force until breaking while it is passed on to the next. In both cases, it is assumed that bonds break at random times from first to last, (i.e., described by a Markovian sequence) because the lack of mechanical linkage between bonds ensures a sufficient independence between bonds.

experiments (between $\sim 10^{-4}$ s-min), applied forces are essentially stationary on the Brownian scale.

2.1.2. Multiple bonds

Three assumptions are made to describe the dynamics of the failure of multiple uncorrelated bonds (Fig. 1):

- (i) The response to mechanical force of an assembly of bonds obeys to the principle issued from the single bond theory which states that the response to force depends on the deformation of energy landscape which thereby resembles a mountainous terrain made of multiple energy barriers (Evans, 2001; Tsukasaki et al., 2007).
- (ii) Associated bonds behave independently (non cooperative bonds). This supposes sufficient linkage for assembly but insufficient linkage to force the bonds to behave identically to reach simultaneous dissociation (cooperative bonds). Indeed, preserving the stochastic nature of a given bond assembly is probably the most pertinent assumption for the weak non covalent interactions that characterize interfacial biological bonds.
- (iii) Different bond configurations (e.g., parallel or zipper) result in different force regulations (Fig. 1). In parallel bonds, the load is redistributed among the surviving bonds (Evans, 2001). In “zipper” bond, only the leading bond experiences the entire loading force (Evans, 2001).

Whatever the predominant bond structure, multiple bonds can break at random times from first to last. Thus the global dissociation rate is a function of the instantaneous force and the distribution of rupture times can merely be described by a first order Markov process with time-dependent rate constants (Evans, 2001; Williams, 2003). Hence, far from thermal equilibrium, it is still possible to generalize the single-dynamic barrier model (Eqs. (1)–(4)) to more complex barriers. This model predicts that the transition rate for escape past a cascade of N sharp barriers is governed by the sum of times $[k_{off}^{n \rightarrow n-1}(f)]^{-1}$ needed to transit individual barriers, starting from the bound state (Evans, 1998, 2001):

$$K_{off}^{N \rightarrow 0}(f) = \frac{1}{\sum_{n=1}^N [k_{off}^{n \rightarrow n-1}(f)]^{-1}} \quad (7)$$

According to this approach, each individual bond acts as the barrier of a more complex bond made of N identical bonds. $k_{off}^{n \rightarrow n-1}(f)$ represents the transition rate

through each barrier of a multivalent bond. It depends on bond configuration as shown below.

Equal sharing of the force between parallel bonds has the effect of multiplying the force scale for these bonds (Williams, 2003). Moreover, at each failure event, there are less and less possibilities of rebinding and therefore, the time scale for event is decreased and the dissociation rate is increased (Evans, 2001):

$$k_{off}^{n \rightarrow n-1}(f) = nk_{off}^0 \exp\left(\frac{f}{nf_\beta}\right) \quad (8)$$

For zipper bonds, the transition rate is constant at given force:

$$k_{off}^{n \rightarrow n-1}(f) = k_{off}^0 \exp\left(\frac{f}{f_\beta}\right) \quad (9)$$

Combining Eqs. (7) and (8) leads to following expressions of the overall dissociation rates across N bonds in parallel:

$$K_{off}^{N \rightarrow 0}(f) = k_{off}^0 \left[\sum_{n=1}^N \frac{1}{n} \exp\left(-\frac{f}{nf_\beta}\right) \right]^{-1} \quad (10)$$

And a pure analytical expression for zipper bonds (combining Eqs. (7) and (9)):

$$K_{off}^{N \rightarrow 0}(f) = k_{off}^0 \frac{1}{N} \exp\left(\frac{f}{f_\beta}\right) \quad (11)$$

The series appearing in Eq. (10) has no analytical expression. However, we presently propose an approximated expression:

$$K_{off}^{N \rightarrow 0}(f) \approx k_{off}^0 \sqrt{2} \left(\frac{f}{Nf_\beta}\right)^{0.5} \exp\left(\frac{f}{Nf_\beta}\right) \quad (12)$$

Eqs. (11) and (12) show that the global dissociation rate (noted with capital letters: $K_{off}(f)$) for multiple bonds working uncooperatively can be written in the form of a generalized Bell’s model:

$$K_{off}(f) \approx K_{off}^0(f) \exp\left(\frac{f}{F_\beta}\right) \quad (13)$$

The global dissociation rate, $K_{off}(f)$, its prefactor, $K_{off}^0(f)$, which may also be a function of f depending on bond organization, and the global force scale, F_β , shows the kinetics of failure of multiple bonds with a necessarily composite energy barrier. Eq. (13) can be linked to an expression of probability $P(t)$ of bond survival having the form of Eq. (5). The new prefactor $K_{off}^0(f)$ characterizes how the width of the overall chemical energy barrier is modified by force (Evans and Ritchie, 1997). The exponential term is a damping factor which takes into account the higher likelihood of reaching the top of the new energy barrier lowered by force in proportion to the global thermal force scale, F_β .

For parallel bonds : $K_{off}^0(f) \approx k_{off}^0 \sqrt{2} \left(\frac{f}{F_\beta}\right)^{0.5}$ and $F_\beta = Nf_\beta$ (14)

For zipper bonds : $K_{off}^0 \approx k_{off}^0 / N$ and $F_\beta = f_\beta$ (15)

Eqs. (14) and (15) which relate collective bond properties to properties of single bond show explicitly how the collective bond organization modifies the kinetic adhesion parameters in the case of parallel and zipper configurations respectively.

In many experimental cases, the force experienced by an attachment is not constant but increases with time. Bonds under slow loading rates have long lifetimes but only withstand small forces, whereas bonds under fast loading have shorter lifetimes and withstand larger forces (Evans, 2001; Evans and Calderwood, 2007; Thomas et al., 2008). Hence, a classical way to explore the chemical energy landscape traversed in force-driven dissociation is to use adjustable force-ramp representing many loading rates from very slow to extremely fast. An alternative method has been recently proposed by Evans and Kinoshita (2007) in which a force-clamp method is applied to a single bond. The force-clamp method can be seen as the easiest method to establish the lifetime profile as a constant dissociation force is applied. Depending on the contours of energy function with the distance of separation (one or more chemical energy barriers), some bonds weaken as force increases (as predicted by Bell model, Eq. (4)) while some other bonds strengthen as force increases (Sokurenko et al., 2008; Thomas, 2008; Thomas et al., 2008).

3. Results and discussion

3.1. Theoretical aspects

Fig. 2 summarizes the theoretical predictions for lifetimes of multiple uncooperative bonds dissociating randomly (Eqs. (10)–(12)). The lifetime of multiple bond ($n=N$) normalized

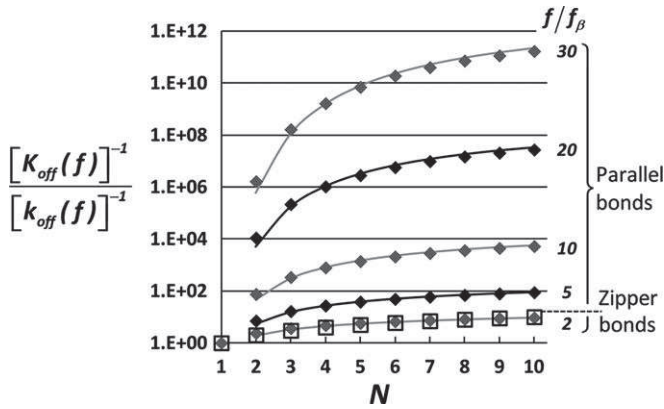


Fig. 2. The kinetics of uncorrelated multiple independent bonds is compared to the kinetics of an individual bond. The quantity $[K_{off}(f)]^{-1} / [k_{off}(f)]^{-1}$ represents the ratio between two lifetimes: the multiple bonds to single bond lifetimes at a given force f . The lifetime ratio of multiple to single bonds is plotted on a logarithmic scale as a function of the bond number N for different values of the separation force given by the ratio f/f_β (presently in the range: 2–30). Lifetime being by definition the inverse of the dissociation rate, this ratio provides equivalently the evolution of the kinetic rate constant, (or dissociation rate), of the single bond comparatively to the collective bond on which the same force is exerted. In parallel bonds, the force amplifies – by orders of magnitude – the N -dependent increase in relative lifetime. In zipper bonds, the ratio of multiple to single bond lifetimes also increases, but remains proportional to N . The zipper-bond relationship can be superimposed to the parallel-bond relationship obtained for $f/f_\beta = 2$. Diamond symbols represent the relationships predicted by the stochastic theory of uncorrelated multiple parallel bonds (see Eq. (10) and Williams (2003)). Empty squares represent the relationships predicted by the theory of uncorrelated multiple zipper bonds (see Eq. (11) and Williams (2003) and Evans (2001)). The continuous curves correspond to the proposed adjustment of the stochastic theory using the explicit form given in Eq. (12) to describe the kinetics of uncorrelated parallel bonds.

by the bond lifetime of a single and isolated bond ($n = 1$) is plotted versus the number N of identical bonds constituting the parallel and “zipper” configurations. The main message is that although the lifetime of the collective bonds still decreases with increasing force (as shown by Eqs. (11) and (12)), bonds organized collectively have a much higher capacity to stabilize the adhesive structure compared to isolated bonds. This stabilization effect increases with increasing the bond number for both parallel and zipper configurations. Note that by contrast, a series of uncorrelated bonds would dissociate faster than single bonds (Evans, 1998). In parallel and zipper bonds, this effect is particularly marked at the beginning of bond association: $n = 2, 3, \dots$. Thus, the theory predicts that the early phase of lateral bond association is particularly efficient for stabilizing adhesion.

If both zipper and parallel configurations stabilize adhesion, the parallel configuration, where the dissociation force is equally divided between bonds, reveals a marked effect of the force in the reduction of the global dissociation rate. This is basically due to the associated reduction in the exponential amplification classically described by Eqs. (1) and (4) for single bonds, and generalized to collective bonds by Eqs. (11)–(13). However, at first glance, the force-dependent reduction in the dissociation rate of bonds characterized by a collective organization may be seen as a counter intuitive result if we forget to consider that both single and collective bonds still dissociate more under a force increase (Eqs. (4), (11) and (12)). Indeed, the force-induced exponential decrease in bond lifetime is cut down by the collective bond organization, most remarkably in the parallel case. We underline here that the effect of increasing bond stabilization caused by a homogeneous force distribution has been under-considered before. This is nevertheless a fundamental mechanism for the control of cellular adhesion by force, including the force-dependence of dissociation or stabilization

rates as well as the force-dependence of weakening or strengthening processes. In other words, lateral bond association (or clustering) is capable to promote an efficient reduction in the force-dependent increase in the dissociation rate of adhesion sites in a context where both collective and individual bonds all tend to fail at higher force.

By contrast, the zipper configuration provides a relevant example of the effect of a heterogeneous distribution of force on the global failure rate. For N uncorrelated bonds in the zipper configuration, the global failure rate is divided by N , meaning that the stabilization mechanism directly depends on the bond number but, contrary to the parallel configuration, not on the force applied. It is equivalent to say that a heterogeneous force distribution limits the beneficial effect – in terms of stabilization – of dividing the force through several bonds.

Another important message brought by the theoretical results plotted in Fig. 2 is that the analytical equation given by Eq. (10) provides a satisfactorily curve fitting while we noticed that previously proposed analytical forms such as in (Evans, 2001): $K_{off}(f) \approx k_{off}^0 \frac{f}{Nf_\beta} \exp\left(\frac{f}{Nf_\beta}\right)$, fail to provide a satisfactorily curve fitting. Note however that the form presently proposed (in Eq. (12)) to fit the multiple bond lifetime (Eq. (10)) remains consistent with the general form previously proposed to describe dissociation rates of bonds with necessarily complex energy barriers (Evans and Ritchie, 1997): $K_{off}(f) \approx k_{off}^0 g(f) \exp\left(\frac{f}{Nf_\beta}\right)$, considering that: $k_{off}^0 g(f) = K_{off}^0(f)$. Present results (Fig. 2) bring a new confirmation of the initial intuitions of Evans (Evans, 2001; Evans and Ritchie, 1997) about the relevance of the Bell type model (Eq. (13)) to describe dissociation rates of multiple parallel and zipper bonds which are individually in agreement with the Bell type model (Eq. (11)). Advantageously, these analytical expressions allow delineating the specific effects of bond number and dissociation force on the kinetic adhesion parameters in various bond configurations (Fig. 2).

3.2. Comparison with experimental results

3.3. Parallel bonds (bonds equally stretched by AFM tip)

We attempted to analyze the feature of the parallel configuration described by the multiple bond theory above. The most straightforward example is provided by the reference data obtained by the group of A. Noy (Friddle et al., 2007; Sulchek et al., 2005) who used dynamic force spectroscopy via AFM to characterize binding of several individual single-chain variable fragments (scFv) antibody to the Mucin1 (MUC1) peptide (MUC1–Ab). This interaction is the main targeting mechanism for a family of experimental radio-immunotherapies for cancer treatment (Albrecht et al., 2004). Indeed, clinical researchers have used multivalency of protein adhesion as an affinity-enhancing approach in a variety of immunotherapies and imaging techniques to target specific tissues (Souriau and Hudson, 2003). Noteworthy, authors (Friddle et al., 2007; Sulchek et al., 2005) found a direct experimental verification of the uncorrelated multiple bond rupture model because they were able to impose a uniform force distribution through a few parallel bonds and compared with the single bond. A remarkable confirmation of the theoretical predictions presented above was brought by these authors because the dissociation rate found for two (respectively three) bonds in parallel drop precipitously compared to the single (respectively two) bond. The present theoretical approach revealed that in addition to the bond number effect, the effect of the force magnitude above the reference force scale, was also a critical parameter. Indeed, in these AFM experiments, force increased sharply in parallel to the bond number (e.g., $f/f_\beta \approx 10$ for $N=1$, $f/f_\beta \approx 20$ for $N=2$, $f/f_\beta \approx 30$ for $N=3$). Theoretical

results shown in Fig. 2 reveal that as force increases, the bond number effect on dissociation rate is dramatically increased in uncorrelated parallel bonds with homogeneous force distribution. Present data demonstrate that the main beneficial effect of multivalent interactions compared to single bond is the reduction on the kinetic off-rate and the corresponding increase in lifetime to the extent that the force distribution remains homogeneous. Such a parallel configuration would certainly be desired to improve the binding efficiency of receptor-targeted immunotherapeutic treatment (Souriau and Hudson, 2003).

3.4. Zipper bonds (bonds unequally stretched by shear flow)

The viscous shear flow allows studying the motion of receptor-coated cells or particles along a flat ligand-coated surface. At low hydrodynamic force (e.g., ~a few piconewton) and for low ligand concentrations (e.g., from 9 to 170 ligands/ μm^2 in Smith et al. (1999)), detectable cell/particle arrests reveal single molecular bond formation (Kaplanski et al., 1993; Pierres et al., 1996a; Smith et al., 1999). Neglecting rebinding if receptor density is low, the dissociation rate could be deduced from the slope of the natural log of number of cell–surface interactions versus the duration of each event (Kaplanski et al., 1993; Pierres et al., 1996b; Smith et al., 1999; Tissot et al., 1992). In Smith et al. (1999), the measured unstressed dissociation rates k_{off}^0 of single bond remained in a close range of values: 2.4–3.8 s^{-1} , in spite of the wide variety of ligand tested (i.e., P-selectin, E-selectin, L-selectin and PNAd). This is consistent with data obtained by other authors on the same cells (Alon et al., 1998, 1995; Kaplanski et al., 1993; Smith et al., 1999). The shear stress-dependence on dissociation rates, $k_{off}(f)$, was affected by the change in receptor–ligand affinity to take values in a higher range: 5–36 s^{-1} as expected from Bell model (Eq. (4)) (Smith et al., 1999). Beyond, this type of experiment is important as it allows to study the flow-enhanced cell adhesion mechanisms (Zhu et al., 2008). Concerning the limits of the single bond assumption in sheared cells, it has been suspected that, as ligand density or shear stress increases, an increased number of multiple bond events is involved in cell adhesion. However, their effect was not thought to deeply affect the estimated values of dissociation rate $k_{off}(f)$ (Smith et al., 1999).

In single bond models of cell arrest under shear, an oblique direction of the bond force reacting to the shear force is assumed (Chang and Hammer, 1999; Smith et al., 1999; Zhu et al., 2008). Hydrodynamic theory predicts that once a bond is created with the substrate, it tends to re-equilibrate the translational and rotational velocity components at the cell wall, thus canceling out the slip velocity (Chang and Hammer, 1999; Hammer and Apte, 1992). This suggests that the direction of bond traction during shear flow is necessarily oblique, i.e., resulting from tangential and normal tensile (or compressive) force components at an adhesive interface (Gallant et al., 2005). Based on previous analysis (Evans, 1985; Ward and Hammer, 1993), detachment of a sheared cell is expected to occur via peeling of the leading edge of the cell. Accordingly, bond loading is highly non uniform along the contact area since bond forces are maximal at the periphery and decay rapidly toward the center of the cell (Zhu et al., 2008). Thus, in shear flow experiments where independent bonds start to respond collectively, i.e., at increasing shear (Zhu et al., 2008) or at increasing ligand/receptor concentrations (Gallant et al., 2005), the zipper configuration appears to be a satisfactory model because force distribution on bonds is highly non-uniform. It means that the huge effects on lifetimes of multiple parallel bonds (Fig. 2) such as those reported from AFM experiments (Sulchek et al., 2006) could not be expected in shear flow experiments. Accordingly, studying cell adhesion strengthening in sheared fibroblasts, Gallant et al. (2005) were surprised to

observe that parallel association of integrins by focal adhesion (respectively clustering) accounts for only 30% (respectively 60%) of the strengthening response to shear. We presently postulate that this result is linked to the highly unequal distribution of the resultant force during shear. These mechanical factors would clearly favor the zipper configuration which exhibits the lowest sensitivity to the bond number and no force-dependence for the prefactor of the dissociation rate. We conclude that the homogeneous or heterogeneous character of the force distribution, which is indeed associated to the resulting direction of the force applied on interfacial bonds, is a determinant factor of the kinetics of adhesion.

3.5. Significance of present results

Theoretical approach and experimental results consistently show that the distribution of force amongst bonds organized collectively and working stochastically fundamentally affects the kinetics of adhesion. Depending on the size of adhesion site, the scale at which these mechanisms operate cover a wide range of scales: from the nanometer scale for the weak initial adhesion sites constituted by only a few molecules (e.g., integrins and talins) to 10 μm for the mature focal adhesion which contains more than fifty adhesion proteins (Zamir and Geiger, 2001). The list of adhesion molecules continue to grow and key mechanisms that regulate signal transduction pathways and modulate adhesion assembly still need to be identified (Lo, 2006). Future challenges include the determination of how these molecules work together as a physico-chemical complex and how their coupling contributes to an adapted biological response. This reinforces the need of calculating stress/strain fields exerted on living tissues at various scales and certainly up to the smallest molecular scales, e.g., in the lung (Suki and Bates, 2008). In this perspective, computational fluid/solid mechanics appears for the future as an indispensable tool to get mechanical parameters at various scales, in various living structures and functional conditions, e.g., in the lung (Elad et al., 2008). More particularly, we find that, if the force exerted on a given adhesion site is distributed homogeneously amongst the bonds, one may expect a force-dependent stabilization process which dramatically depends on bond number. Noteworthy, the stochastic theory of parallel bonds stretched uniformly predicts a drastic reduction in the dissociation rate compared to single bonds. Unexpectedly, the relative decay in dissociation rate, (i.e., increase in lifetime), of collective bonds compared to single bond is enhanced by increasing stretching forces.

In the absence of precise knowledge about the force distribution in living tissues down to the nanoscale, it is easier to consider that the heterogeneous force distribution better fits the standard biological conditions. However, this is not necessarily true. We can say that the parallel organization of bonds constitutes an impressive means to cut down the straightforward process of force-induced reduction in lifetime. This remarkable property of parallel bonds – and to a lesser extent of zipper bonds – has not been so clearly pointed out before. Experiments by AFM constitute the most ideal conditions in which multiple parallel bonds can be stretched uniformly and indeed these AFM results seem consistent with the theory (Sulchek et al., 2005). As soon as force distribution on multiple bonds is heterogeneous, the stabilization process will still be effective but much less marked than in the case of uniform distribution. This is because the totality of the force is exerted on the leading bond(s), i.e., the proper of the zipper configuration, and thereby the rupture force of the leading bond, is rapidly attained. We point out here that the force distribution applied on adhesion sites of sheared cells is likely highly heterogeneous. This situation most likely corresponds to

many biological situations including the frequent case of cells sheared by the flowing blood and also the pathological cases in general. Taking again the example of the deep lung, the highly elevated stress sites found in diseased emphysematous lungs suggests that heterogeneous stress distribution could weaken adhesion sites in the deep lung and thereby contribute to the disease (Gefen et al., 1999). Finally, another consequence of the present approach is to show that, as soon as bonds are multiple, with the same bond number, but stretched by different force/stress fields, one can expect very different data in terms of bond kinetics. Indeed, specific bond kinetics experiments performed with tightly controlled homogeneous and heterogeneous force distributions have to be designed to further test the presently developed concept.

Conflict of interest

All authors report no actual or potential conflict of interest for the work reported in this paper.

Acknowledgment

For this work, we acknowledge receipt of a grant from Agence Nationale de la Recherche (ANR-09-PRI-002-03).

References

- Albrecht, H., Burke, P.A., Natarajan, A., Xiong, C.Y., Kalicinsky, M., DeNardo, G.L., DeNardo, S.J., 2004. Production of soluble ScFvs with C-terminal-free thiol for site-specific conjugation or stable dimeric ScFvs on demand. *Bioconjugate Chemistry* 15, 16–26.
- Alon, R., Hammer, D.A., Springer, T.A., 1995. Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow. *Nature* 374, 539–542.
- Alon, R., Chen, S., Fuhlbrigge, R., Puri, K.D., Springer, T.A., 1998. The kinetics and shear threshold of transient and rolling interactions of L-selectin with its ligand on leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 11631–11636.
- Andre, P., Benoliel, A.M., Capo, C., Foa, C., Buferne, M., Boyer, C., Schmitt-Verhulst, A.M., Bongrand, P., 1990. Use of conjugates made between a cytolytic T cell clone and target cells to study the redistribution of membrane molecules in cell contact areas. *Journal of Cell Science* 97 (Pt 2), 335–347.
- Arya, M., Kolomeisky, A.B., Romo, G.M., Cruz, M.A., Lopez, J.A., Anvari, B., 2005. Dynamic force spectroscopy of glycoprotein Ib-IX and von Willebrand factor. *Biophysical Journal* 88, 4391–4401.
- Ashkin, A., 1992. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophysical Journal* 61, 569–582.
- Ashkin, A., Schutze, K., Dziedzic, J.M., Euteneuer, U., Schliwa, M., 1990. Force generation of organelle transport measured in vivo by an infrared laser trap. *Nature* 348, 346–348.
- Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Riveline, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L., Geiger, B., 2001. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micro-patterned substrates. *Nature Cell Biology* 3, 466–472.
- Bell, G.I., 1978. Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science* 200, 618–627.
- Bell, G.I., Dembo, M., Bongrand, P., 1984. Cell adhesion. Competition between nonspecific repulsion and specific bonding. *Biophysical Journal* 45, 1051–1064.
- Binnig, G., Quate, C.F., Gerber, C., 1986. Atomic force microscope. *Physical Review Letters* 56, 930–933.
- Bongrand, P., Golstein, P., 1983. Reproducible dissociation of cellular aggregates with a wide range of calibrated shear forces: application to cytolytic lymphocyte target cell conjugates. *Journal of Immunological Methods* 58, 209–224.
- Bruinsma, R.F., 2005. Theory of force regulation by nascent adhesion sites. *Biophysical Journal* 89, 87–94.
- Capo, C., Garrouste, F., Benoliel, A.M., Bongrand, P., Depieds, R., 1981. Non-specific binding by macrophages: evaluation of the influence of medium-range electrostatic repulsion and short-range hydrophobic interaction. *Immunological Communications* 10, 35–43.
- Chang, K.C., Hammer, D.A., 1999. The forward rate of binding of surface-tethered reactants: effect of relative motion between two surfaces. *Biophysical Journal* 76, 1280–1292.
- Choquet, D., Felsenfeld, D.P., Sheetz, M.P., 1997. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell* 88, 39–48.
- Cluzel, C., Saltel, F., Lussi, J., Paulhe, F., Imhof, B.A., Wehrle-Haller, B., 2005. The mechanisms and dynamics of (alpha)v(beta)3 integrin clustering in living cells. *Journal of Cell Biology* 171, 383–392.
- Discher, D.E., Janmey, P., Wang, Y.L., 2005. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* 310, 1139–1143.
- Elad, D., Wolf, M., Keck, T., 2008. Air-conditioning in the human nasal cavity. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 163, 121–127.
- Evans, E., 1998. Energy landscapes of biomolecular adhesion and receptor anchoring at interfaces explored with dynamic force spectroscopy. *Faraday Discussions of the Chemical Society* 111, 1–15.
- Evans, E., 2001. Probing the relation between force–lifetime–and chemistry in single molecular bonds. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 30, 105–128.
- Evans, E., Kinoshita, K., 2007. Using force to probe single-molecule receptor-cytoskeletal anchoring beneath the surface of a living cell. *Methods in Cell Biology* 83, 373–396.
- Evans, E., Ritchie, K., 1994. Probing molecular attachments to cell surface receptors: image of stochastic bonding and rupture processes. In: Rabe, J., Gaub, H.E., Hansma, P.K. (Eds.), *Scanning Probe Microscopies and Molecular Materials*. Kluwer Publishing, Amsterdam.
- Evans, E., Ritchie, K., 1997. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophysical Journal* 72, 1541–1555.
- Evans, E., Ritchie, K., Merkel, R., 1995. Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces. *Biophysical Journal* 68, 2580–2587.
- Evans, E.A., 1985. Detailed mechanics of membrane-membrane adhesion and separation II. Discrete kinetically trapped molecular cross-bridges. *Biophysical Journal* 48, 185–192.
- Evans, E.A., Calderwood, D.A., 2007. Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science* 316, 1148–1153.
- Féréol, S., Fodil, R., Laurent, V.M., Bolland, M., Louis, B., Pelle, G., Hénon, S., Planus, E., Isabey, D., 2009. Prestress and adhesion site dynamics control cell sensitivity to extracellular stiffness. *Biophysical Journal* 96, 2009–2022.
- Fridde, R.W., Sulchek, T.A., Albrecht, H., De Nardo, S.J., Noy, A., 2007. Counting and breaking individual biological bonds Force spectroscopy of tethered ligand-receptor pairs. *Current Nanoscience* 3, 41–48.
- Galbraith, C.G., Yamada, K.M., Sheetz, M.P., 2002. The relationship between force and focal complex development. *Journal of Cell Biology* 159, 695–705.
- Gallant, N.D., Michael, K.E., Garcia, A.J., 2005. Cell adhesion strengthening: contributions of adhesive area, integrin binding, and focal adhesion assembly. *Molecular Biology of the Cell* 16, 4329–4340.
- Gefen, A., Elad, D., Shiner, R.J., 1999. Analysis of stress distribution in the alveolar septa of normal and simulated emphysematous lungs. *Journal of Biomechanics* 32, 891–897.
- Geiger, B., Bershadsky, A., 2001. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Current Opinion in Cell Biology* 13, 584–592.
- Giannone, G., Jiang, G., Sutton, D.H., Critchley, D.R., Sheetz, M.P., 2003. Talin1 is critical for force-dependent reinforcement of initial integrin-cytoskeleton bonds but not tyrosine kinase activation. *Journal of Cell Biology* 163, 409–419.
- Hammer, D.A., Apte, S.M., 1992. Simulation of cell rolling and adhesion on surfaces in shear flow: general results and analysis of selectin-mediated neutrophil adhesion. *Biophysical Journal* 63, 35–57.
- Kaplanski, G., Farnier, C., Tissot, O., Pierres, A., Benoliel, A.M., Alessi, M.C., Kaplanski, S., Bongrand, P., 1993. Granulocyte-endothelium initial adhesion. Analysis of transient binding events mediated by E-selectin in a laminar shear flow. *Biophysical Journal* 64, 1922–1933.
- Leckband, D.E., Israelachvili, J.N., Schmitt, F.J., Knoll, W., 1992. Long-range attraction and molecular rearrangements in receptor-ligand interactions. *Science* 255, 1419–1421.
- Lo, S.H., 2006. Focal adhesions: what's new inside. *Developmental Biology* 294, 280–291.
- Pasternak, C., Elson, E.L., 1985. Lymphocyte mechanical response triggered by cross-linking surface receptors. *Journal of Cell Biology* 100, 860–872.
- Pierres, A., Benoliel, A.M., Bongrand, P., 1996a. Measuring bonds between surface-associated molecules. *Journal of Immunological Methods* 196, 105–120.
- Pierres, A., Benoliel, A.M., Bongrand, P., van der Merwe, P.A., 1996b. Determination of the lifetime and force dependence of interactions of single bonds between surface-attached CD2 and CD48 adhesion molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 15114–15118.
- Simson, D.A., Ziemann, F., Strigl, M., Merkel, R., 1998. Micropipet-based pico force transducer: in depth analysis and experimental verification. *Faraday Discussions of the Chemical Society* 74, 2080–2088.
- Smith, M.J., Berg, E.L., Lawrence, M.B., 1999. A direct comparison of selectin-mediated transient, adhesive events using high temporal resolution. *Biophysical Journal* 77, 3371–3383.
- Sokurenko, E.V., Vogel, V., Thomas, W.E., 2008. Catch-bond mechanism of force-enhanced adhesion: counterintuitive, elusive, but ... widespread? *Cell Host Microbe* 4, 314–323.
- Souriau, C., Hudson, P.J., 2003. Recombinant antibodies for cancer diagnosis and therapy. *Expert Opinion of Biological Therapy* 3, 305–318.
- Suki, B., Bates, J.H., 2008. Extracellular matrix mechanics in lung parenchymal diseases. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 163, 33–43.
- Sulchek, T., Fridde, R.W., Noy, A., 2006. Strength of multiple parallel biological bonds. *Biophysical Journal* 90, 4686–4691.

Publication 2

D. Isabey et al. / Journal of Biomechanics 46 (2013) 307–313

313

- Sulchek, T.A., Friddle, R.W., Langry, K., Lau, E.Y., Albrecht, H., Ratto, T.V., DeNardo, S.J., Colvin, M.E., Noy, A., 2005. Dynamic force spectroscopy of parallel individual Mucin1-antibody bonds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 16638–16643.
- Thomas, W., 2008. Catch bonds in adhesion. *Annual Review of Biomedical Engineering* 10, 39–57.
- Thomas, W.E., Vogel, V., Sokurenko, E., 2008. Biophysics of catch bonds. *Annual Review of Biophysics* 37, 399–416.
- Tissot, O., Pierres, A., Foa, C., Delaage, M., Bongrand, P., 1992. Motion of cells sedimenting on a solid surface in a laminar shear flow. *Biophysical Journal* 61, 204–215.
- Tsukasaki, Y., Kitamura, K., Shimizu, K., Iwane, A.H., Takai, Y., Yanagida, T., 2007. Role of multiple bonds between the single cell adhesion molecules, nectin and cadherin, revealed by high sensitive force measurements. *Journal of Molecular Biology* 367, 996–1006.
- Vogel, V., Sheetz, M.P., 2009. Cell fate regulation by coupling mechanical cycles to biochemical signaling pathways. *Current Opinion in Cell Biology* 21, 38–46.
- Ward, M.D., Hammer, D.A., 1993. A theoretical analysis for the effect of focal contact formation on cell-substrate attachment strength. *Biophysical Journal* 64, 936–959.
- Williams, P.M., 2003. Analytical descriptions of dynamic force spectroscopy: behaviour of multiple connections. *Analytica Chimica Acta* 479, 107–115.
- Zamir, E., Geiger, B., 2001. Components of cell-matrix adhesions. *Journal of Cell Science* 114, 3577–3579.
- Zhu, C., Yago, T., Lou, J., Zarnitsyna, V.I., McEver, R.P., 2008. Mechanisms for flow-enhanced cell adhesion. *Annals of Biomedical Engineering* 36, 604–621.

Magnetic Twisting Cytometry

Daniel Isabey^{a,b,c,*}, Adam Caluch^{a,b,c}, Bruno Louis^{a,b,c}, Gabriel Pelle^{a,b,c,d}

^a *Inserm, U955, Equipe 13, Cell and Respiratory Mechanics Department, 8, rue du Général Sarrail, F-94010 Créteil Cedex, France ;*

^b *Université Paris Est, UMR_S955, UPEC, 8, rue du Général Sarrail, F-94010 Créteil Cedex, France ;*

^c *CNRS, ERL 7240, 8, rue du Général Sarrail, F-94010 Créteil Cedex, France ;*

^d *AP-HP, Groupe Hospitalier H. Mondor – A. Chenevier, Service de Physiologie – Explorations Fonctionnelles, 51, Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, F-94010 Créteil Cedex, France ;*

Corresponding author:

Daniel Isabey

INSERM UMR 955 (équipe 13),

Faculté de Médecine,

8, rue du Général Sarrail,

94010 Créteil Cedex, France.

Tel.: +33 (0) 1 49 81 37 00;

Fax: +33 (0) 1 48 98 17 77.

INTRODUCTION

Living cells in the human body are constantly subjected to mechanical stimulations throughout life. The origin of stresses and strains can arise from both the external environment and the internal physiological conditions (Silver and Siperko, 2003). Thereby, cells can respond in a variety of ways depending on their sensitivity to mechanical forces and how micromechanical environments can control biological processes (Discher et al., 2005; Engler et al., 2006; Féréol et al., 2006; Féréol et al., 2009). To understand how cells mechanically respond to physical loads, there is a need to control the mechanical stress exerted on studied cells by *ex vivo* living cell experiments (Kim et al., 2009). Excellent reviews on the interdependencies between cell mechanics and cell response to force are available (Chiquet et al., 2009; Hoffman and Crocker, 2009; Janmey and McCulloch, 2007; Lele et al., 2007; Zhu et al., 2000). These reviews emphasize that in parallel to a variety of cellular models, a number of micromanipulation techniques have been purposely developed, notably magnetic twisting cytometry (MTC), micropipette aspiration, optical tweezers (OT), Atomic Force Microscopy (AFM) indentation, cyto-indentation or microplaques and fluid shear flow (Lim et al., 2006). The MTC, invented two decades ago by Wang et al., considers that the cell mechanical response is dictated by its intracellular architecture which is intentionally probed by twisted ferromagnetic microbeads bounded to transmembrane receptors physically linked to the intracellular structure (Wang et al., 1993). Eukaryotic cells contain such an intricate molecular framework, the CSK, composed of interconnected microfilaments, microtubules and intermediate filaments that respond but also generate mechanical loads, and thereby are largely responsible for the cellular ability to resist shape distortion (Ingber, 2006). Cellular integrity and mechanical properties lie in the balance between tensional and compressive forces (Chicurel et al., 1998). The latter are constantly redistributed throughout the whole architecture (Hoffman and Crocker, 2009), i.e., the proper

of “tensegrity” structures (Ingber, 1993; Stamenovic and Coughlin, 1999; Wendling et al., 1999) and are capable to efficiently transmit mechanical stress and activate cytoplasmic (and transmembrane) proteins throughout the cell (Hu et al., 2003; Janmey and McCulloch, 2007; Na et al., 2008). The corollary, used by MTC, is that probing directly the CSK enables to locally capture the essential of cell mechanical properties while minimally affecting the measured properties (Féréol et al., 2008; Lele et al., 2007; Wang and Ingber, 1995). However, cellular viscoelastic properties obtained with beads having the same coating and size but different techniques, (e.g., OT and MTC), are not so easy to reunify (Janmey and McCulloch, 2007; Laurent et al., 2002b), suggesting that type and direction of loading, spatial variability and biological diversity all affect the cell response. Magnetic fields are advantageously used because there are robust, easy to control and can respond rapidly while a huge range of frequencies can be tested, (e.g., from 10^{-3} Hz to 10^4 Hz (Chowdhury et al., 2008)). The MTC method has been modified to be coupled with microscopy visualization including high-resolution microscopic imaging methods. This “high frequency MTC” enables to characterize the dynamic cell mechanical behavior, still over large populations of beads and cells (Fabry et al., 2001). In such a case, an averaged nanoscale axial displacement is measured instead of an averaged bead rotation measured in the initial method (Wang et al., 1993). Consistently with the soft glass rheology (SGR) model, the dependence of cell stiffness on loading frequency has been represented by a unique weak power-law (Fabry et al., 2001). However, dynamic rheology model which takes into account multiple parallel noncovalent bonds reveals that two power laws are necessary which is indeed the case when cells are tested over a wider range of loading frequencies (Chowdhury et al., 2008) Thus, a comprehensive cellular model capable to relate the cell mechanical response to the complex cellular and molecular structures still remains to be elaborated (Hoffman and Crocker, 2009). This lack of comprehensive cellular models can be associated to the constant difficulty of relating the cell mechanical response

experimentally measured to the underlying cellular and molecular structures (Stamenovic et al., 2007).

Variability in mechanical properties reflects not only the differences amongst experimental conditions which are proper to each technique but more fundamentally the spatial complexity and multiscale time-dependence of cellular and molecular structures (Fabry et al., 2001; Hu et al., 2003; Ingber, 1998). Indeed, it is now widely accepted that structural and molecular aspects predominate when looking at living cell mechanical responses (Discher et al., 2009; Ingber, 2008a; Janmey and McCulloch, 2007). The role of molecular motors such as acto-myosin has been largely suspected in stretched cells [Ladoux, 2012 #134] and notably in contractile cells, e.g., muscle cells (Mitrossilis et al., 2009), but it is also at the origin of intracellular tension that is more or less present in all cell types (Wang et al., 2002; Wendling et al., 2000). However, the contribution of adhesion molecules was mostly ignored when looking at the cell mechanical response. We are presently showing that an appropriate analysis of data obtained by Magnetic Twisting Cytometry enables to reveal, in addition to CSK mechanical properties, some hidden aspects of the kinetics of cell-matrix adhesion. Indeed, the partial defect in integrin-matrix attachment extracted from the time-dependent signal of bead rotation constitutes a unique opportunity to reveal the molecular properties at the cell-matrix interface.

It has also been demonstrated that mechanical forces can alter the chemical activities of a number of CSK-related molecules (Chicurel et al., 1998; Meyer et al., 2000; Wang et al., 1993; Yoshida et al., 1996). This is susceptible to modify the biochemical reactions that mediate critical cellular functions (Eyckmans et al., 2011). Little is known about the mechanisms by which individual cells sense mechanical signals and transduce them into changes in intracellular biochemistry and gene expression - a process that is known as mechanotransduction. Incidentally, twisted bead have been used in a number of studies on

mechanical force inducing signalization molecules during the last years (Hu et al., 2003; Na et al., 2008). Using data obtained in living cells, we are showing in this chapter how the MTC method can reveal the effect of stress or strain at very different scales.

HISTORICAL ASPECTS

Applying mechanical forces and stresses to cells by means of magnetic beads is surprisingly not a new idea as it dates from the beginning of the 20th century. Magnetic dragging and twisting were first described from the fundamental point of view of physics by Francis H.C. Crick, an English molecular biologist, physicist and neuroscientist who received the Nobel price in 1962 for his pioneering work on 3D-structure of DNA. He published in the years 1950's, with A.F.W. Hughes, a couple of reference papers showing that external magnetic fields can be used to twist magnetic particles within isolated cells and probe the viscous properties of the cytoplasm (Crick and Hughes, 1950). More than two decades later, David Cohen from MIT, (the inventor of brain scan technology called magnetoencephalography), was the first to detect the presence of inhaled magnetic material within human body while he was monitoring physiological magnetic fields from cardiac electric currents. He demonstrated that contaminating particles retained in the lungs (and other organs) secondary to dust inhalation could be measured after a permanent magnetic moment was induced by brief application of a strong magnetic field (Cohen, 1973). The combined effect of these aligned moments was to produce a remanent field that was detected outside the patient with a sensitive magnetometer. This remanent field has been initially proposed to quantify the amount of contaminating particles in the body like for instance finding the magnetic material deposited in workers occupationally exposed to airborne dusts (Freedman et al., 1980). This technique has been called "magnetopneunography". The most striking observation made by D. Cohen was that the remanent field from the lungs decreased by as

much as a factor of six during the first hour after magnetization, a phenomenon he called “relaxation” (Cohen, 1973) which has been latter confirmed by many studies such as that of Peter Valberg, a physicist from Harvard School of Public Health (Valberg and Brain, 1979). Since the particles magnetic moments are permanent while the remanent field can be restored to its initial value by remagnetization, D. Cohen considered that this “relaxation” was due to some process capable to randomly rotating the magnetic particles retained in the lungs. To target the cellular mechanisms responsible for particle motion amongst a number of potential little-controlled in vivo mechanisms, experiments were performed in cultured macrophages obtained by lung lavages in animals who initially inhaled magnetic particles (Valberg, 1984; Valberg and Albertini, 1985). Based on these ex vivo cellular studies as well as on in vivo studies in animal in which the decay in magnetic signal could be reproduced (Brain et al., 1984), the “relaxation” phenomenon could be attributed to macrophage cytoplasmic motions and thus related to phagocytic activity.

The idea of using intracellular magnetic particles as non-optical probes of motility and rheological properties of the cytoplasm (mainly of pulmonary macrophages) was initiated by two physicists of Harvard School of Public Health: Peter Valberg and Jim Butler (Valberg and Butler, 1987). They described the physical principles of a new technique called: cell magnetometry, and an appropriate hydrodynamic model to deduce the cytoplasmic viscosity from the resistance to particle motion. These authors defined many aspects of the technique which are kept today in the magnetic twisting cytometry system we used in our laboratory: (i) Magnetic particle rotation was measured with a sensitive fluxgate-magnetometer, (ii) The particles' remanent magnetic field of the order of 1 nT ($= 10^{-9}$ Tesla) was measured in presence of a large twisting field of about 5 mT ($1 \text{ mT} = 10^{-6}$ Tesla). The latter condition required minimizing external magnetic noises by mu-metal shielding and rotating the macrophage culture in order to use lock-in amplification of the rather small remanent

magnetic signals. Interestingly, the link of cell magnetometry with the intracellular structure was no clear except that incubation of macrophages with cytochalasin D tended to inhibit particle intracellular motion in a dose-dependent manner (Valberg and Feldman, 1987). Moreover, cell magnetometry was presented as a useful tool to characterize intracytoplasmic cell properties (i.e., essentially viscosity of alveolar macrophages) not only for in vitro experimental conditions but also for in vivo studies.

Measuring mechanical properties in a variety of cells that do not phagocytose the magnetic beads is a biologically-relevant idea of Ning Wang and Donald Ingber who proposed to attach spherical ferromagnetic particles to the CSK-specific cell surface receptors normally expressed on the apical face of adherent cells (Wang et al., 1993). This new probing system associated to the relative easiness of manipulating magnetic fields on cell culture, has constituted a determinant improvement which enables magnetic twisting cytometry to become a leading technique for the study of cell response in many biological problems. Almost all cell types can now be measured by using magnetic beads, e.g., most of tissue cells; inflammatory cells. We presently demonstrate that the strength of the physical linkage between ligand - receptors - CSK can now be probed by magnetic twisting cytometry. Accordingly, living cell results can be reanalyzed by such appropriate adhesion models to characterize the bead-cell interface by molecular dynamics. Altogether, we presently bring new arguments which confirm the richness of the bead twisting method to characterize not only the multiscale CSK structure but also cell-matrix interactions.

METHODOLOGICAL ASPECTS

1. EXPERIMENTAL DEVICE (Figure 1)

By principle, Magnetic Twisting Cytometry (MTC) uses ferromagnetic microbeads to apply twisting forces, i.e., essentially shear stresses, to specific transmembrane receptors initially present at the surface of living cells (Wang et al., 1993). MTC has been extensively described in previous reviews or synthesis articles on cell mechanics (Féréol et al., 2008; Lele et al., 2007). We present hereafter a summary.

Carboxylated ferromagnetic beads of about 4.5 μm in diameter (Spherotek) are coated with ligand, (e.g., synthetic RGD peptide from the cell-binding region of fibronectin, receptor-specific antibodies, ECM molecules) (Figure 1 A). Before experiments, coated ferromagnetic beads are added to the cells (~ 20 beads/cell) in serum-free, chemically defined medium and incubated for 10 min at 37°C followed by gentle washing 3 times with PBS to remove unbound beads prior to force application.

MTC experiments are performed over large populations of living adherent cells cultured in wells of about 6 mm in diameter. To apply twisting forces to beads and bound surface receptors, a strong (~ 150 mT) but brief (~ 150 ms) magnetic field is applied to the receptor bound ferromagnetic beads using horizontal Helmholtz coils. This induces and aligns the magnetic dipoles of the beads in the same horizontal direction. Then, a weaker transient (plateau duration ~ 1 min in between two ramps of duration ~ 400 ms) magnetic field \vec{H} (≤ 6 mT equivalent to 4% of the magnetization field) (Figure 1 B) is applied in the perpendicular direction using a second vertically oriented Helmholtz coil (Figure 1 C). As a result, the beads are twisted, thus applying shear force directly to the bound receptors. The resulting magnetic torques is in the range 450-1200 pN $\times\mu\text{m}$ (Laurent et al., 2002b).

$$\vec{C} = \mu_0 \vec{m} \wedge \vec{H} \text{ i.e., } C = \mu_0 m H \sin\left(\frac{\pi}{2} - \theta_{\text{eq}}\right) \text{ (with } m \approx 2.3 \cdot 10^{-13} \text{ Am}^2\text{)} \quad (1)$$

m is the modulus of the bead magnetic moment obtained after calibration and μ_0 the permeability of free space. The spatially uniform perpendicular field H can be modified by

changing the current in the Helmholtz coils, i.e., at the maximum $I \approx 15A$. θ_{eq} is the bead deviation angle at instant of equilibrium between shear stress and CSK elastic recoil, i.e., after 1 mn of torque application.

Note that MTC measurements cannot be performed when the projected values of the remanent magnetic field are too small, e.g., for values below the noise level of the magnetometer and probes (Féréol et al., 2008). A density of 2 to 10 beads per cell, i.e., 20,000-50,000 beads on a cell culture, results in a maximum remanent field B_0 in the range 1-2 nT, which corresponds to a reasonable signal to noise ratio. This is why applied torque could not be less than 400 pN $\times\mu$ m to obtain a measurable change in remanent field. On the other hand, to avoid excessive heating in the Helmholtz coils, torque could not exceed 1200 pN $\times\mu$ m. A constraint of the MTC system is to measure remanent magnetic fields in the horizontal direction while twisting magnetic fields 10^8 greater are superimposed (Figure 1 C). This has been solved in prior bead twisting studies (Valberg and Butler, 1987) by rotating the well (Petri-dish) containing beads and cells at, e.g., 10 Hz, and using lock in amplification in addition to some shielding to protect from external magnetic fields.

The resulting CSK deformation or angular strain induced by the twisting field is measured based on the mean bead rotation angle which is continuously measured (throughout 1 mn of twisting period followed by 1 mn of recovery period) from the change in projected magnetic bead moment, using the arc cosine of the ratio of remanent field to the field at time 0 (Figure 1 C):

$$\theta(t) = \text{arc cos} \left(\frac{B(t)}{B_0} \right) \quad (2)$$

This procedure enables to measure an average time-dependent angular strain in response to the magnetic torque applied. The MTC method covers an intermediate range of maximum cellular deformation (bead rotation angles: 15°-60°) and, due to the large number of probing

beads, provides homogenization of the cell response which is of particular interest to characterize a material whose behaviour happens to be nonlinear when stress or strain increases (Ohayon et al., 2004).

Because the applied magnetic torque used in standard MTC measure is roughly a trapezoidal signal (Figures 1 B), the cellular response resembles a creep function which suggests that the CSK behaves as a viscoelastic solid-like (see paragraph 3 and Figure 2). Before describing how to assess the biomechanical parameters characterizing the CSK viscoelastic behaviour, it is necessary to consider the effective stress which differs from the apparent stress depending on the amount of -partial bead immersion (see next paragraph).

2. THE BEAD AS CELL TWISTER AND TRANSDUCER

The cell responds to the bead by a variable degree of endocytosis which depends on cell phenotype. For a given torque, bead displacement in a cell is facilitated when the bead is only partially immersed (Féréol et al., 2008). Calling α the half-angle of the cone limiting the bead contact area and estimating α from 3D-reconstruction of cortical actin images. $\alpha \approx \pi/3$ was measured in alveolar epithelial cell lines (A549) (Ohayon et al., 2004), $\alpha \approx 2\pi/3$ in alveolar macrophages (Féréol et al., 2006), $\alpha \approx \pi$ in human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMVECs) (Wang et al., 2012). The electron microscopic image of a similar bead attached to a Smooth Muscle Cell (SMC) (Fabry et al., 2003) reveals indeed much smaller angles of bead immersion: $\alpha \leq \pi/12$.

Static elasticity theory in continuous medium can be used to determine the role of α in the determination of the measured Young elastic modulus (E) of a cellular medium (Laurent et al., 2002b). When the bead is in equilibrium between the magnetic torque (Equation 1) and a reacting elastic torque C_e , the following relationships can be obtained:

$C_e = -(8/3)\pi R^3 E \theta_{eq}$ for full immersion of bead in infinite medium ($\alpha = \pi$),

$C_e = -(4/3)\pi R^3 E \theta_{eq}$ for half immersion of bead, ($\alpha = \pi/2$), $C_e = -(4/3)\pi R^3 (\sin^3\alpha)E \theta_{eq}$

for a small circular contact area $\alpha \leq \pi/6$. These analytical expressions explain for instance why, for the same stress applied through different-sized magnetic beads (e.g., 4.5- μm vs 1.4- μm diameter), larger beads appeared more resistant to rotation than smaller beads, i.e., leading to the appearance of stiffer cellular medium, a property which could be experimentally verified (Wang and Ingber, 1994). Half-immersion corresponds to the standard definition of apparent elastic modulus used in several early studies (Planus et al., 1999; Pourati et al., 1998;

Wang, 1998), i.e., $E_{app} = \frac{C_e}{V_{bead} \theta_{eq}}$, in which $\frac{C_e}{V_{bead}}$ ($= \sigma_{app.}$) represents the overall “apparent”

stress exerted on the cell in case of half bead immersion. In such a case, the stress exerted to the cell through a bead of volume $\sim 50 \text{ cm}^3$ would be in between 8 and 24 Pa for the range of magnetic torques indicated above. For bead immersions differing from half, (e.g., $\alpha \approx 108^\circ$ in alveolar macrophages, $\alpha \leq 37^\circ$ in smooth muscle cells (Féréol et al., 2008)), the apparent cellular stress (or apparent Young elastic modulus) has to be corrected by a factor κ such that:

$\kappa = \frac{\sigma_{app}}{\sigma_{cell}} = \frac{E_{app}}{E_{cell}}$, which can also be estimated numerically (Ohayon et al., 2004). κ ranges

from values below 0.1 at low bead immersion to values approaching 2 for complete bead immersion. The latter could advantageously be characterized prior to MTC experiments using 3D-reconstructions of the bead-cell structure since it depends on cell type (Féréol et al., 2008). The discrepancy between apparent and corrected elastic properties is therefore maximal for the smallest bead immersions. This is why during MTC experiments, the effective cellular stresses would most likely stay in a larger range such as 8-200 Pa. In addition to the bead immersion angle α , cellular height and substrate properties which act as boundary conditions of the bead-cell system may also influence the torque-bead displacement

relationships (Ohayon and Tracqui, 2005), e.g., substrate properties might influence the 4.5 μm -microbead deviation for cell height below 7-8 μm (Féréol et al., 2006).

3. MICRORHEOLOGICAL VISCOELASTIC MODELS (Figure 2)

The microrheological response of living cells locally twisted by ferromagnetic microbeads, i.e., transiently exposed for 1 mn to a stress (σ) and then relaxed, can be described in the course of time by a relationship between strain and stress which takes into account that angular deformation, $\theta(t)$, is caused by the total history of the loading, up to the time t :

$$\theta(t) = f(t)\sigma(0) + \int_0^t f(t-t') \frac{d\sigma}{dt'} dt' \quad (3)$$

$f(t)$ is the creep function, (i.e., the strain generated by a step stress, normalized by a constant stress value).

Three types of microrheological models of cellular response were tested:

- (i) The viscoelastic solid made of a single Voigt model:

$$f(t) = \frac{1}{E} + \frac{t}{\eta} \quad (4)$$

E and η are the elastic modulus (or cellular stiffness) and viscosity (or frictional) modulus respectively, characterizing the response of a viscoelastic solid with a unique relaxation time

constant: $\tau = \frac{\eta}{E}$

- (ii) The viscoelastic solid made of a double Voigt model:

$$f(t) = \frac{1}{E_1} + \frac{t}{\eta_1} + \frac{1}{E_2} + \frac{t}{\eta_2} \quad (5)$$

E_1 , η_1 or E_2 , η_2 are the elastic modulus (or cellular stiffness) and the viscosity (or frictional) modulus of the two components characterizing the viscoelastic solid response of a series of rapid and slow elements with respectively fast and slow relaxation time constants:

$$\tau_1 = \frac{\eta_1}{E_1} \text{ and } \tau_2 = \frac{\eta_2}{E_2} \text{ with, e.g., } \tau_1 < \tau_2.$$

The two elementary viscoelastic models above consider cell elastic behaviour linear within a given MTC experiment, i.e., for a given loading level. However, MTC experiments performed at different loading levels may reveal a stress-dependent behaviour of cellular stiffness which was explained by different mechanisms at the cellular scale, e.g., structural effects of the tensegrity type (Wendling et al., 1999), hyperelasticity of the cell material (Ohayon et al., 2004), or other mechanisms at the nanometer scale in relation with molecular actomyosin motors (Cai et al., 1998; Mizuno et al., 2007).

(iii) The time-invariant power law:

It is assumed here that $f(t)$ behaves as a power law of time:

$$f(t) = A t^\alpha \tag{6}$$

From the parameters of the power law, i.e., the exponent α and the prefactor A, it is also possible to calculate G_0 , or elasticity modulus at 1 Hz, and thereby the corresponding elasticity modulus $E \approx 3 G_0$ (assuming an incompressible cellular medium) from:

$$G_0 = \frac{(2\pi)^\alpha}{A \Gamma(1+\alpha)} \tag{7}$$

where $\Gamma(1+\alpha) = \int_0^{+\infty} \exp(-x) x^\alpha dx$ is the Gamma Euler function.

Equations 4-6 represent the most frequent rheological models used to fit living cell data. An example of application obtained in Human Pulmonary Microvascular Cells (HPMECs) is shown in Figure 2.

The single Voigt model was used in early MTC experiments (Wang et al., 1993) and remains of interest because it assesses the CSK structure as a tensegrity structure, whose solid-like properties have already been demonstrated (Wendling et al., 1999). A unique viscoelastic component has also been useful to demonstrate the CSK specificity of the MTC technique using a drug (e.g., the cytochalasin D which disrupts the actin CSK) leading to drastic (~50%) decrease in cell stiffness (Wang et al., 1993). The fundamental role of transmembrane receptors of the integrin type in the mechanotransduction across the cell membrane was demonstrated using the same single Voigt model. To do so, the cell stiffness, measured in living capillary endothelial cells using beads coated with integrin ligand (RGD), was compared to that obtained from control transmembrane metabolic acetylated low density lipoprotein (AcLDL) receptors (Wang et al., 1993; Wang and Ingber, 1994).

The double Voigt model was proposed to distinguish two major CSK structures, i.e., the cortical and the deep CSK components which respectively exhibit soft and stiff mechanical behaviors (Laurent et al., 2003). Such biological specificity of each component was demonstrated by treating or not tissue cells with cytochalasin D. For instance, the slow and stiff CSK compartment revealed the highest sensitivity to cytochalasin D treatment, consistently with the presumed highly polymerized nature of the deep CSK.

The power law model takes into account the fact that the intracellular medium exhibits a unique and weak power law behaviour if the frequency range is limited, (e.g., 5 Hz in Maksym et al. study (Maksym et al., 2000), 10^{-1} - 10^2 Hz in Trepate et al. (Trepate et al., 2004); 10^{-2} - 10^2 Hz in Fabry et al. (Fabry et al., 2003)). It has already been shown that the creep function may be described by a weak power law of elapsed time (Desprat et al., 2005;

Lenormand et al., 2007). These authors have considered that cells behave like out-of-equilibrium and disordered systems in which multiscale structural rearrangements dominate through dynamic cross-linking, actin polymerization, and molecular motor activity. There are numerous examples in the literature of complex viscoelastic systems showing that rheological behaviours are time scale invariant, e.g., colloidal systems close to sol/gel transition (Ponton et al., 2002), and “soft glassy materials” including foams, pastes, emulsions (Weeks et al., 2000). According to these approaches, phenomena are supposed to occur at a multitude of length scales, i.e., from the short individual actin filaments size to the long actin bundles (or stress fibers) organized at cell size (Ingber, 2008b). Thus, characteristic time constants are multiple τ_i as if the cell structure was composed of an infinite series of Voigt elements with self-similar structures (Balland et al., 2006). These structures would be distributed according to the ideal power law: $\tau_i = \tau_m i^{\left(\frac{-1}{1-\alpha}\right)}$ (where τ_m represents the largest relaxation time in the cell), and the resulting creep function follows a weak power law of time. Although a series of elementary Voigt units may appear oversimplified to take into account active molecular mechanisms or filament remodelling, the various relaxation times associated with each viscoelastic unit can be considered to represent the storage and dissipation of elastic energy in actin filaments, bundles and stress fibers. Dissipation itself may include several processes, such as CSK remodeling, molecular motor activity, and passive viscosity (Balland et al., 2006). Compared to single or double element viscoelastic solid-like models treated above, it appears that power law rheology is susceptible, due to its wide spectrum of characteristic times and length, to reveal some of the hidden molecular aspects which could not be catch by the two elementary viscoelastic models above.

Stamenovic et al. (Stamenovic et al., 2007) demonstrated that there is no need to invoke structural disorder/metastability to exhibit anomalous rheology in living cells. Using a broader range of frequencies, i.e., 10^{-3} - 10^4 Hz, they found that CSK dynamics is not time scale

invariant but exhibit two power laws with a transition zone which can be explained by the nonequilibrium-to-near-equilibrium transition between protein-protein noncovalent interactions (Chowdhury et al., 2008). Based on microrheological models, it appears that MTC measurements on living cells most likely contain key molecular information but the challenge remains to find how to catch the hidden biological information and how to relate the new parameters obtained to the cellular/molecular structure.

4. ASSESSMENT OF MECHANICAL AND ADHESION PROPERTIES FROM TRANSIENT MTC LOADING

The imperfect recovery of the cellular deformation after transient MTC loading $\theta_{NR}(t)$ represents a significant proportion of the measured bead rotation $\theta(t)$ (usually between 10% and 30% of $\theta(t)$, depending on cell type and experimental conditions, see Equation 8 below). Non reversible phenomena have been largely under considered in the past (see for instance the review on cell mechanics tools by Lele et al. (Lele et al., 2007)). By contrast, the recoverable component of cellular deformation $\theta_R(t)$ contains the information on the mechanical response of twisted cells from which mechanical properties can be extracted.

The basic idea of the present approach is to consider that the non recovered bead rotation component $\theta_{NR}(t)$ contains key information on cellular adhesion that remains to be explored (Figures 2). To do so, we need to review molecular adhesion models (see next paragraph). Previously, the non recovered bead rotation component $\theta_{NR}(t)$ was attributed to some cellular remodeling process that was supposed to be independent from the mechanical process. Indeed, the so-called “permanent deformation” reported during MTC (Wang, 1998;

Wang and Ingber, 1994) was actually related to a post-loading cellular damage. By contrast, we presently consider that the non recovered bead rotation component $\theta_{NR}(t)$ actually reflects two phenomena which are related to cellular adhesion (see Equation 9): (1) a time-dependent sliding effect represented here by a sliding angular component $\theta_s(t)$ which is due to partial de-adhesion occurring primarily at the onset of loading and, in a much less extent, during the 1 mn of sustained loading application, (2) a time-independent sliding component θ_s^0 , reflecting the few percent of surface adhesion sites that instantaneously dissociate at the beginning of loading because they failed to form effective attachments with the CSK. Therefore:

$$\theta(t) = \theta_R(t) + \theta_{NR}(t) \quad (8)$$

$$\theta_{NR}(t) = \theta_s(t) + \theta_s^0 \quad (9)$$

Note however that $\theta(t)$ is calculated from a modified Equation 2, i.e., Equation 10, which takes into account the immediate sliding component θ_s^0 associated to a percentage “ x ” of free rotating beads (Fabry et al., 1999):

$$\theta(t) - \theta_s^0 = \arccos\left(\frac{B(t)}{B_0(1-x)}\right) \quad (10)$$

“ x ” can be seen as the percentage of slip bonds present in a given cell culture (usually less than 5%).

The time-dependent signal of MTC can be indifferently represented in terms of bead deviation angle $\theta(t)$ (Equation 10) or in terms of remanent magnetic moment $B(t)$ (as in Figure 2) using the reciprocal expression of Equation 10:

$$B(t) = B_0(1-x)\cos(\theta(t) - \theta_s^0) \quad (11)$$

The solutions for the 3 viscoelastic solid-like models are integrated in a more general model which takes into account mechanical and adhesion properties from the time-dependent

recoverable and unrecoverable components of the MTC signal. To simplify, their expression is given below for a constant loading stress noted σ_0 .

For the viscoelastic solid-like model made of a single Voigt model:

$$\theta(t) = \frac{\sigma_0}{E} \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right) + \theta_{NR}(t) \quad (12)$$

For the viscoelastic solid-like model made of a double Voigt model:

$$\theta(t) = \frac{\sigma_0}{E_1} \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) \right) + \frac{\sigma_0}{E_2} \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) \right) + \theta_{NR}(t) \quad (13)$$

For the time-invariant power law model:

$$\theta(t) = \sigma_0 A t^\alpha + \theta_{NR}(t) \quad (14)$$

Figure 2 shows that these 3 rheological models provide satisfactorily curve fittings here in the case of data obtained in a given living cell culture of tissue cells (HPMVECs).

5. MOLECULAR ADHESION MODELS (Figure 3)

The strength of molecular links created between the beads and the cell is of particular interest for the MTC technique because these interfacial links (e.g., the transmembrane integrin receptors bound to the synthetic RGD-ligand covering the beads) transmit to the cell structure the mechanical loading generated by MTC (Wang et al., 1993) (Figure 3 A). A general concept applied herein is to consider that the strength of molecular attachment to a cell membrane receptor is determined by the weakest component of the complex, i.e., the ligand-receptor bond or anchorage of the receptor to the membrane (Evans and Ritchie, 1994). Noteworthy, the step loading signal used in standard MTC experiments is a succession of force-ramp and force-clamp maneuvers (Figure 1 B), now the reference method for the characterization of “weak” interfacial interactions (Evans and Kinoshita, 2007). For similar

reasons, we can assume that any defect in bead-cell adhesion would be responsible for partial detachment of pre-existing bonds created after a short period of bead incubation. In the improved version of the MTC technique presently described, we postulate that the amount of sliding measurable between the bead and the cell after a first twist could contain some key information on the kinetics of bead-cell attachment and thus reveal some hidden aspects of cellular adhesion. This “sliding effect” has often been reported in micromanipulation experiments in which transient loadings are applied but its analysis went never beyond a hypothetical plastic permanent deformation of unclear origin (Lele et al., 2007; Wang, 1998). Our goal is to apply an up-to-date theory of bond dissociation to reveal some hidden aspects of the cellular response to transient loadings and describe by appropriate bond detachment models, the kinetic parameters of the receptor-ligand unbinding.

Molecular adhesion at surfaces is governed by - essentially reversible - non covalent interactions between large molecules (Evans, 2001). Unlike intimate covalent bonds which are strong intramolecular bonds, non covalent intermolecular bonds are weak by nature and thus have limited lifetimes (Evans, 1998). They actually must work together to have a significant effect, combined bond strength being much greater than the sum of individual bonds (Evans, 2001; Isabey et al., 2013; Williams, 2003). Dynamic force spectroscopy is the reference method allowing to characterize experimentally the complexity of molecular interactions between receptor and ligand bonds (Evans and Ritchie, 1997). For instance, by measuring the rupture force at different force regimes, the various barriers of the potential energy profile can be revealed (Evans, 1998). In the isolated bond under zero force, thermal fluctuations cause spontaneous dissociation and re-association after a time t_{off}^0 representing the natural lifetime which may widely vary, e.g., from a few seconds in selectin bonds (Evans et al., 2001; Fritz et al., 1998) to a few hours for antigen-antibody interaction (Hinterdorfer et al., 1996; Schwesinger et al., 2000), and even several days for biotin-streptavidine (Chilkoti

and Stayton, 1995). In other words, for time scales above t_{off}^0 , there is no need of force to break receptor-ligand bond because the low thermal energy level $k_B T$ ($\approx 4.1 \text{ pN} \cdot \text{nm}$) is sufficient to overcome the energy barrier (E_b) which separates the bound state from the unbound state (Figure 3 B). k_B is the Boltzman constant and T the absolute temperature. Spontaneous dissociation of a bond can be characterized by the dissociation rate at zero force k_{off}^0 issued from the diffusion theory of a Brownian particle across an energetic barrier in a viscous environment (Hänggi et al., 1990; Kramers, 1940).

$$k_{off}^0 = \frac{1}{t_{off}^0} = \frac{1}{t_D} \cdot \exp\left(\frac{-E_b}{k_B T}\right) \quad (15)$$

E_b is the intermolecular chemical potential or initial barrier height. The exponential dependence of the dissociation rate at zero force results in huge variations in the kinetics of dissociation which in liquids starts from the highly elevated dissociation frequencies of $k_{off}^0 \sim t_D^{-1} \approx 10^9 - 10^{10} \text{ s}^{-1}$ (t_D being the ultrafast Brownian diffusion time) at $E_b = 1 k_B T$ to decrease at $k_{off}^0 \sim 10^0 \text{ s}^{-1}$ at $E_b = 21 k_B T$ and even the incredibly slow $k_{off}^0 \sim 1/(40 \text{ years})$ for barriers heights as high as: $E_b = 42 k_B T$ (Evans, 2001).

Bonds stretched with forces resist detachment on time scales below t_{off}^0 . The rupture forces which reflect the thermally activated kinetics can be classically obtained by ultrasensitive probes with high resolution detection such as AFM (Florin et al., 1994). The intuitive effect of force on bonds is to lower the barriers of the energy landscape (see Figure 3 B), thus facilitating the transition (TS) from the bond state to the unbound state as described by the single bond lifetime decrease, earlier predicted by Bell (Bell, 1978):

$$k_{off}(f) = k_{off}^0 \cdot \exp\left(\frac{f}{f_\beta}\right) \quad (16)$$

f_β is a characteristic force related to thermal energy. Assuming that the kinetic transition is dominated by the shape and height of the energy barrier, some authors have proposed a generic expression of the dissociation rate under force which is based on a solid physical background issued from Kramer' theory (Evans and Ritchie, 1997):

$$k_{off}(f) = t_{off}^{-1}(f) = k_{off}^0 \cdot g\left(\frac{f \cdot x_\beta}{k_B T}\right) \cdot \exp\left(\frac{f \cdot x_\beta}{k_B T}\right) \quad (17)$$

$f \cdot x_\beta$ represents the mechanical energy calculated in the direction of the applied force for an interaction distance x_β at which the transition state is presumably observed (see Figure 3 B). This disjoining potential represents the reduction in height of the energy landscape. The distance x_β provides a reference force scale f_β :

$$\frac{k_B T}{x_\beta} = f_\beta \quad (18)$$

f_β represents the amount of force to exert on a bond capable to decrease the energy barrier by $k_B T$, thus producing an increase in the dissociation rate by a factor 2.7. Typical values of these reference parameters are $x_\beta \leq 1 \text{ nm}$ ($=10^{-9} \text{ m}$) and $f_\beta \approx 10 \text{ pN}$ ($1 \text{ pN}=10^{-12} \text{ N}$), e.g., for an integrin-VCAM bond at the biological temperatures: $x_\beta \approx 0.30 \text{ nm}$, $f_\beta \approx 13 \text{ pN}$, $k_{off}^0 \approx 0.8 \text{ s}^{-1}$ (Evans and Kinoshita, 2007). The function $g(f/f_\beta)$ takes into account the force-induced modification of the shape of the energy landscape. For sharp energy barriers, forces application is supposed not to affect the shape of the energy barrier and the position of the kinetic transition, therefore $g(f/f_\beta) \approx 1$ (Evans and Ritchie, 1997). In such a case, the distance between transition states with and without force applied is negligible, i.e., $\Delta x_\beta \approx 0$ (Figure 3 B). For more complex energy barriers, the dimensionless functions: $g(f/f_\beta)$ determine the force-driven amplification of the kinetic properties of the bond. For non-

cooperative bonds working as a zipper, $g(f/f_\beta) \approx \frac{1}{N}$ meaning that g is independent of the force but is inversely proportional to the number of zipper bonds (Isabey et al., 2013; Williams, 2003). The leading bond receives the totality of the force applied until failure, then force is transferred to the next bond and so on. While force scale of the collective zipper bond is unchanged compared to force scale of the single bond, the dissociation rate of N non-cooperative bonds in a zipper-like configuration is N times smaller than the dissociation rate of a single bond.

During bead twisting experiments (MTC), shear deformation dominates and remains at μm -scale at or near the bead surface (Ohayon et al., 2004) meaning that the zipper bond configuration seems the most appropriate. Moreover, we can neglect force rebinding because displacements are significant and, far from equilibrium (NS in Figure 3 B), the rate of rebinding decreases exponentially and tends toward zero (Williams, 2003).

To describe the unbinding phase during MTC experiments, we propose to use a generalized form of Bell's equation which is still consistent with Kramer's results:

$$K_{off}(f) = K_{off}^0 \cdot \exp\left(\frac{f}{f_\beta}\right) \quad \text{with} \quad K_{off}^0 = \frac{k_{off}^0}{N} \quad (19)$$

Equation 19 summarizes the most common understanding previously described by Equations 16 and 17 which is to consider that mechanical force applied to a bond tends to shorten its lifetime. Similarly, the form of the dissociation rate given by Equation 19 reflects the solution of a first order kinetic equation which describes the probability $P(t)$ that a collective bond will survive in the bound state:

$$\frac{dP(t)}{dt} = -K_{off}(f) \cdot P(t) \quad \text{with} \quad P(t) = \exp\left\{-\int_0^t K_{off}(f) dt'\right\} \quad (20)$$

Noteworthy, during MTC experiments, the probability to survive $P(t)$ or complementarily the probability to dissociate $(1 - P(t))$ can be simply related to the time-dependent sliding angle $\theta_s(t)$ (Equations 8 and 9) by the following equivalence:

$$\theta_s(t) \equiv \frac{\pi}{2}(1 - P(t)) \quad (21)$$

As classically suggested (Evans and Kinoshita, 2007), we can consider two elementary cases of force-dependence which advantageously correspond to the actual experimental conditions used during MTC (Figure 4): (1) a sustained force loading during 1 mn of magnetic torque application (called force-clamp period), in between two (2) linear time-dependent force-loading (~ 400 ms) (called force-ramp periods). Importantly, these 2 particular loadings enable deducing the dissociation rate at zero force K_{off}^0 and the reference force f_β .

In the force clamp period, the probability of bond survival decays as a single exponential with time t which requires a unique (i.e., time-independent) dissociation rate to be characterized:

$$P(t) = \exp[-K_{off}(f_{cste}) \cdot t] = \exp\left[-K_{off}^0 \cdot \exp\left(\frac{f_{cste}}{f_\beta}\right) \cdot t\right] \quad (22)$$

Equation 22 indicates that by measuring the statistics of bond failure at different force levels,

i.e., the ratio between the number of bonds $\frac{N(t)}{N_{tot}}$ existing at instant t and the number of bonds

before torque application, it is possible to assess the mean dissociation rate or mean lifetime,

$T_{off}(f = cste) = \frac{1}{K_{off}(f = cste)}$, from the (constant) slope of the above relationship (Evans and

Kinoshita, 2007). During MTC experiments, the unrecoverable component of angular bead deviation called “sliding angle” can be estimated and related to the statistics of bond

detachment (see Figure 4 and below) during force clamp but also during the force ramp as shown below.

In the force-ramp periods, i.e., $df/dt = r_f = cste$, the probability of bond survival (or distribution of lifetime) is no longer a single exponential decay function with time but reveals a loading rate-dependent decay such that its time-scale is dramatically reduced with each order of magnitude increase in ramp rate (Evans and Ritchie, 1997; Thomas et al., 2008).

$$P(t) = \exp \left[- \frac{K_{off}^0 \cdot f_{\beta}}{r_f} \left(\exp \left(\frac{r_f t}{N f_{\beta}} \right) - 1 \right) \right] \quad (23)$$

A characteristic scale for ramp rate $r_f^0 (= K_{off}^0 \cdot f_{\beta})$ can be deduced from kinetic parameters governing bond dissociation (Equation 19). r_f^0 defines the loading speed above which the bond, driven by force “far from equilibrium”, dissociates much faster than its apparent lifetime T_{off}^0 and thus resists force. Using Equation 20, it is possible to calculate the most probable dissociation rate K_{off}^* from the maximum value of the time-derivative of $P(t)$ (Equation 23). This value is related to the most probable rupture force F^* by the following expression (Evans and Calderwood, 2007):

$$\frac{1}{K_{off}^*} = \frac{F^*}{r_f} (= T_{off}^*). \quad (25)$$

T_{off}^* is the most probable lifetime. So, the likelihood of bond lifetime T_{off}^* and the likelihood of rupture forces F^* are closely related through the kinetic theory of bond failure. The two parameters consistently depend on r_f , K_{off}^0 , and f_{β} .

During MTC experiments, the most probable lifetime or rupture force could not be attained because the maximal value of the derivative of $P(t)$ is never attained within 1 mn of experiment. However, subcritical levels of mean rupture force are sufficient to access to a partial but significant range of lifetime distribution which enables to deduce some key

parameters of adhesion kinetics, namely K_{off}^0 and f_{β} . Note that if r_f could not easily be changed by order of magnitudes during MTC experiments, other parameters such as N , K_{off}^0 and f_{β} could more easily vary with experimental conditions.

6. APPLICATIONS OF MTC TO CHARACTERIZE THE LIVING CELL RESPONSE (Figure 5)

To illustrate the capability of MTC technique to characterize the short and long term responses of stressed living cells, we present below the results obtained in HPMECs, stimulated or not by sustained twisting of RGD-coated beads (Wang et al., 2012). We remind that in the pioneering study of Wang et al. (Wang et al., 1993), capillary endothelial cells, plated on fibronectin-coated bacteriological plastic were used to demonstrate the advantages of RGD-coated magnetic beads to assay both mechanotransduction pathways and mechanical properties of the CSK. Since that time, MTC technique has permitted to test different types of transmembrane adhesion receptors, including various types of integrins, cadherins, selectins, ICAM-1, and urokinase receptors looking at their ability to support transmembrane mechanical coupling to the CSK (Planus et al., 2005; Potard et al., 1997; Wang and Ingber, 1995; Yoshida et al., 1996). A key criteria in testing surface receptors with MTC is the link with the CSK permitted by RGD ligands or anti-integrin antibodies, while transmembrane receptors which do not physically link the internal CSK such as metabolic receptors, growth factor receptors, or histocompatibility antigens failed to exhibit resistance to angular rotation and thereby measured negligible stiffness (Wang et al., 1993; Yoshida et al., 1996). Another way to demonstrate the specific role of the CSK in the cellular response to bead twisting is to use pharmacological drugs or genetic knock out techniques that specifically alter one or several of the three cytoskeletal filament networks, i.e., actin filaments, microtubules, and

intermediate filaments (Wang, 1998; Wang et al., 1993). These results have also shown that actin filament network was found to play a major role in the cell resistance to stress. Coupling MTC with signal transduction experiments enabled to reveal new molecular pathways of cellular mechanotransduction, e.g., the mechanical activation of gene transcription driven by the alteration of the cyclic AMP signaling cascade (Meyer et al., 2000) or the regulation of endothelin-1 gene expression in a prestress-dependent manner (Chen et al., 2001). In spite of the strength of MTC which initially was to reveal such sophisticated molecular features proper to cell function, kinetic adhesion parameters have never been explicitly derived from MTC experiments (Zhu et al., 2000) while the basic idea of MTC was precisely to assess ligand-receptor and/or receptor-CSK physical linkages (Wang et al., 1993).

Figure 5 illustrates the new knowledge gained by the MTC technique while both mechanical and adhesion properties are extracted from the living cell response signal, i.e., HPMECs mechanically unstressed or stressed during 2 hours of sustained cyclic twisting. We specifically compared the results obtained with the viscoelastic solid-like model and a double Voigt component combined with empirical (Figure 5 A, C, E) or theoretical (Figure 5 B, D, F) models of de-adhesion. The empirically-based model of de-adhesion considers the partial sliding between bead and cell, i.e., de-adhesion process at cell-scale, while the theoretically-based model integrates adhesion kinetics, i.e., de-adhesion process at molecular-scale.

The main messages that can be drawn from these MTC results are summarized below:

- The 3 microrheological models tested (see paragraphs 3, 4 and Figure 2) combined either with the empirical or theoretical de-adhesion models (see paragraphs 4, 5 and Figure 4) provide a satisfactorily curve fitting of the raw MTC data with correlation coefficient above 0.95. This means that the cell response to transient bead twisting is not exclusive of a given model and contains a rich panel of biomechanical information including mechanical properties of CSK and kinetic parameters of molecular linkages at cell surface.

- The cortical and deep CSK components exhibit viscoelastic time constants which differ by almost 2 orders of magnitude (Figure 5 A-D). The cortical CSK component is, as expected, faster than the deep CSK component, (i.e., τ_1 varies from 1 s to 0.4 s while τ_2 varies from less than 100 s to 40 s) (Laurent et al., 2003). Both time constants consistently fall in the experimental range of the transient MTC signal within 1 mn or less. The longer relaxation time constants characterizing the deep CSK component suggest characteristic elements of longer size by contrast to the shorter relaxation times constant that can be associated to the short interconnected filaments characterizing the cortical CSK (Balland et al., 2006).

- Stimulated cells exhibit significant decreases in τ_1 and τ_2 (Figure A-D) which are either due to a significant decrease in friction modulus (for τ_1) or a significant increase in elastic modulus (for τ_2) (results not presented). These changes in mechanical properties are consistent and quantify the remodeling of actin network through a stress fiber reinforcement observed in response to mechanical stimulation (Wang et al., 2012). Treatment by an actomyosin blocker such as ML9, i.e., an inhibitor of Myosin Light Chain Kinase (MLCK), enables to counterbalance only partially the effect of mechanical stimulation on the evolution of CSK mechanical properties. MLCK has already been found to play an important role in the chemically-induced endothelial dysfunction (Tinsley et al., 2000) but this signaling pathway is most likely not unique.

- We observed a satisfactorily curve fitting provided by the time-invariant power law model (presently tested in combination with the adhesion model but results are not presented herein). This model led to rather low values of the exponent α ($= [0.12-0.08]$) which is consistent with the weak power dependence characterizing living cells (Chowdhury et al., 2008; Fabry et al., 2003; Puig-de-Morales et al., 2004). These values are at the bottom of the range of α -values currently measured in a variety of living cells, i.e., α ($= [0.15-0.35]$)

(Alcaraz et al., 2003; Balland et al., 2006; Féréol et al., 2008; Trepas et al., 2004). These results confirm that living cells stay mostly on the solid-like side of the transition solid-fluid (Fabry et al., 2003; Janmey and McCulloch, 2007). Importantly, the power law model (Equation 6) which associates a large number of elementary solid Voigt units in series and therefore covers a wide range of time scales of the cytoskeletal network (Balland et al., 2006; Stamenovic et al., 2007) might account for a part of molecular phenomena which are, in the presently described approach, taken into account by the adhesion model (Equations 14 and 21). These two models could therefore describe with some redundancy molecular phenomena. By contrast, the longer time constants, well taken into account by the two elementary solid-like models represent phenomena closer to the cell scale which do not need such a wide number of time constants to be described.

- The maximum value of the sliding angular component, θ_s , is normally attained at the instant of maximum stress, i.e., right after the initial ramp of loading (Figure 4). This parameter reflects the maximal state of de-adhesion which is significantly decreased after mechanical stimulation (empirical cell-scale model, Figure 5 E). The theoretical model at molecular scale (Figure 5 F) reveals a significant decrease in K_{off}^0 , i.e., from 0.001 s^{-1} to 0.0005 s^{-1} which suggests that the number of non-cooperative integrins acting at the cell-bead interface may have been doubled in response to mechanical stimulation (Equation 19). Incidentally, the reference force f_β was found unchanged by mechanical stimulation suggesting that the shape of the overall energy function was not deeply modified. Such change in K_{off}^0 from non stimulated to stimulated HPMECs appears consistent with biological observations performed in the same cell culture after stimulation by mechanical stress (Wang et al., 2012): integrin staining and more precisely $\alpha_v\beta_3$ integrins revealed clustering of $\alpha_v\beta_3$ integrins and relocalization at the cell-matrix interface, i.e., near basal face. We can

consider that the bead is “sensed” by the cell as a localized extracellular matrix and, thereby, the cell attachment to the matrix coating the bead reveals the overall cellular response to extracellular matrix.

- Comparing the basal values of K_{off}^0 ($= 0.001 \text{ s}^{-1}$) with the unstressed dissociation rates reported in the literature for single bonds implicating integrin, (e.g., $k_{off}^0 \sim 0.13 \text{ s}^{-1}$ for fibronectin binding (Li et al., 2003) or $k_{off}^0 \sim 1.1 \text{ s}^{-1}$ for VCAM-1 binding (Zhang et al., 2004)), the average number of integrins effectively linked to the bead ligand and CSK would be in the range $N = 130-1100$. For a bead surface of about $64 \mu\text{m}^2$ (bead diameter: $4.5 \mu\text{m}$), previous considerations lead to a reasonable bond density located in the range 2 - 34 integrins/ μm^2 , assuming bead immersion in the cytoplasm varying from full to half bead surface.

On the whole, the significant decrease in viscoelastic time constants can be seen as reflecting an increase in intracellular tension in HPMECs induced by the mechanical stimulation. Cell stimulation indeed results in reinforcement of cell-matrix interactions and a weakening of cell-cell junctions such as the cadherin-cadherin CSK-related bonds. The functional consequence is an increase in permeability of HPMEC monolayer suggested by an increase in the leakage measured by fluorescent marker (dextran) (Wang et al., 2012).

7. SOME REMARKABLE FEATURES OF MTC

The simultaneous characterization of mechanical and adhesive properties in living cells is rendered possible during MTC because cells create firm attachment to the beads while the bead-cell system fails to recover its initial position. The firm CSK attachment has been largely demonstrated since the very first MTC studies (Wang et al., 1993; Wang and Ingber, 1994)

and bead coating for mechanoreceptors physically related to the CSK constitutes a key feature of the MTC method which has been thoroughly reviewed (Hoffman and Crocker, 2009). By contrast, the partial remodeling of the bead-cell attachment during twisting has been largely ignored and attributed to some plastic CSK deformation with no relation to interfacial molecular structure (Lele et al., 2007). Two biological factors are important for bead attachment to the CSK through actin CSK formation and strengthening of bead attachment permitting for instance rearward translocation: (1) integrin assembly called “clustering” of the integrins and (2) ligand binding (Choquet et al., 1997; Felsenfeld et al., 1996). Translocation of beads coated with FN7-10 at first form a relatively weak attachment to the CSK, and they can be pulled off by a modest force using a laser trap (Choquet et al., 1997). Such a situation resembles that encountered during MTC while bonds are submitted to the initial ramp of loading. It explains why, in presently reported cell experiments, maximum bond detachment was found at the onset of bead twisting. However, when beads were subjected to a sustained force of 10 s -duration or more, the cell forms actin CSK upon bead contact and increases the bond strength (Choquet et al., 1997). Such reinforcement most likely occurs in the course of 1 mn of MTC loading. It is clearly exacerbated but not so much after 2 hours of cyclic twisting performed through the same beads as shown in HPMECs (Wang et al., 2012). CSK recruitment may be related to the findings that when FN-coated beads are placed in contact with a cell, they induced formation of an actin CSK immediately underneath the point of bead binding (Miyamoto et al., 1995a; Miyamoto et al., 1995b).

Another remarkable feature of MTC is that the effective stress exerted by the bead to the cell, i.e., 8 - 200 Pa ($1 \text{ Pa} = 1 \text{ pN}/\mu\text{m}^2$), remains in the physiological range of maximal stress, e.g., $\sim 1,000\text{-}2,000 \text{ Pa}$, that a cell can exert through a given focal adhesion site (Munevar et al., 2001; Oliver et al., 1999). Therefore, each integrin whose number varies from 2 to 34 per μm^2 on the twisted bead would contribute to a reasonable value of force

generated varying from 4 to 6 pN during MTC which is not so above forces generated by myosin II motors (Ishijima et al., 1994; Molloy et al., 1995). These estimates of the force generated per bond or of the dissociation rate belong to the deterministic approach which consists in finding mean values of parameters while small scale phenomena are probabilistic and thus lack of definitive values (Zhu et al., 2000). Due to their stochastic nature inherent to the chemistry of receptor-ligand, experiments with small number of bonds per cell must be treated by probabilistic theory for kinetics of small systems (Cozens-Roberts et al., 1990; Hoffman and Crocker, 2009). MTC method included an averaging procedure which is actually integrated in the measurement of the remanent magnetic field, thus reflecting an averaged behavior over the entire bead and cell populations. MTC analysis works indeed as if cellular and molecular behaviors were assessed from the averaged behavior of thousand beads (e.g., 100,000 beads and 50,000 cells in each culture). Thus, by principle, parameters measured by MTC are the result of homogenization process (Ohayon et al., 2004) which provides a deterministic estimation of more complex stochastic processes definitely occurring while forces are generated and transmitted in and out the CSK [Raupach, 2007 #147].

Another important feature of the cell response to bead twisting is the stress or strain hardening observed mainly in tissue cells and to a lesser extent in less tensed inflammatory cells (Féréol et al., 2008). Bead twisting resulted in significant surface cell deformations, (i.e., 15°-60° corresponding to 500 nm-2500 nm surface displacements) which, in highly structured tissue cells, produced long distance deformations contributing to this reported stress-dependent increase in stiffness. Coupling MTC with traction force microscopy and MTC in contractile cells such as human airway smooth muscle (HASM) cells, Wang et al. found that cell stiffness is linearly related to prestress or intracellular tension generated by cytoskeletal actomyosin interactions (Stamenovic, 2005; Wang et al., 2002). These stress-related

mechanical behaviors, i.e., stress hardening and prestress, are mainly consistent with the prediction of cellular tensegrity models (Cañadas et al., 2006; Coughlin and Stamenovic, 1998; Stamenovic and Coughlin, 1999; Wendling et al., 2000). The tensegrity approach may also explain why the cortical CSK structure is less tensed than the deep CSK structure (Laurent et al., 2002a). The structural approach explains why, applying a magnetic torque through integrins, allows to probe the underlying both the 3D-structure of the deep CSK in addition to the 2D-structure of the cell cortex (Laurent et al., 2002a; Laurent et al., 2003).

8. CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

We herein demonstrate that the magnetic bead twisting method (MTC) which applies a transient stress to the integrin-CSK system over a large number of living cells, contains key information on cellular adhesion that can be assessed in addition to mechanical properties. MTC can be advantageously combined with other techniques such as signal transduction experiments or gene transcription activation in order to measure CSK mechanical properties or study the role of cytoskeletal tension in parallel to the evaluation of specific mechanotransduction or signaling pathways (Chen et al., 2001; Hu et al., 2003; Meyer et al., 2000) or to study the cellular response to mechanical stimulation as presently done. Thus, it would be of interest of quantifying cellular adhesion while MTC is combined with other techniques as presently shown for mechanical stimulation.

A major evolution has been done by coupling MTC method with microscopic visualization which is usually made at the single cell level. This is achieved by fabricating a device containing orthogonal Helmholtz coils placed on a microscopic stage. In such a case, twisting forces are applied to many beads on a cell while using optical techniques enables to analyze locally the structure and the biochemical response of beads located in specific

positions on the cell surface or inside the cytoplasm. The coupling between MTC and visualization has been advantageously used (i) to characterize the frequency response with the so-called oscillatory MTC (Fabry et al., 2001), (ii) to explore nanoscale displacements of molecular elements and stress distribution inside the cytoplasm and the nucleus with the so-called 3D magnetic tomography (Hu et al., 2003), (iii) to study mechanical anisotropy of adherent cells spatially probed (Hu et al., 2004).

Bead twisting has become a generic method which permits a wide panel of applications in living cells cultured on 2D substrates. It is however important to mention that future applications of MTC could concern the cellular response in 3D networks, e.g., various collagens or gels of different concentrations and mechanical properties. To our knowledge, such applications have not yet been explored although there is no technical limitation to extend the remanent magnetic field measurements to 3D environments in which cells probed with beads are immersed. *In vivo*, the tissue is a network of three-dimensionally interconnected multivalent ECM ligands, predominantly consisting of a collagen fiber backbone interconnected with fibronectin, hyaluronan, and other components. The vast majority of cellular and subcellular mechanical studies have been performed on cells attached to 2D substrates, whereas less attention has been given to the more physiological, realistic 3D matrix environment. Furthermore, nearly all of these cell rheological studies have focused on gels with high stiffness values ignoring softer substrates while they represent in a more realistic fashion the extracellular *in vivo* condition. MTC applied to living cells in 3D-environments could provide quantitative understanding of intracellular mechanics and interactions with complex and diverse matrices. These questions are also interesting regarding pathology, such as cancer cell invasion since clinical and animal data (Paszek et al., 2005; Samani et al., 2007; Zaman et al., 2006) suggest a correlation between tissue density, cancer aggressiveness, and mechanical factors.

References

- Alcaraz, J., Buscemi, L., Grabulosa, M., Trepas, X., Fabry, B., Farre, R., Navajas, D., 2003. Microrheology of human lung epithelial cells measured by atomic force microscopy. *Biophys J* 84, 2071-2079.
- Balland, M., Desprat, N., Icard, D., Fereol, S., Asnacios, A., Browaeys, J., Henon, S., Gallet, F., 2006. Power laws in microrheology experiments on living cells: Comparative analysis and modeling. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 74, 021911.
- Bell, G.I., 1978. Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science* 200, 618-627.
- Brain, J.D., Bloom, S.B., Valberg, P.A., Gehr, P., 1984. Correlation between the behavior of magnetic iron oxide particles in the lungs of rabbits and phagocytosis. *Exp Lung Res* 6, 115-131.
- Cai, S., Pestic-Dragovich, L., O'Donnell, M.E., Wang, N., Ingber, D., Elson, E., De Lanerolle, P., 1998. Regulation of cytoskeletal mechanics and cell growth by myosin light chain phosphorylation. *Am J Physiol* 275, C1349-1356.
- Cañadas, P., Wendling-Mansuy, S., Isabey, D., 2006. Frequency response of a viscoelastic tensegrity model: Structural rearrangement contribution to cell dynamics. *J Biomech Eng* 128, 487-495.
- Chen, J., Fabry, B., Schiffrin, E.L., Wang, N., 2001. Twisting integrin receptors increases endothelin-1 gene expression in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C1475-1484.
- Chicurel, M.E., Chen, C.S., Ingber, D.E., 1998. Cellular control lies in the balance of forces. *U296* 10, 232-239.
- Chilkoti, A., Stayton, P.S., 1995. Molecular-Origins of the Slow Streptavidin-Biotin Dissociation Kinetics. *Journal of the American Chemical Society* 117, 10622-10628.

- Chiquet, M., Gelman, L., Lutz, R., Maier, S., 2009. From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1793, 911-920.
- Choquet, D., Felsenfeld, D.P., Sheetz, M.P., 1997. Extracellular Matrix Rigidity Causes Strengthening of Integrin-Cytoskeleton Linkages. *Cell* 88, 39-48.
- Chowdhury, F., Na, S., Collin, O., Tay, B., Li, F., Tanaka, T., Leckband, D.E., Wang, N., 2008. Is cell rheology governed by nonequilibrium-to-equilibrium transition of noncovalent bonds? *Biophys J* 95, 5719-5727.
- Cohen, D., 1973. Ferromagnetic contamination in the lungs and other organs of the human body. *Science* 180, 745-748.
- Coughlin, M.F., Stamenovic, D., 1998. A Tensegrity Model of the Cytoskeleton in Spread and Round Cells. *Journal of Biomechanical Engineering* 120, 770-777.
- Cozens-Roberts, C., Lauffenburger, D.A., Quinn, J.A., 1990. Receptor-mediated cell attachment and detachment kinetics. I. Probabilistic model and analysis. *Biophys J* 58, 841-856.
- Crick, F.H.C., Hughes, A.F.W., 1950. The physical properties of cytoplasm. *Experimental Cell Research* 1, 37-80.
- Desprat, N., Richert, A., Simeon, J., Asnacios, A., 2005. Creep function of a single living cell. *Biophys J* 88, 2224-2233.
- Discher, D., Dong, C., Fredberg, J.J., Guilak, F., Ingber, D., Janmey, P., Kamm, R.D., Schmid-Schonbein, G.W., Weinbaum, S., 2009. Biomechanics: cell research and applications for the next decade. *Ann Biomed Eng* 37, 847-859.
- Discher, D.E., Janmey, P., Wang, Y.L., 2005. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* 310, 1139-1143.
- Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., Discher, D.E., 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126, 677-689.

- Evans, E., 1998. Energy landscapes of biomolecular adhesion and receptor anchoring at interfaces explored with dynamic force spectroscopy. *Faraday Discuss*, 1-16.
- Evans, E., 2001. Probing the relation between force--lifetime--and chemistry in single molecular bonds. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30, 105-128.
- Evans, E., Kinoshita, K., 2007. Using force to probe single-molecule receptor-cytoskeletal anchoring beneath the surface of a living cell. *Methods Cell Biol* 83, 373-396.
- Evans, E., Leung, A., Hammer, D., Simon, S., 2001. Chemically distinct transition states govern rapid dissociation of single L-selectin bonds under force. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3784-3789.
- Evans, E., Ritchie, K., 1994. Probing molecular attachments to cell surface receptors: image of stochastic bonding and rupture processes, in: J. Rabe, H. E. Gaub, Hansma, P.K. (Eds.), *Scanning Probe Microscopies and Molecular Materials*. Kluwer Publishing, Amsterdam.
- Evans, E., Ritchie, K., 1997. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys J* 72, 1541-1555.
- Evans, E.A., Calderwood, D.A., 2007. Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science* 316, 1148-1153.
- Eyckmans, J., Boudou, T., Yu, X., Chen, C.S., 2011. A hitchhiker's guide to mechanobiology. *Dev Cell* 21, 35-47.
- Fabry, B., Maksym, G.N., Butler, J.P., Glogauer, M., Navajas, D., Fredberg, J.J., 2001. Scaling the microrheology of living cells. *Phys Rev Lett* 87, 148102.
- Fabry, B., Maksym, G.N., Butler, J.P., Glogauer, M., Navajas, D., Taback, N.A., Millet, E.J., Fredberg, J.J., 2003. Time scale and other invariants of integrative mechanical behavior in living cells. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 68, 041914.

- Fabry, B., Maksym, G.N., Hubmayr, R.D., Butler, J.P., Fredberg, J.J., 1999. Implications of heterogeneous bead behavior on cell mechanical properties measured with magnetic twisting cytometry. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 194, 120-125.
- Felsenfeld, D.P., Choquet, D., Sheetz, M.P., 1996. Ligand binding regulates the directed movement of beta1 integrins on fibroblasts. *Nature* 383, 438-440.
- Féréol, S., Fodil, R., Labat, B., Galiacy, S., Laurent, V.M., Louis, B., Isabey, D., Planus, E., 2006. Sensitivity of alveolar macrophages to substrate mechanical and adhesive properties. *Cell Motil Cytoskeleton* 63, 321-340.
- Féréol, S., Fodil, R., Laurent, V.M., Balland, M., Louis, B., Pelle, G., Hénon, S., Planus, E., Isabey, D., 2009. Prestress and adhesion site dynamics control cell sensitivity to extracellular stiffness. *Biophys J* 96, 2009-2022.
- Féréol, S., Fodil, R., Pelle, G., Louis, B., Isabey, D., 2008. Cell mechanics of alveolar epithelial cells (AECs) and macrophages (AMs). *Respir Physiol Neurobiol* 163, 3-16.
- Florin, E.L., Moy, V.T., Gaub, H.E., 1994. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science* 264, 415-417.
- Freedman, A.P., Robinson, S.E., Johnston, R.J., 1980. Non-invasive magnetopneumographic estimation of lung dust loads and distribution in bituminous coal workers. *J Occup Med* 22, 613-618.
- Fritz, J., Katopodis, A.G., Kolbinger, F., Anselmetti, D., 1998. Force-mediated kinetics of single P-selectin/ligand complexes observed by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12283-12288.
- Hänggi, P., Talkner, P., Borkovec, M., 1990. Reaction rate Theory: 50 years after Kramers. *Rev. Mod. Phys.* 62, 251-341.

- Hinterdorfer, P., Baumgartner, W., Gruber, H.J., Schilcher, K., Schindler, H., 1996. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3477-3481.
- Hoffman, B.D., Crocker, J.C., 2009. Cell mechanics: dissecting the physical responses of cells to force. *Annu Rev Biomed Eng* 11, 259-288.
- Hu, S., Chen, J., Fabry, B., Numaguchi, Y., Gouldstone, A., Ingber, D.E., Fredberg, J.J., Butler, J.P., Wang, N., 2003. Intracellular stress tomography reveals stress focusing and structural anisotropy in cytoskeleton of living cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, C1082-1090.
- Hu, S., Eberhard, L., Chen, J., Love, J.C., Butler, J.P., Fredberg, J.J., Whitesides, G.M., Wang, N., 2004. Mechanical anisotropy of adherent cells probed by a three-dimensional magnetic twisting device. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C1184-1191.
- Ingber, D.E., 1993. Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *Journal Of Cell Science* 104 (Pt 3), 613-627.
- Ingber, D.E., 1998. Cellular basis of mechanotransduction. *Biol Bull* 194, 323-325; discussion 325-327.
- Ingber, D.E., 2006. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *Faseb J* 20, 811-827.
- Ingber, D.E., 2008a. Tensegrity-based mechanosensing from macro to micro. *Prog Biophys Mol Biol* 97, 163-179.
- Ingber, D.E., 2008b. Tensegrity and mechanotransduction. *J Bodyw Mov Ther* 12, 198-200.
- Isabey, D., Fereol, S., Caluch, A., Fodil, R., Louis, B., Pelle, G., 2013. Force distribution on multiple bonds controls the kinetics of adhesion in stretched cells. *J Biomech* 46, 307-313.

- Ishijima, A., Harada, Y., Kojima, H., Funatsu, T., Higuchi, H., Yanagida, T., 1994. Single-molecule analysis of the actomyosin motor using nano-manipulation. *Biochem Biophys Res Commun* 199, 1057-1063.
- Janmey, P.A., McCulloch, C.A., 2007. Cell mechanics: integrating cell responses to mechanical stimuli. *Annu Rev Biomed Eng* 9, 1-34.
- Kim, D.H., Wong, P.K., Park, J., Levchenko, A., Sun, Y., 2009. Microengineered platforms for cell mechanobiology. *Annu Rev Biomed Eng* 11, 203-233.
- Kramers, H., 1940. Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. *Physica* 7, 284-304.
- Laurent, V.M., Cañadas, P., Fodil, R., Planus, E., Asnacios, A., Wendling, S., Isabey, D., 2002a. Tensegrity behaviour of cortical and cytosolic cytoskeletal components in twisted living adherent cells. *Acta Biotheor* 50, 331-356.
- Laurent, V.M., Fodil, R., Canadas, P., Féréol, S., Louis, B., Planus, E., Isabey, D., 2003. Partitioning of cortical and deep cytoskeleton responses from transient magnetic bead twisting. *Ann Biomed Eng* 31, 1263-1278.
- Laurent, V.M., Henon, S., Planus, E., Fodil, R., Balland, M., Isabey, D., Gallet, F., 2002b. Assessment of mechanical properties of adherent living cells by bead micromanipulation: comparison of magnetic twisting cytometry vs optical tweezers. *Journal of Biomechanical Engineering* 124, 408-421.
- Lele, T.P., Sero, J.E., Matthews, B.D., Kumar, S., Xia, S., Montoya-Zavala, M., Polte, T., Overby, D., Wang, N., Ingber, D.E., 2007. Tools to study cell mechanics and mechanotransduction. *Methods Cell Biol* 83, 443-472.
- Lenormand, G., Bursac, P., Butler, J.P., Fredberg, J.J., 2007. Out-of-equilibrium dynamics in the cytoskeleton of the living cell. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 76, 041901.

- Li, F., Redick, S.D., Erickson, H.P., Moy, V.T., 2003. Force measurements of the alpha5beta1 integrin-fibronectin interaction. *Biophys J* 84, 1252-1262.
- Lim, C.T., Zhou, E.H., Quek, S.T., 2006. Mechanical models for living cells--a review. *J Biomech* 39, 195-216.
- Maksym, G.N., Fabry, B., Butler, J.P., Navajas, D., Tschumperlin, D.J., Laporte, J.D., Fredberg, J.J., 2000. Mechanical properties of cultured human airway smooth muscle cells from 0.05 to 0.4 Hz. *Journal of Applied Physiology* 89, 1619-1632.
- Meyer, C.J., Alenghat, F.J., Rim, P., Fong, J.H., Fabry, B., Ingber, D.E., 2000. Mechanical control of cyclic AMP signalling and gene transcription through integrins. *Nat Cell Biol* 2, 666-668.
- Mitrossilis, D., Fouchard, J., Guiroy, A., Desprat, N., Rodriguez, N., Fabry, B., Asnacios, A., 2009. Single-cell response to stiffness exhibits muscle-like behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18243-18248.
- Miyamoto, S., Akiyama, S.K., Yamada, K.M., 1995a. Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science* 267, 883-885.
- Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O.A., Gutkind, J.S., Burbelo, P.D., Akiyama, S.K., Yamada, K.M., 1995b. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol* 131, 791-805.
- Mizuno, D., Tardin, C., Schmidt, C.F., Mackintosh, F.C., 2007. Nonequilibrium mechanics of active cytoskeletal networks. *Science* 315, 370-373.
- Molloy, J.E., Burns, J.E., Kendrick-Jones, J., Tregear, R.T., White, D.C., 1995. Movement and force produced by a single myosin head. *Nature* 378, 209-212.
- Munevar, S., Wang, Y., Dembo, M., 2001. Traction force microscopy of migrating normal and H-ras transformed 3T3 fibroblasts. *Biophys J* 80, 1744-1757.

- Na, S., Collin, O., Chowdhury, F., Tay, B., Ouyang, M., Wang, Y., Wang, N., 2008. Rapid signal transduction in living cells is a unique feature of mechanotransduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6626-6631.
- Ohayon, J., Tracqui, P., 2005. Computation of adherent cell elasticity for critical cell-bead geometry in magnetic twisting experiments. *Ann Biomed Eng* 33, 131-141.
- Ohayon, J., Tracqui, P., Fodil, R., Fereol, S., Laurent, V.M., Planus, E., Isabey, D., 2004. 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.
- Oliver, T., Dembo, M., Jacobson, K., 1999. Separation of propulsive and adhesive traction stresses in locomoting keratocytes. *J Cell Biol* 145, 589-604.
- Paszek, M.J., Zahir, N., Johnson, K.R., Lakins, J.N., Rozenberg, G.I., Gefen, A., Reinhart-King, C.A., Margulies, S.S., Dembo, M., Boettiger, D., Hammer, D.A., Weaver, V.M., 2005. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 8, 241-254.
- Planus, E., Galiacy, S., Fereol, S., Fodil, R., Laurent, V.M., d'Ortho, M.P., Isabey, D., 2005. Apical rigidity of an epithelial cell monolayer evaluated by magnetic twisting cytometry: ICAM-1 versus integrin linkages to F-actin structure. *Clin Hemorheol Microcirc* 33, 277-291.
- Planus, E., Galiacy, S., Matthay, M., Laurent, V., Gavrilovic, J., Murphy, G., Clérici, C., Isabey, D., Lafuma, C., d'Ortho, M.P., 1999. Role of collagenase in mediating in vitro alveolar epithelial wound repair. *Journal Of Cell Science* 112 (Pt 2), 243-252.
- Ponton, A., Warlus, S., Griesmar, P., 2002. Rheological study of the sol-gel transition in silica alkoxides. *J Colloid Interface Sci* 249, 209-216.
- Potard, U.S., Butler, J.P., Wang, N., 1997. Cytoskeletal mechanics in confluent epithelial cells probed through integrins and E-cadherins. *Am J Physiol* 272, C1654-1663.

- Pourati, J., Maniotis, A., Spiegel, D., Schaffer, J.L., Butler, J.P., Fredberg, J.J., Ingber, D.E., Stamenovic, D., Wang, N., 1998. Is cytoskeletal tension a major determinant of cell deformability in adherent endothelial cells ? *Cell Physiology* 43, C1283-C1289.
- Puig-de-Morales, M., Millet, E., Fabry, B., Navajas, D., Wang, N., Butler, J.P., Fredberg, J.J., 2004. Cytoskeletal mechanics in adherent human airway smooth muscle cells: probe specificity and scaling of protein-protein dynamics. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C643-654.
- Samani, A., Zubovits, J., Plewes, D., 2007. Elastic moduli of normal and pathological human breast tissues: an inversion-technique-based investigation of 169 samples. *Phys Med Biol* 52, 1565-1576.
- Schwesinger, F., Ros, R., Strunz, T., Anselmetti, D., Guntherodt, H.J., Honegger, A., Jermutus, L., Tiefenauer, L., Pluckthun, A., 2000. Unbinding forces of single antibody-antigen complexes correlate with their thermal dissociation rates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9972-9977.
- Silver, F.H., Siperko, L.M., 2003. Mechanosensing and mechanochemical transduction: how is mechanical energy sensed and converted into chemical energy in an extracellular matrix? *Crit Rev Biomed Eng* 31, 255-331.
- Stamenovic, D., 2005. Effects of cytoskeletal prestress on cell rheological behavior. *Acta Biomater* 1, 255-262.
- Stamenovic, D., Coughlin, M.F., 1999. The role of prestress and architecture of the cytoskeleton and deformability of cytoskeletal filaments in mechanics of adherent cells : a quantitative analysis. *Journal of Theoretical Biology* 201, 63-74.
- Stamenovic, D., Rosenblatt, N., Montoya-Zavala, M., Matthews, B.D., Hu, S., Suki, B., Wang, N., Ingber, D.E., 2007. Rheological behavior of living cells is timescale-dependent. *Biophys J* 93, L39-41.

- Thomas, W.E., Vogel, V., Sokurenko, E., 2008. Biophysics of catch bonds. *Annu Rev Biophys* 37, 399-416.
- Tinsley, J.H., De Lanerolle, P., Wilson, E., Ma, W., Yuan, S.Y., 2000. Myosin light chain kinase transference induces myosin light chain activation and endothelial hyperpermeability. *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C1285-1289.
- Trepap, X., Grabulosa, M., Puig, F., Maksym, G.N., Navajas, D., Farre, R., 2004. Viscoelasticity of human alveolar epithelial cells subjected to stretch. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287, L1025-1034.
- Valberg, P.A., 1984. Magnetometry of ingested particles in pulmonary macrophages. *Science* 224, 513-516.
- Valberg, P.A., Albertini, D.F., 1985. Cytoplasmic motions, rheology, and structure probed by a novel magnetic particle method. *J Cell Biol* 101, 130-140.
- Valberg, P.A., Brain, J.D., 1979. Generation and use of three types of iron-oxide aerosol. *Am Rev Respir Dis* 120, 1013-1024.
- Valberg, P.A., Butler, J.P., 1987. Magnetic particle motions within living cells. Physical theory and techniques. *Biophys J* 52, 537-550.
- Valberg, P.A., Feldman, H.A., 1987. Magnetic particle motions within living cells. Measurement of cytoplasmic viscosity and motile activity. *Biophys J* 52, 551-561.
- Wang, B., Caluch, A., Fodil, R., Fereol, S., Zadigue, P., Pelle, G., Louis, B., Isabey, D., 2012. Force control of endothelium permeability in mechanically stressed pulmonary microvascular endothelial cells. *Biomed Mater Eng* 22, 163-170.
- Wang, N., 1998. Mechanical interactions among cytoskeletal filaments. *Hypertension* 32, 162-165.
- Wang, N., Butler, J.P., Ingber, D.E., 1993. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton [see comments]. *Science* 260, 1124-1127.

- Wang, N., Ingber, D.E., 1994. Control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape, and mechanical tension. *Biophys J* 66, 2181-2189.
- Wang, N., Ingber, D.E., 1995. Probing transmembrane mechanical coupling and cytomechanics using magnetic twisting cytometry. *Biochem Cell Biol* 73, 327-335.
- Wang, N., Tolic-Norrelykke, I.M., Chen, J., Mijailovich, S., Butler, J.P., Fredberg, J.J., Stamenovic, D., 2002. Cell prestress. I. Stiffness and prestress are closely associated in adherent contractile cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282, C606-C616.
- Weeks, E.R., Crocker, J.C., Levitt, A.C., Schofield, A., Weitz, D.A., 2000. Three-dimensional direct imaging of structural relaxation near the colloidal glass transition. *Science* 287, 627-631.
- Wendling, S., Oddou, C., Isabey, D., 1999. Stiffening response of a cellular tensegrity model. *Journal of Theoretical Biology* 196, 309-325.
- Wendling, S., Planus, E., Laurent, V., Barbe, L., Mary, A., Oddou, C., Isabey, D., 2000. Role of cellular tone and microenvironmental conditions on cytoskeleton stiffness assessed by tensegrity model. *European Physical Journal Applied Physics* 9, 51-62.
- Williams, P.M., 2003. Analytical descriptions of dynamic force spectroscopy: behaviour of multiple connections. *Analytica Chimica Acta* 479, 107-115.
- Yoshida, M., Westlin, W.F., Wang, N., Ingber, D.E., Rosenzweig, A., Resnick, N., Gimbrone, M.A., Jr., 1996. Leukocyte adhesion to vascular endothelium induces E-selectin linkage to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 133, 445-455.
- Zaman, M.H., Trapani, L.M., Sieminski, A.L., Mackellar, D., Gong, H., Kamm, R.D., Wells, A., Lauffenburger, D.A., Matsudaira, P., 2006. Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10889-10894.

Zhang, X., Craig, S.E., Kirby, H., Humphries, M.J., Moy, V.T., 2004. Molecular basis for the dynamic strength of the integrin $\alpha4\beta1$ /VCAM-1 interaction. *Biophys J* 87, 3470-3478.

Zhu, C., Bao, G., Wang, N., 2000. Cell mechanics: mechanical response, cell adhesion, and molecular deformation. *Annu Rev Biomed Eng* 2, 189-226.

Legend of Figures

Figure 1: Magnetic Twisting Cytometry.

(A) Living cells are cultured in treated small plastic wells (6 mm diameter) and incubated with bound ferromagnetic beads for a sufficient time (≥ 30 min) allowing the cells to engulf the beads. Beads are coated with the synthetic RGD peptide from the cell-binding region of fibronectin, anti-integrin antibody or ECM molecules. These coatings are recognized by transmembrane integrin receptors which are also physically coupled to the intracellular CSK structure and primarily to the actin filament network. After magnetization of beads by a strong magnetic field created by Helmholtz coils, magnetic dipoles are aligned in the horizontal direction and a weaker magnetic field (≤ 6 mT) also created by Helmholtz coils is applied in the perpendicular direction during 1 min. The resulting magnetic torque is responsible for bead twisting. The twisting field, adjustable in magnitude by changing the current intensity in Helmholtz coils, allows application of shear forces directly to the bound receptors and beyond to the CSK.

(B) A transient torque signal is generated. It is constituted by a positive 400 ms-ramp, a 60 s-clamp with a sustained magnetic torque resulting from a constant magnetic field, then a

negative 400 ms-ramp is applied and terminated by a non-loading period to permit partial recovery of bead position (see text for explanations).

(C) Before, during and after bead twisting, the remanent magnetic field is measured by an in line magnetometer whose probes are located in the horizontal plane (culture plane). $B(t)$ is the instantaneous magnetic field, B_0 is the remanent magnetic field measured before torque application, The bead deviation $\theta(t)$ is the angle between the horizontal direction and the bead magnetic moment \vec{m} . The complementary angle $\left[\frac{\pi}{2}-\theta(t)\right]$ is the angle between the bead magnetic moment \vec{m} and the vertical direction of the perpendicular twisting field \vec{H} . The rotational shear stress is computed based on knowledge of twisting field and angular strain calculated from the arc cosine of the $B(t)/B_0$.

Figure 2: Signal of the remanent magnetic field in MTC.

The instantaneous magnetic field $B(t)$ (in nT) is plotted versus time (in s) in Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells (HPMEC). This recording shows the response of living cells to a 1 mn - twisting period followed by a 1 mn - recovery period. From an initial value B_0 of the order of 1 nT, we can detect an immediate (time independent) decay up to the value $B(t)(1-x)$ in which x represents the percentage of free rotating beads. It is followed by a time-dependent decay in $B(t)$ used to analyze de-adhesion phenomena which contributes in addition to the time-independent decay, to the non recoverable component of the magnetic signal. The recoverable component of the magnetic signal is used in parallel to analyze the “global” viscoelastic response of the CSK using different models (single Voigt model, double Voigt model, time-invariant power law) whose parameters, obtained by best

curve fitting, lead to 3 creep functions presently superimposed to the experimental signal for comparison. Differences between the experimental curve and the 3 models are rather small.

Figure 3: The effect of force at cellular and molecular scales

(A) The effect of shear forces on bound receptors and CSK.

The mechanical properties of one or several viscoelastic solid-like models are measured through integrins whose partial detachment allows characterizing the kinetics of de-adhesion using an empirical model at the cell scale and a theoretical model presumably valid at the molecular level of the bead-cell interaction.

(B) The effect of force on the energy-distance contour (energy landscape) for typical receptor-ligand binding.

Depending on the separation distance between two macromolecules which chemically interact, the energy level changes, passing from the native state (NS) to the transition state (TS) which characterizes the limit between association (NS) and dissociation (DS) states . The strength of a bond is classically given by the maximum gradient of the interaction potential defined along the direction of separation x , i.e., $-(\partial E_b / \partial x)_{\max}$. When a force is exerted on the bond, the height of the energy barrier is lowered by a quantity corresponding to mechanical energy, producing an increase in dissociation rate, more rapidly leading to bond dissociation. We assume that the distance x_β at which TS is observed is only minimally modified by force application, i.e., $\Delta x_\beta \approx 0$.

Figure 4: Time course of the twisting stress (in Pa, left vertical scale) and probability of bond survival $P(t)$ (right vertical scale) in living HPMECs are presented:

(A) for the entire cell response, i.e., over the approximate 2 mn - duration of a given MTC experiment.

(B) for the onset of cell response, i.e., over the first second of mechanical loading

The actual stress signal (in Pa) clearly resembles to the generated signal in Figure 1 B with however a slight non significant decay caused by the decrease in the angle between \vec{m} and \vec{H} . The number of bonds rapidly decreases during force ramp and then gently decreases during the phase of sustained stress. Values of $P(t)$ show that less than 15% of bonds dissociate in these cells which is yet sufficient to calculate the kinetics parameter of adhesion.

Figure 5: Mechanical properties and kinetic adhesion parameters measured by MTC in living Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells (HPMECs). Graphs on the left (A, C, E) correspond to the empirical cell-scale model of de-adhesion while graphs on the right (B, D, F) correspond to the theoretical molecular-scale model of de-adhesion. A unique viscoelastic solid-like model is presented herein: the double Voigt model which accounts for the cortical and the deep CSK components.

A: Viscoelastic time constant of the cortical CSK component τ_1 (in s) obtained with the double Voigt viscoelastic model coupled with the empirical model of de-adhesion.

B: Viscoelastic time constant of the cortical CSK component τ_1 (in s) obtained with the double Voigt viscoelastic model coupled with the theoretical model of de-adhesion.

C: Viscoelastic time constant of the deep CSK component τ_2 (in s) obtained with the double Voigt viscoelastic model coupled with the empirical model of de-adhesion.

D: Viscoelastic time constant of the deep CSK component τ_2 (in s) obtained with the double Voigt viscoelastic model coupled with the theoretical model of de-adhesion.

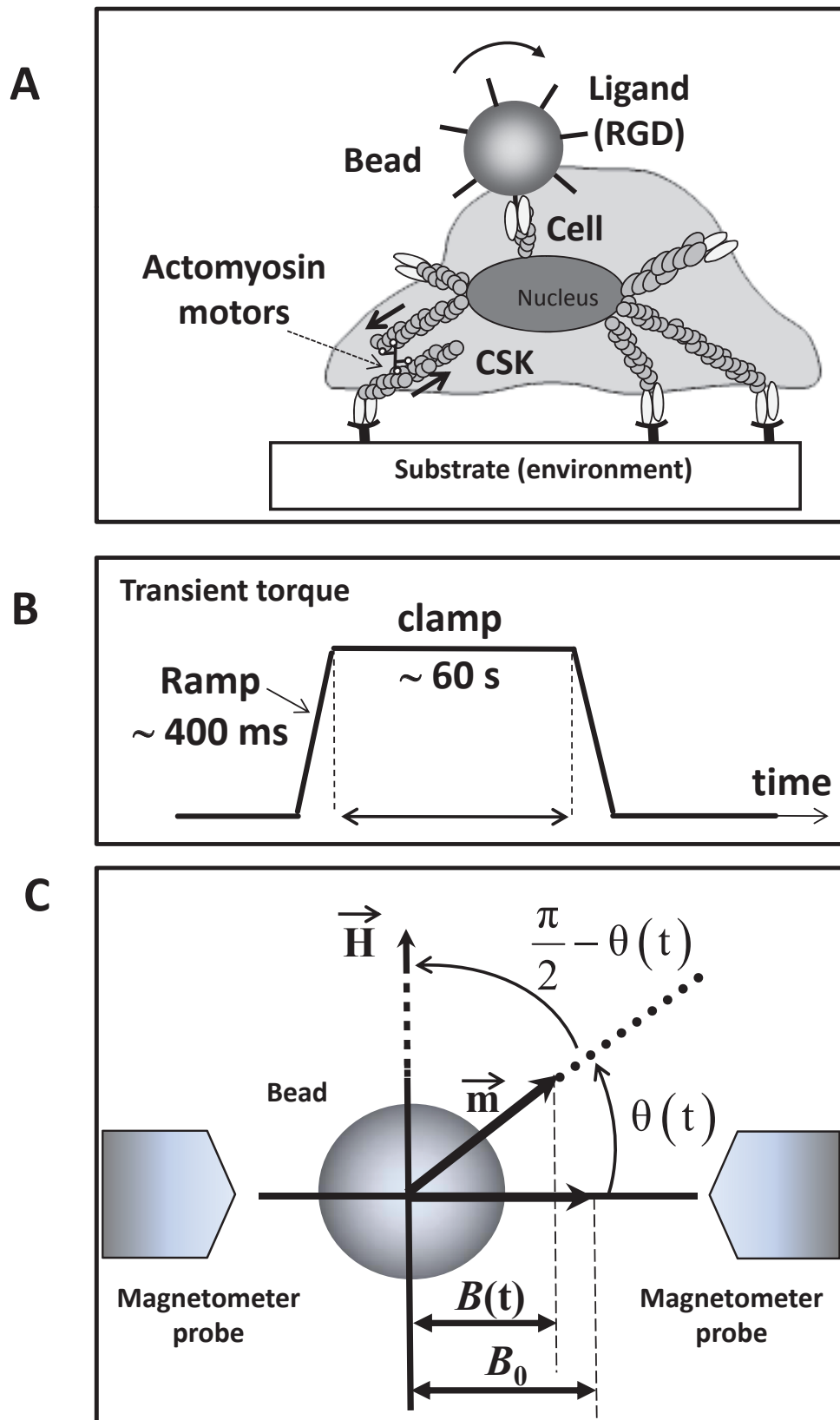
E: Maximum value of the time-dependent sliding angle $\theta_s(t)$ (in degrees) measured at the end of the initial ramp of stress and obtained with the double Voigt viscoelastic model coupled with the empirical model of de-adhesion

F: Dissociation rate at zero force K_{off}^0 (in s^{-1}) obtained with the double Voigt viscoelastic model coupled with the theoretical model of de-adhesion.

Mechanical stimulation of HPMECs cultured in monolayer is obtained by sustained cyclic twisting of the ferromagnetic beads for 2 hours (around 10 Pa at 3 Hz), the cell culture being placed inside an incubator. In some experiments, HPMECs were pretreated by myosin light chain kinase inhibitor (ML9) (at 50 μ M) before exposure to mechanical stimulation.

Horizontal bars indicate statistically significant differences ($p \leq 0.05$).

Vertical error bars are SEM.



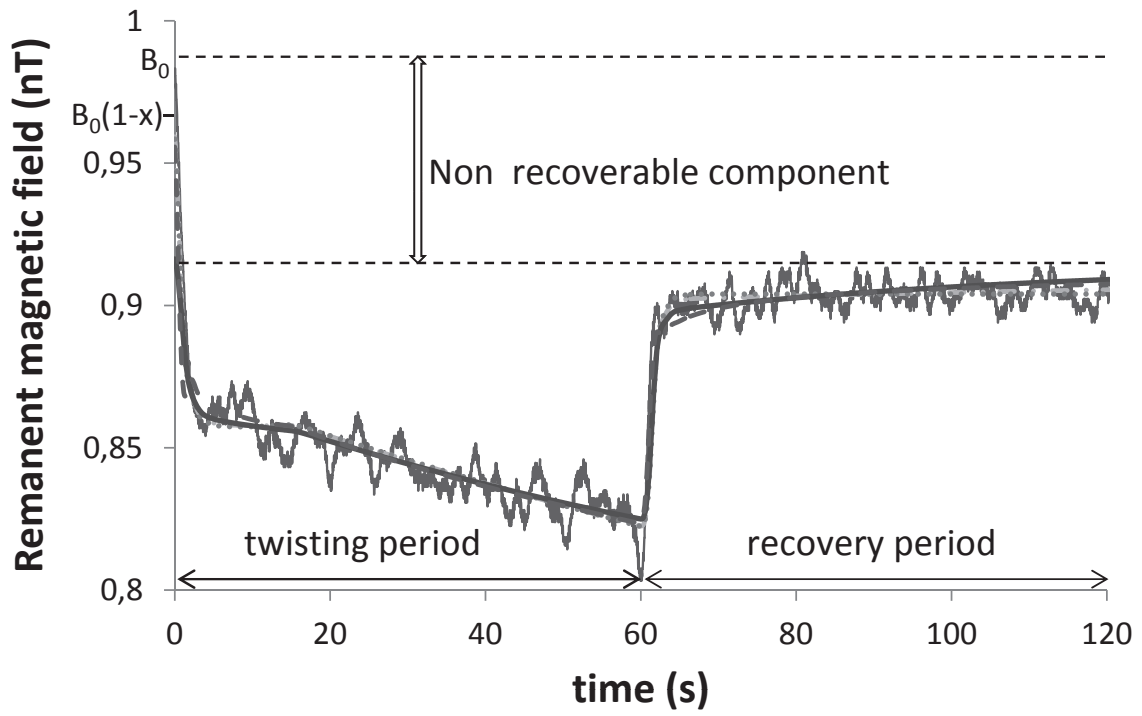


Figure 2

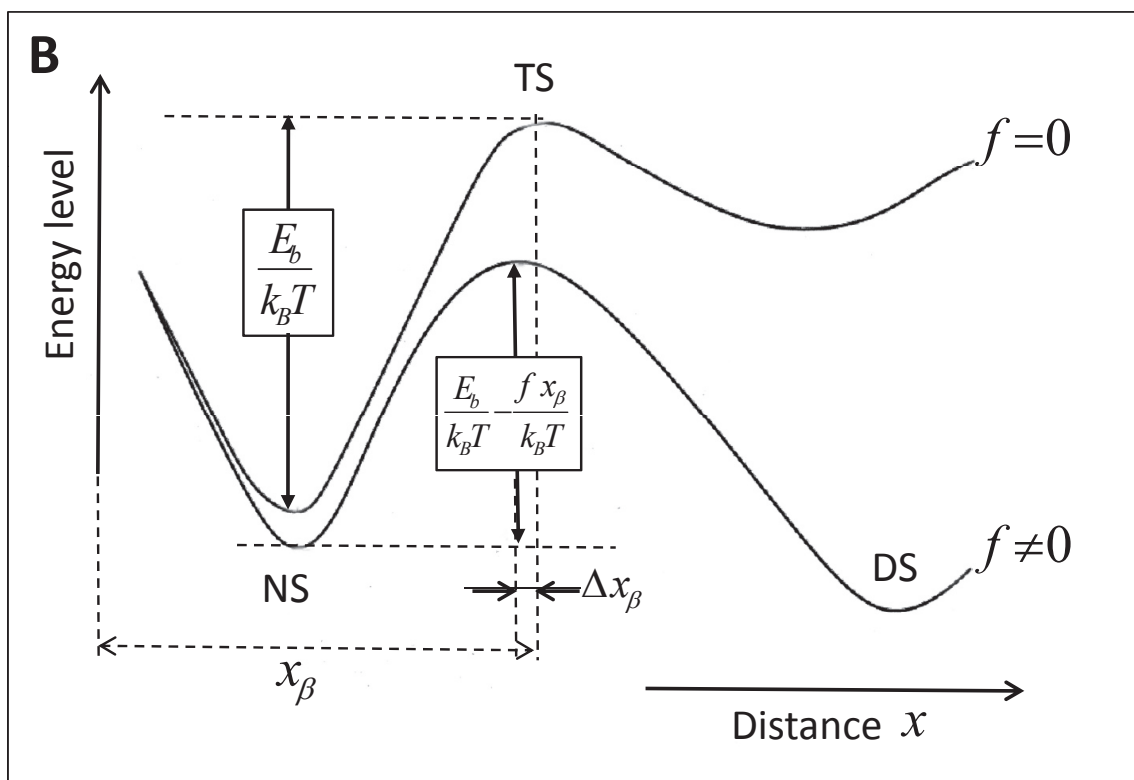
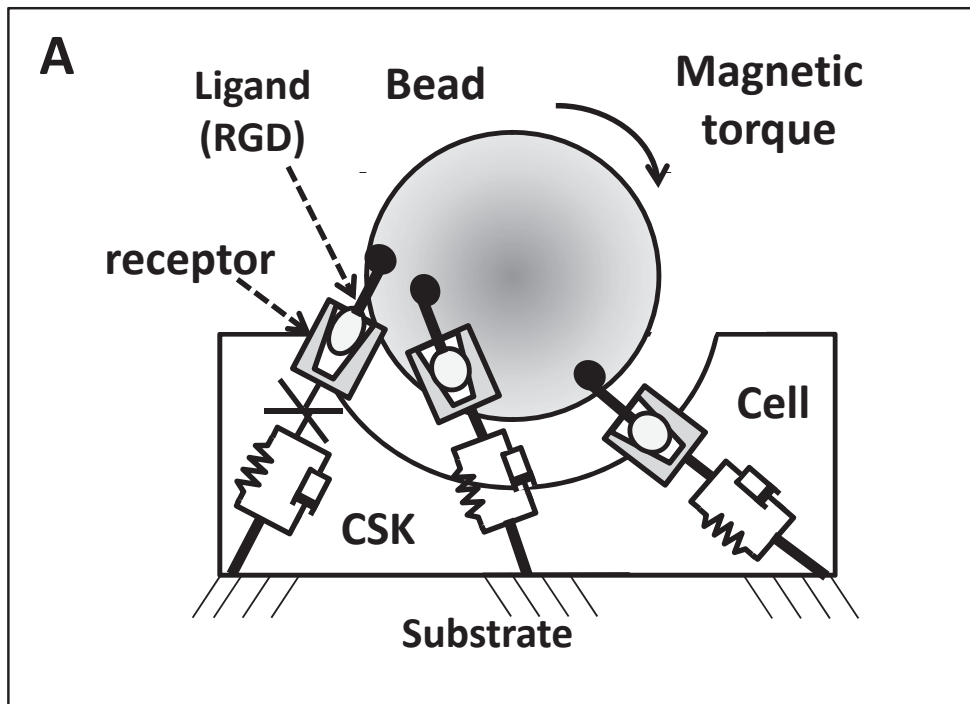


Figure 3

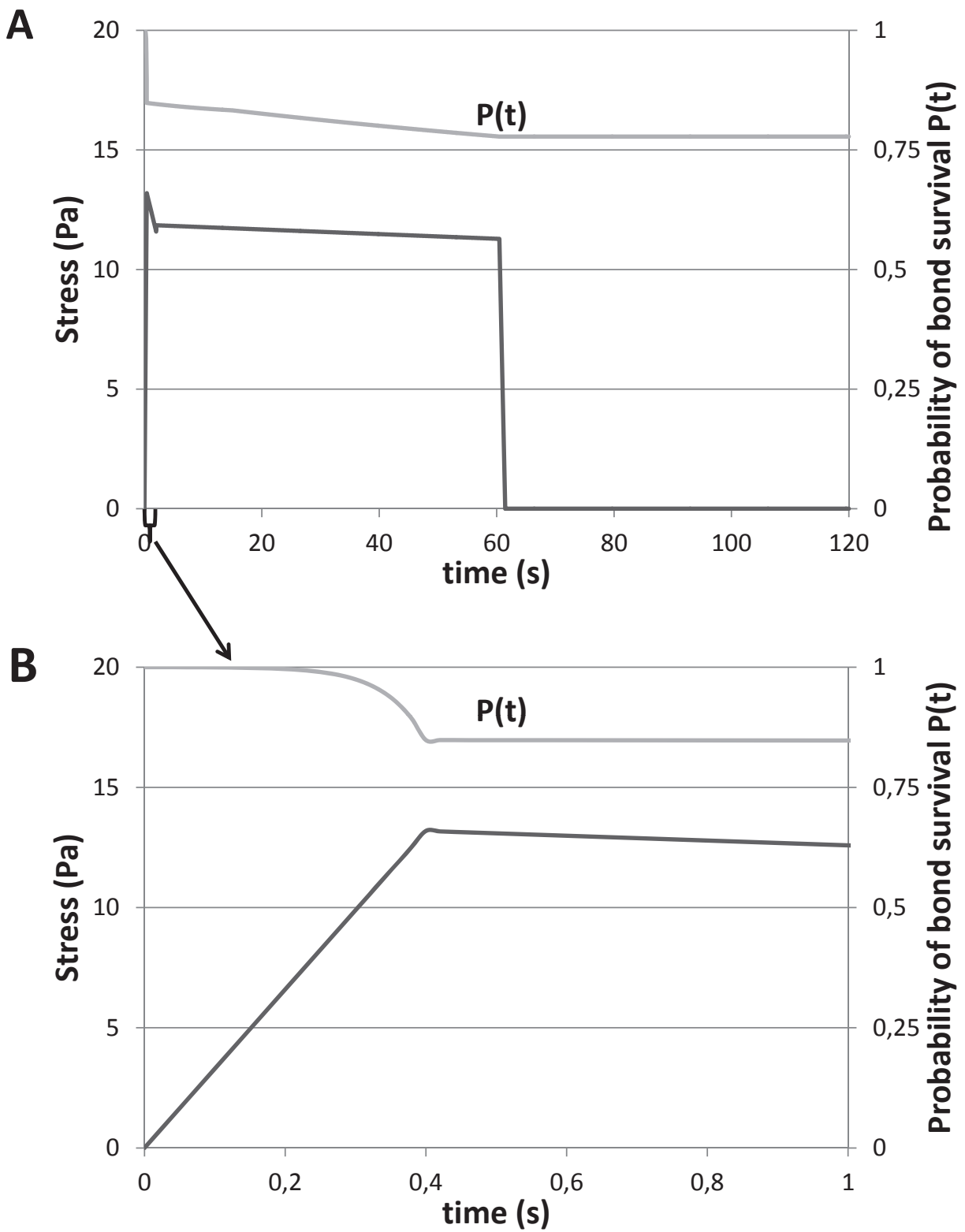


Figure 4

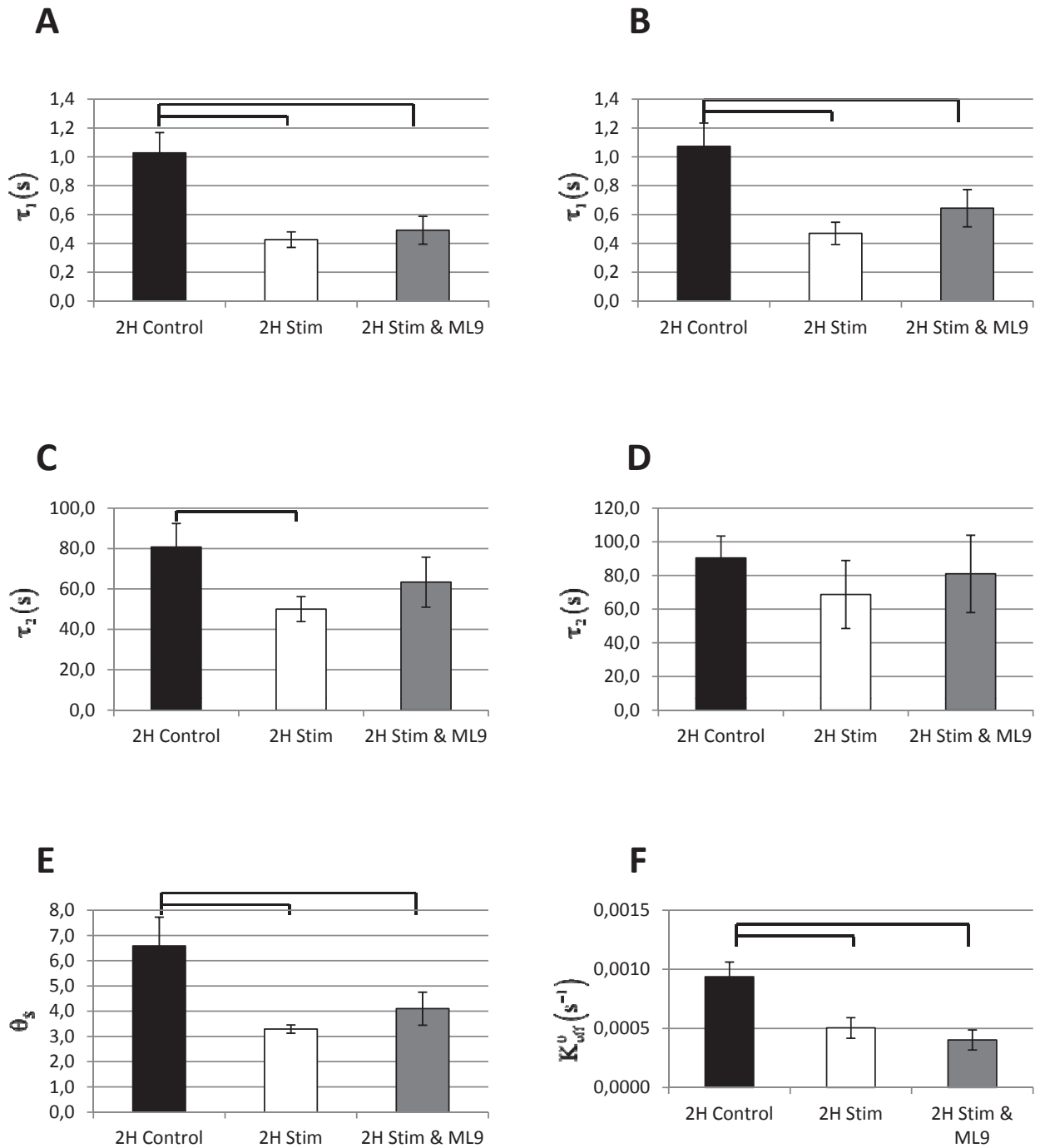


Figure 5

Bibliographie

VIII. Bibliographie

- Abe, K. and M. Takeichi (2008). "EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(1): 13-19.
- Akhta, N., S. Carlso, A. Pesarini, N. Ambulos and A. Passaniti (2001). "Extracellular matrix-derived angiogenic factor(s) inhibit endothelial cell proliferation, enhance differentiation, and stimulate angiogenesis in vivo." *Endothelium* **8**(3): 221-234.
- Albelda, S. M., M. Daise, E. M. Levine and C. A. Buck (1989). "Identification and characterization of cell-substratum adhesion receptors on cultured human endothelial cells." *J Clin Invest* **83**(6): 1992-2002.
- Alenghat, F. J., B. Fabry, K. Y. Tsai, W. H. Goldmann and D. E. Ingber (2000). "Analysis of cell mechanics in single vinculin-deficient cells using a magnetic tweezer." *Biochem Biophys Res Commun* **277**(1): 93-99.
- Alexander, J. S., W. F. Patton, M. U. Yoon and D. Shepro (1991). "Cytokeratin filament modulation in pulmonary microvessel endothelial cells by vasoactive agents and culture confluency." *Tissue Cell* **23**(2): 141-150.
- Amato, M. B., C. S. Barbas, D. M. Medeiros, R. B. Magaldi, G. P. Schettino, G. Lorenzi-Filho, R. A. Kairalla, D. Deheinzelin, C. Munoz, R. Oliveira, T. Y. Takagaki and C. R. Carvalho (1998). "Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome." *N Engl J Med* **338**(6): 347-354.
- Angelini, D. J., S. W. Hyun, D. N. Grigoryev, P. Garg, P. Gong, I. S. Singh, A. Passaniti, J. D. Hasday and S. E. Goldblum (2006). "TNF-alpha increases tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and opens the paracellular pathway through fyn activation in human lung endothelia." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**(6): L1232-1245.
- Arnaut, M. A., B. Mahalingam and J. P. Xiong (2005). "Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling." *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 381-410.
- Ashbaugh, D. G., D. B. Bigelow, T. L. Petty and B. E. Levine (1967). "Acute respiratory distress in adults." *Lancet* **2**(7511): 319-323.
- Aurrand-Lions, M., L. Duncan, C. Ballestrem and B. A. Imhof (2001). "JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells." *J Biol Chem* **276**(4): 2733-2741.
- Aurrand-Lions, M., C. Johnson-Leger, C. Wong, L. Du Pasquier and B. A. Imhof (2001). "Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members." *Blood* **98**(13): 3699-3707.
- Bachofen, M. and E. R. Weibel (1977). "Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia." *Am Rev Respir Dis* **116**(4): 589-615.
- Baker, E. L. and M. H. Zaman (2010). "The biomechanical integrin." *J Biomech* **43**(1): 38-44.
- Balda, M. S. and K. Matter (2000). "Transmembrane proteins of tight junctions." *Semin Cell Dev Biol* **11**(4): 281-289.
- Bamburg, J. R. (1999). "Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics." *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 185-230.
- Baumeister, U., R. Funke, K. Ebnet, H. Vorschmitt, S. Koch and D. Vestweber (2005). "Association of Csk to VE-cadherin and inhibition of cell proliferation." *EMBO J* **24**(9): 1686-1695.
- Baumgartner, W., P. Hinterdorfer, W. Ness, A. Raab, D. Vestweber, H. Schindler and D. Drenckhahn (2000). "Cadherin interaction probed by atomic force microscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(8): 4005-4010.

Bibliographie

- Bazzoni, G. (2003). "The JAM family of junctional adhesion molecules." *Curr Opin Cell Biol* **15**(5): 525-530.
- Bazzoni, G. (2006). "Endothelial tight junctions: permeable barriers of the vessel wall." *Thromb Haemost* **95**(1): 36-42.
- Bazzoni, G. and E. Dejana (2004). "Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis." *Physiol Rev* **84**(3): 869-901.
- Bell, G. I. (1978). "Models for the specific adhesion of cells to cells." *Science* **200**(4342): 618-627.
- Beningo, K. A. and Y. L. Wang (2002). "Fc-receptor-mediated phagocytosis is regulated by mechanical properties of the target." *J Cell Sci* **115**(Pt 4): 849-856.
- Berg, J. T., Z. Fu, E. C. Breen, H. C. Tran, O. Mathieu-Costello and J. B. West (1997). "High lung inflation increases mRNA levels of ECM components and growth factors in lung parenchyma." *J Appl Physiol* (1985) **83**(1): 120-128.
- Bershadsky, A., A. Chausovsky, E. Becker, A. Lyubimova and B. Geiger (1996). "Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction." *Curr Biol* **6**(10): 1279-1289.
- Bhattacharya, S., C. Fu, J. Bhattacharya and S. Greenberg (1995). "Soluble ligands of the alpha v beta 3 integrin mediate enhanced tyrosine phosphorylation of multiple proteins in adherent bovine pulmonary artery endothelial cells." *J Biol Chem* **270**(28): 16781-16787.
- Bhattacharya, S., R. Patel, N. Sen, S. Quadri, K. Parthasarathi and J. Bhattacharya (2001). "Dual signaling by the alpha(v)beta(3)-integrin activates cytosolic PLA(2) in bovine pulmonary artery endothelial cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **280**(5): L1049-1056.
- Bhattacharya, S., X. Ying, C. Fu, R. Patel, W. Kuebler, S. Greenberg and J. Bhattacharya (2000). "alpha(v)beta(3) integrin induces tyrosine phosphorylation-dependent Ca(2+) influx in pulmonary endothelial cells." *Circ Res* **86**(4): 456-462.
- Bhullar, I. S., Y. S. Li, H. Miao, E. Zandi, M. Kim, J. Y. Shyy and S. Chien (1998). "Fluid shear stress activation of IkappaB kinase is integrin-dependent." *J Biol Chem* **273**(46): 30544-30549.
- Bianchi, C., F. W. Sellke, R. L. Del Vecchio, N. K. Tonks and B. G. Neel (1999). "Receptor-type protein-tyrosine phosphatase mu is expressed in specific vascular endothelial beds in vivo." *Exp Cell Res* **248**(1): 329-338.
- Binnig, G., C. F. Quate and C. Gerber (1986). "Atomic force microscope." *Phys Rev Lett* **56**(9): 930-933.
- Birukov, K. G., J. R. Jacobson, A. A. Flores, S. Q. Ye, A. A. Birukova, A. D. Verin and J. G. Garcia (2003). "Magnitude-dependent regulation of pulmonary endothelial cell barrier function by cyclic stretch." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**(4): L785-797.
- Birukova, A. A., K. G. Birukov, D. Adyshev, P. Usatyuk, V. Natarajan, J. G. Garcia and A. D. Verin (2005). "Involvement of microtubules and Rho pathway in TGF-beta1-induced lung vascular barrier dysfunction." *J Cell Physiol* **204**(3): 934-947.
- Birukova, A. A., K. Smurova, K. G. Birukov, P. Usatyuk, F. Liu, K. Kaibuchi, A. Ricks-Cord, V. Natarajan, I. Alieva, J. G. Garcia and A. D. Verin (2004). "Microtubule disassembly induces cytoskeletal remodeling and lung vascular barrier dysfunction: role of Rho-dependent mechanisms." *J Cell Physiol* **201**(1): 55-70.
- Bormann, B. J., C. K. Huang, G. F. Lam and E. A. Jaffe (1986). "Thrombin-induced vimentin phosphorylation in cultured human umbilical vein endothelial cells." *J Biol Chem* **261**(23): 10471-10474.
- Brooks, P. C., R. A. Clark and D. A. Cheresh (1994). "Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis." *Science* **264**(5158): 569-571.
- Brown, M. C. and C. E. Turner (2004). "Paxillin: adapting to change." *Physiol Rev* **84**(4): 1315-1339.
- Brown, M. D. and D. B. Sacks (2006). "IQGAP1 in cellular signaling: bridging the GAP." *Trends Cell Biol* **16**(5): 242-249.
- Burridge, K., K. Fath, T. Kelly, G. Nuckolls and C. Turner (1988). "Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton." *Annu Rev Cell Biol* **4**: 487-525.

Bibliographie

- Burute, M. and M. Thery (2012). "Spatial segregation between cell-cell and cell-matrix adhesions." *Curr Opin Cell Biol* **24**(5): 628-636.
- Busch, C., C. Ljungman, C. M. Heldin, E. Waskson and B. Obrink (1979). "Surface properties of cultured endothelial cells." *Haemostasis* **8**(3-5): 142-148.
- Carlier, M. F., V. Laurent, J. Santolini, R. Melki, D. Didry, G. X. Xia, Y. Hong, N. H. Chua and D. Pantaloni (1997). "Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility." *J Cell Biol* **136**(6): 1307-1322.
- Carlton, D. P., J. J. Cummings, R. G. Scheerer, F. R. Poulain and R. D. Bland (1990). "Lung overexpansion increases pulmonary microvascular protein permeability in young lambs." *J Appl Physiol* (1985) **69**(2): 577-583.
- Carmeliet, P., M. G. Lampugnani, L. Moons, F. Brevario, V. Compernelle, F. Bono, G. Balconi, R. Spagnuolo, B. Oosthuysen, M. Dewerchin, A. Zanetti, A. Angellilo, V. Mattot, D. Nuyens, E. Lutgens, F. Clotman, M. C. de Ruiter, A. Gittenberger-de Groot, R. Poelmann, F. Lupu, J. M. Herbert, D. Collen and E. Dejana (1999). "Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis." *Cell* **98**(2): 147-157.
- Cattelino, A., S. Liebner, R. Gallini, A. Zanetti, G. Balconi, A. Corsi, P. Bianco, H. Wolburg, R. Moore, B. Oreda, R. Kemler and E. Dejana (2003). "The conditional inactivation of the beta-catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility." *J Cell Biol* **162**(6): 1111-1122.
- Chen, C. and A. A. Gewirth (1992). "In situ observation of monolayer structures of underpotentially deposited Hg on Au(111) with the atomic force microscope." *Phys Rev Lett* **68**(10): 1571-1574.
- Chen, C. S. (2008). "Mechanotransduction - a field pulling together?" *J Cell Sci* **121**(Pt 20): 3285-3292.
- Chen, C. S., J. L. Alonso, E. Ostuni, G. M. Whitesides and D. E. Ingber (2003). "Cell shape provides global control of focal adhesion assembly." *Biochem Biophys Res Commun* **307**(2): 355-361.
- Chen, J., B. Fabry, E. L. Schiffrin and N. Wang (2001). "Twisting integrin receptors increases endothelin-1 gene expression in endothelial cells." *Am J Physiol Cell Physiol* **280**(6): C1475-1484.
- Chen, K. D., Y. S. Li, M. Kim, S. Li, S. Yuan, S. Chien and J. Y. Shyy (1999). "Mechanotransduction in response to shear stress. Roles of receptor tyrosine kinases, integrins, and Shc." *J Biol Chem* **274**(26): 18393-18400.
- Chen, Y., J. Cai, Q. Xu and Z. W. Chen (2004). "Atomic force bio-analytics of polymerization and aggregation of phycoerythrin-conjugated immunoglobulin G molecules." *Mol Immunol* **41**(12): 1247-1252.
- Cheng, Y. F. and R. H. Kramer (1989). "Human microvascular endothelial cells express integrin-related complexes that mediate adhesion to the extracellular matrix." *J Cell Physiol* **139**(2): 275-286.
- Chicurel, M. E., C. S. Chen and D. E. Ingber (1998). "Cellular control lies in the balance of forces." *Current Opinion in Cell Biology* **10**(2): 232-239.
- Chopra, A., E. Tabdanov, H. Patel, P. A. Janmey and J. Y. Kresh (2011). "Cardiac myocyte remodeling mediated by N-cadherin-dependent mechanosensing." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**(4): H1252-1266.
- Choquet, D., D. P. Felsenfeld and M. P. Sheetz (1997). "Extracellular Matrix Rigidity Causes Strengthening of Integrin-Cytoskeleton Linkages." *Cell* **88**: 39-48.
- Chrzanowska-Wodnicka, M. and K. Burridge (1996). "Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions." *J Cell Biol* **133**(6): 1403-1415.
- Chu, Y. S., W. A. Thomas, O. Eder, F. Pincet, E. Perez, J. P. Thiery and S. Dufour (2004). "Force measurements in E-cadherin-mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42." *J Cell Biol* **167**(6): 1183-1194.
- Cirino, G., C. Napoli, M. Bucci and C. Cicala (2000). "Inflammation-coagulation network: are serine protease receptors the knot?" *Trends Pharmacol Sci* **21**(5): 170-172.

Bibliographie

- Clark, P. (1994). "Modulation of scatter factor/hepatocyte growth factor activity by cell-substratum adhesion." *J Cell Sci* **107 (Pt 5)**: 1265-1275.
- Cohler, L. F., T. M. Saba and E. P. Lewis (1985). "Lung vascular injury with protease infusion. Relationship to plasma fibronectin." *Ann Surg* **202(2)**: 240-247.
- Colucci-Guyon, E., M. M. Portier, I. Dunia, D. Paulin, S. Pournin and C. Babinet (1994). "Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype." *Cell* **79(4)**: 679-694.
- Corada, M., M. Mariotti, G. Thurston, K. Smith, R. Kunkel, M. Brockhaus, M. G. Lampugnani, I. Martin-Padura, A. Stoppacciaro, L. Ruco, D. M. McDonald, P. A. Ward and E. Dejana (1999). "Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96(17)**: 9815-9820.
- Coughlin, M. F. and D. Stamenovic (1997). "A tensegrity structure with buckling compression elements: Application to cell mechanics." *Journal of Applied Mechanics-Transactions of the Asme* **64(3)**: 480-486.
- Coughlin, M. F. and D. Stamenovic (1998). "A Tensegrity Model of the Cytoskeleton in Spread and Round Cells." *Journal of Biomechanical Engineering* **120**: 770-777.
- Crawford, A. W., J. W. Michelsen and M. C. Beckerle (1992). "An interaction between zyxin and alpha-actinin." *J Cell Biol* **116(6)**: 1381-1393.
- Crick, F. H. C. and A. F. W. Hughes (1950). "The physical properties of cytoplasm: A study by means of the magnetic particle method Part I. Experimental." *Experimental Cell Research* **1(1)**: 37-80.
- Cunningham, C. C., T. P. Stossel and D. J. Kwiatkowski (1991). "Enhanced motility in NIH 3T3 fibroblasts that overexpress gelsolin." *Science* **251(4998)**: 1233-1236.
- Curtis, T. M., P. J. McKeown-Longo, P. A. Vincent, S. M. Homan, E. M. Wheatley and T. M. Saba (1995). "Fibronectin attenuates increased endothelial monolayer permeability after RGD peptide, anti-alpha 5 beta 1, or TNF-alpha exposure." *Am J Physiol* **269(2 Pt 1)**: L248-260.
- Dai, J. and M. P. Sheetz (1995). "Mechanical properties of neuronal growth cone membranes studied by tether formation with laser optical tweezers." *Biophys J* **68(3)**: 988-996.
- Damiano, E. R. (1998). "The effect of the endothelial-cell glycocalyx on the motion of red blood cells through capillaries." *Microvasc Res* **55(1)**: 77-91.
- Dammer, U., O. Popescu, P. Wagner, D. Anselmetti, H. J. Guntherodt and G. N. Misevic (1995). "Binding strength between cell adhesion proteoglycans measured by atomic force microscopy." *Science* **267(5201)**: 1173-1175.
- Dane, M. J., B. M. van den Berg, M. C. Avramut, F. G. Faas, J. van der Vlag, A. L. Rops, R. B. Ravelli, B. J. Koster, A. J. van Zonneveld, H. Vink and T. J. Rabelink (2013). "Glomerular endothelial surface layer acts as a barrier against albumin filtration." *Am J Pathol* **182(5)**: 1532-1540.
- Danowski, B. A. (1989). "Fibroblast contractility and actin organization are stimulated by microtubule inhibitors." *J Cell Sci* **93 (Pt 2)**: 255-266.
- Daudi, I., T. M. Saba, M. Lewis, E. Lewis, F. A. Blumenstock, P. Gudewicz, A. B. Malik and J. W. Fenton (1989). "Fibronectin fragments in lung lymph after thrombin-induced lung vascular injury." *Lab Invest* **61(5)**: 539-547.
- Davies, P. F. (1995). "Flow-mediated endothelial mechanotransduction." *Physiol Rev* **75(3)**: 519-560.
- Davis, M. A., R. C. Ireton and A. B. Reynolds (2003). "A core function for p120-catenin in cadherin turnover." *J Cell Biol* **163(3)**: 525-534.
- De Matteis, M. A. and J. S. Morrow (2000). "Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway." *J Cell Sci* **113 (Pt 13)**: 2331-2343.
- de Prost, N., J. D. Ricard, G. Saumon and D. Dreyfuss (2011). "Ventilator-induced lung injury: historical perspectives and clinical implications." *Ann Intensive Care* **1(1)**: 28.
- Deakin, N. O. and C. E. Turner (2008). "Paxillin comes of age." *J Cell Sci* **121(Pt 15)**: 2435-2444.
- Dejana, E. (2004). "Endothelial cell-cell junctions: happy together." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5(4)**: 261-270.

Bibliographie

- Dejana, E., G. Bazzoni and M. G. Lampugnani (1999). "Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue?" *Exp Cell Res* **252**(1): 13-19.
- Dejana, E., F. Orsenigo and M. G. Lampugnani (2008). "The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability." *J Cell Sci* **121**(Pt 13): 2115-2122.
- Dejana, E., E. Tournier-Lasserre and B. M. Weinstein (2009). "The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications." *Dev Cell* **16**(2): 209-221.
- Discher, D. E., P. Janmey and Y. L. Wang (2005). "Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate." *Science* **310**(5751): 1139-1143.
- Dos Santos, C. C. and A. S. Slutsky (2000). "Invited review: mechanisms of ventilator-induced lung injury: a perspective." *J Appl Physiol* **89**(4): 1645-1655.
- Dreyfuss, D., G. Basset, P. Soler and G. Saumon (1985). "Intermittent positive-pressure hyperventilation with high inflation pressures produces pulmonary microvascular injury in rats." *Am Rev Respir Dis* **132**(4): 880-884.
- Dreyfuss, D. and G. Saumon (1998). "Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies." *Am J Respir Crit Care Med* **157**(1): 294-323.
- Dudek, S. M. and J. G. Garcia (2001). "Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability." *J Appl Physiol* **91**(4): 1487-1500.
- Ebnet, K., C. U. Schulz, M. K. Meyer Zu Brickwedde, G. G. Pendl and D. Vestweber (2000). "Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1." *J Biol Chem* **275**(36): 27979-27988.
- Eichacker, P. Q., E. P. Gerstenberger, S. M. Banks, X. Cui and C. Natanson (2002). "Meta-analysis of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome trials testing low tidal volumes." *Am J Respir Crit Care Med* **166**(11): 1510-1514.
- Engler, A. J., S. Sen, H. L. Sweeney and D. E. Discher (2006). "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification." *Cell* **126**(4): 677-689.
- Erdmann, T. and U. S. Schwarz (2007). "Impact of receptor-ligand distance on adhesion cluster stability." *Eur Phys J E Soft Matter* **22**(2): 123-137.
- Esser, S., M. G. Lampugnani, M. Corada, E. Dejana and W. Risau (1998). "Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells." *J Cell Sci* **111** (Pt 13): 1853-1865.
- Essler, M., M. Amano, H. J. Kruse, K. Kaibuchi, P. C. Weber and M. Aepfelbacher (1998). "Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho kinase in human endothelial cells." *J Biol Chem* **273**(34): 21867-21874.
- Evans, E. (2001). "Probing the relation between force--lifetime--and chemistry in single molecular bonds." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **30**: 105-128.
- Evans, E. and K. Kinoshita (2007). "Using force to probe single-molecule receptor-cytoskeletal anchoring beneath the surface of a living cell." *Methods Cell Biol* **83**: 373-396.
- Evans, E. and J. M. Williams (2002). II. Multiple bonds. *Physics of Bio-Molecules and Cells*. H. Flyvbjerg, F. Jülicher, P. Ormos and F. David. Heidelberg, Springer and EDP Sciences. **75**: 187-203.
- Evans, E. and A. Yeung (1989). "Apparent viscosity and cortical tension of blood granulocytes determined by micropipet aspiration." *Biophys J* **56**(1): 151-160.
- Evans, E. A. and D. A. Calderwood (2007). "Forces and bond dynamics in cell adhesion." *Science* **316**(5828): 1148-1153.
- 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**(14): 148102.
- Fabry, B., G. N. Maksym, R. D. Hubmayr, J. P. Butler and J. J. Fredberg (1999). "Implications of heterogeneous bead behavior on cell mechanical properties measured with magnetic twisting cytometry." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **194**(1-3): 120-125.
- Féréol, S., R. Fodil, B. Labat, S. Galiacy, V. M. Laurent, B. Louis, D. Isabey and E. Planus (2006). "Sensitivity of alveolar macrophages to substrate mechanical and adhesive properties." *Cell Motil Cytoskeleton* **63**(6): 321-340.

Bibliographie

- Féréol, S., R. Fodil, V. M. Laurent, M. Balland, B. Louis, G. Pelle, S. Hénon, E. Planus and D. Isabey (2009). "Prestress and adhesion site dynamics control cell sensitivity to extracellular stiffness." *Biophys J* **96**(5): 2009-2022.
- Fereol, S., R. Fodil, V. M. Laurent, E. Planus, B. Louis, G. Pelle and D. Isabey (2008). "Mechanical and structural assessment of cortical and deep cytoskeleton reveals substrate-dependent alveolar macrophage remodeling." *Biomed Mater Eng* **18**(1 Suppl): S105-118.
- Fereol, S., R. Fodil, G. Pelle, B. Louis and D. Isabey (2008). "Cell mechanics of alveolar epithelial cells (AECs) and macrophages (AMs)." *Respir Physiol Neurobiol* **163**(1-3): 3-16.
- Florian, J. A., J. R. Kosky, K. Ainslie, Z. Pang, R. O. Dull and J. M. Tarbell (2003). "Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells." *Circ Res* **93**(10): e136-142.
- Folkman, J. and P. A. D'Amore (1996). "Blood vessel formation: what is its molecular basis?" *Cell* **87**(7): 1153-1155.
- Frank, D. J., R. Hopmann, M. Lenartowska and K. G. Miller (2006). "Capping protein and the Arp2/3 complex regulate nonbundle actin filament assembly to indirectly control actin bundle positioning during *Drosophila melanogaster* bristle development." *Mol Biol Cell* **17**(9): 3930-3939.
- Fritz, J., A. G. Katopodis, F. Kolbinger and D. Anselmetti (1998). "Force-mediated kinetics of single P-selectin/ligand complexes observed by atomic force microscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(21): 12283-12288.
- Fu, Z., M. L. Costello, K. Tsukimoto, R. Prediletto, A. R. Elliott, O. Mathieu-Costello and J. B. West (1992). "High lung volume increases stress failure in pulmonary capillaries." *J Appl Physiol* (1985) **73**(1): 123-133.
- Fujiwara, H., J. Gu and K. Sekiguchi (2004). "Rac regulates integrin-mediated endothelial cell adhesion and migration on laminin-8." *Exp Cell Res* **292**(1): 67-77.
- Fujiwara, K. (2003). "Mechanical stresses keep endothelial cells healthy: beneficial effects of a physiological level of cyclic stretch on endothelial barrier function." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**(4): L782-784.
- Furuse, M., H. Sasaki, K. Fujimoto and S. Tsukita (1998). "A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts." *J Cell Biol* **143**(2): 391-401.
- Gao, H., J. Qian and B. Chen (2011). "Probing mechanical principles of focal contacts in cell-matrix adhesion with a coupled stochastic-elastic modelling framework." *J R Soc Interface* **8**(62): 1217-1232.
- Gavard, J. and J. S. Gutkind (2006). "VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin." *Nat Cell Biol* **8**(11): 1223-1234.
- Geiger, B., A. Bershadsky, R. Pankov and K. M. Yamada (2001). "Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(11): 793-805.
- Gimond, C., A. van Der Flier, S. van Delft, C. Brakebusch, I. Kuikman, J. G. Collard, R. Fassler and A. Sonnenberg (1999). "Induction of cell scattering by expression of beta1 integrins in beta1-deficient epithelial cells requires activation of members of the rho family of GTPases and downregulation of cadherin and catenin function." *J Cell Biol* **147**(6): 1325-1340.
- Girard, P. R. and R. M. Nerem (1995). "Shear stress modulates endothelial cell morphology and F-actin organization through the regulation of focal adhesion-associated proteins." *J Cell Physiol* **163**(1): 179-193.
- Goeckeler, Z. M., R. A. Masaracchia, Q. Zeng, T. L. Chew, P. Gallagher and R. B. Wysolmerski (2000). "Phosphorylation of myosin light chain kinase by p21-activated kinase PAK2." *J Biol Chem* **275**(24): 18366-18374.
- Goeckeler, Z. M. and R. B. Wysolmerski (1995). "Myosin light chain kinase-regulated endothelial cell contraction: the relationship between isometric tension, actin polymerization, and myosin phosphorylation." *J Cell Biol* **130**(3): 613-627.

Bibliographie

- Gonzalez-Mariscal, L., A. Betanzos and A. Avila-Flores (2000). "MAGUK proteins: structure and role in the tight junction." *Semin Cell Dev Biol* **11**(4): 315-324.
- Goode, B. L., D. G. Drubin and G. Barnes (2000). "Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons." *Curr Opin Cell Biol* **12**(1): 63-71.
- Gremm, D. and A. Wegner (2000). "Gelsolin as a calcium-regulated actin filament-capping protein." *Eur J Biochem* **267**(14): 4339-4345.
- Griffin, M. A., S. Sen, H. L. Sweeney and D. E. Discher (2004). "Adhesion-contractile balance in myocyte differentiation." *J Cell Sci* **117**(Pt 24): 5855-5863.
- Grotte, G. (1956). "Passage of dextran molecules across the blood-lymph barrier." *Acta Chir Scand Suppl* **211**: 1-84.
- Guck, J., S. Schinkinger, B. Lincoln, F. Wottawah, S. Ebert, M. Romeyke, D. Lenz, H. M. Erickson, R. Ananthakrishnan, D. Mitchell, J. Kas, S. Ulvick and C. Bilby (2005). "Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence." *Biophys J* **88**(5): 3689-3698.
- Hadden, H. L. and C. A. Henke (2000). "Induction of lung fibroblast apoptosis by soluble fibronectin peptides." *Am J Respir Crit Care Med* **162**(4 Pt 1): 1553-1560.
- Harris, A. K., P. Wild and D. Stopak (1980). "Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion." *Science* **208**(4440): 177-179.
- Harris, B. Z. and W. A. Lim (2001). "Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly." *J Cell Sci* **114**(Pt 18): 3219-3231.
- Hart, M. J., M. G. Callow, B. Souza and P. Polakis (1996). "IQGAP1, a calmodulin-binding protein with a rasGAP-related domain, is a potential effector for cdc42Hs." *EMBO J* **15**(12): 2997-3005.
- He, Y. and F. Grinnell (1994). "Stress relaxation of fibroblasts activates a cyclic AMP signaling pathway." *J Cell Biol* **126**(2): 457-464.
- Heil, P. and J. P. Spatz (2010). "Lateral shear forces applied to cells with single elastic micropillars to influence focal adhesion dynamics." *J Phys Condens Matter* **22**(19): 194108.
- Helmke, B. P., A. B. Rosen and P. F. Davies (2003). "Mapping mechanical strain of an endogenous cytoskeletal network in living endothelial cells." *Biophys J* **84**(4): 2691-2699.
- Hinterdorfer, P., W. Baumgartner, H. J. Gruber, K. Schilcher and H. Schindler (1996). "Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(8): 3477-3481.
- Hirase, T., S. Kawashima, E. Y. Wong, T. Ueyama, Y. Rikitake, S. Tsukita, M. Yokoyama and J. M. Staddon (2001). "Regulation of tight junction permeability and occludin phosphorylation by RhoA-p160ROCK-dependent and -independent mechanisms." *J Biol Chem* **276**(13): 10423-10431.
- Hirase, T., J. M. Staddon, M. Saitou, Y. Ando-Akatsuka, M. Itoh, M. Furuse, K. Fujimoto, S. Tsukita and L. L. Rubin (1997). "Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells." *J Cell Sci* **110** (Pt 14): 1603-1613.
- Hoffman, B. D. and J. C. Crocker (2009). "Cell mechanics: dissecting the physical responses of cells to force." *Annu Rev Biomed Eng* **11**: 259-288.
- Hofmann, U. G., C. Rotsch, W. J. Parak and M. Radmacher (1997). "Investigating the cytoskeleton of chicken cardiocytes with the atomic force microscope." *J Struct Biol* **119**(2): 84-91.
- Hordijk, P. L., E. Anthony, F. P. Mul, R. Rientsma, L. C. Oomen and D. Roos (1999). "Vascular-endothelial-cadherin modulates endothelial monolayer permeability." *J Cell Sci* **112** (Pt 12): 1915-1923.
- Hu, S., J. Chen, B. Fabry, Y. Numaguchi, A. Gouldstone, D. E. Ingber, J. J. Fredberg, J. P. Butler and N. Wang (2003). "Intracellular stress tomography reveals stress focusing and structural anisotropy in cytoskeleton of living cells." *Am J Physiol Cell Physiol* **285**(5): C1082-1090.
- Hu, S., L. Eberhard, J. Chen, J. C. Love, J. P. Butler, J. J. Fredberg, G. M. Whitesides and N. Wang (2004). "Mechanical anisotropy of adherent cells probed by a three-dimensional magnetic twisting device." *Am J Physiol Cell Physiol* **287**(5): C1184-1191.

Bibliographie

- Hu, S. and N. Wang (2006). "Control of stress propagation in the cytoplasm by prestress and loading frequency." *Mol Cell Biomech* **3**(2): 49-60.
- Huber, A., P. Sander, M. Bahner and R. Paulsen (1998). "The TRP Ca²⁺ channel assembled in a signaling complex by the PDZ domain protein INAD is phosphorylated through the interaction with protein kinase C (ePKC)." *FEBS Lett* **425**(2): 317-322.
- Huber, A. H., D. B. Stewart, D. V. Laurents, W. J. Nelson and W. I. Weis (2001). "The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover." *J Biol Chem* **276**(15): 12301-12309.
- Hubmayr, R. D. (2002). "Perspective on lung injury and recruitment: a skeptical look at the opening and collapse story." *Am J Respir Crit Care Med* **165**(12): 1647-1653.
- Humphrey, D., C. Duggan, D. Saha, D. Smith and J. Kas (2002). "Active fluidization of polymer networks through molecular motors." *Nature* **416**(6879): 413-416.
- Huxley, V. H. and D. A. Williams (2000). "Role of a glycocalyx on coronary arteriole permeability to proteins: evidence from enzyme treatments." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**(4): H1177-1185.
- Huynh, J., N. Nishimura, K. Rana, J. M. Peloquin, J. P. Califano, C. R. Montague, M. R. King, C. B. Schaffer and C. A. Reinhart-King (2011). "Age-related intimal stiffening enhances endothelial permeability and leukocyte transmigration." *Sci Transl Med* **3**(112): 112ra122.
- Hynes, R. O. (2004). "The emergence of integrins: a personal and historical perspective." *Matrix Biol* **23**(6): 333-340.
- Hynes, R. O., B. L. Bader and K. Hodivala-Dilke (1999). "Integrins in vascular development." *Braz J Med Biol Res* **32**(5): 501-510.
- Icard-Arcizet, D., O. Cardoso, A. Richert and S. Henon (2008). "Cell stiffening in response to external stress is correlated to actin recruitment." *Biophys J* **94**(7): 2906-2913.
- Ingber, D. and J. Folkman (1988). "Inhibition of angiogenesis through modulation of collagen metabolism." *Lab Invest* **59**(1): 44-51.
- Ingber, D. E. (1993). "Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton." *Journal Of Cell Science* **104 (Pt 3)**: 613-627.
- Ingber, D. E. (2000). "Opposing views on tensegrity as a structural framework for understanding cell mechanics." *J Appl Physiol* (1985) **89**(4): 1663-1670.
- Ingber, D. E. (2003). "Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology." *J Cell Sci* **116**(Pt 7): 1157-1173.
- Ingber, D. E. (2006). "Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again." *FASEB J* **20**(7): 811-827.
- Ingber, D. E., D. Prusty, Z. Sun, H. Betensky and N. Wang (1995). "Cell shape, cytoskeletal mechanics, and cell cycle control in angiogenesis." *J Biomech* **28**(12): 1471-1484.
- Iruela-Arispe, M. L., C. A. Diglio and E. H. Sage (1991). "Modulation of extracellular matrix proteins by endothelial cells undergoing angiogenesis in vitro." *Arterioscler Thromb* **11**(4): 805-815.
- Isabey, D., S. Fereol, A. Caluch, R. Fodil, B. Louis and G. Pelle (2013). "Force distribution on multiple bonds controls the kinetics of adhesion in stretched cells." *J Biomech* **46**(2): 307-313.
- Itoh, M., A. Nagafuchi, S. Yonemura, T. Kitani-Yasuda, S. Tsukita and S. Tsukita (1993). "The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy." *J Cell Biol* **121**(3): 491-502.
- Janmey, P. A. (1998). "The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling." *Physiol Rev* **78**(3): 763-781.
- Janmey, P. A., U. Euteneuer, P. Traub and M. Schliwa (1991). "Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks." *J Cell Biol* **113**(1): 155-160.
- Janmey, P. A., S. Hvidt, J. Lamb and T. P. Stossel (1990). "Resemblance of actin-binding protein/actin gels to covalently crosslinked networks." *Nature* **345**(6270): 89-92.

Bibliographie

- Janmey, P. A. and C. A. McCulloch (2007). "Cell mechanics: integrating cell responses to mechanical stimuli." *Annu Rev Biomed Eng* **9**: 1-34.
- Jungbauer, S., H. Gao, J. P. Spatz and R. Kemkemer (2008). "Two characteristic regimes in frequency-dependent dynamic reorientation of fibroblasts on cyclically stretched substrates." *Biophys J* **95**(7): 3470-3478.
- Kalluri, R. (2003). "Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis." *Nat Rev Cancer* **3**(6): 422-433.
- Kato, Y., J. M. Lewalle, Y. Baba, M. Tsukuda, N. Sakai, M. Baba, K. Kobayashi, S. Koshika, Y. Nagashima, F. Frankenne, A. Noel, J. M. Foidart and R. I. Hata (2001). "Induction of SPARC by VEGF in human vascular endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* **287**(2): 422-426.
- Kawano, K., S. S. Kantak, M. Murai, C. C. Yao and R. H. Kramer (2001). "Integrin alpha3beta1 engagement disrupts intercellular adhesion." *Exp Cell Res* **262**(2): 180-196.
- Kielbassa, K., C. Schmitz and V. Gerke (1998). "Disruption of endothelial microfilaments selectively reduces the transendothelial migration of monocytes." *Exp Cell Res* **243**(1): 129-141.
- Klymkowsky, M. W. (1999). "Weaving a tangled web: the interconnected cytoskeleton." *Nat Cell Biol* **1**(5): E121-123.
- Kolobow, T., M. P. Moretti, R. Fumagalli, D. Mascheroni, P. Prato, V. Chen and M. Joris (1987). "Severe impairment in lung function induced by high peak airway pressure during mechanical ventilation. An experimental study." *Am Rev Respir Dis* **135**(2): 312-315.
- Kolodney, M. S. and R. B. Wysolmerski (1992). "Isometric contraction by fibroblasts and endothelial cells in tissue culture: a quantitative study." *J Cell Biol* **117**(1): 73-82.
- Koolman, J., K.-H. Röhm and J. r. Wirth (2005). "Color Atlas of Biochemistry." (2nd edition): 476.
- Kornau, H. C., L. T. Schenker, M. B. Kennedy and P. H. Seeburg (1995). "Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95." *Science* **269**(5231): 1737-1740.
- Ladoux, B., E. Anon, M. Lambert, A. Rabodzey, P. Hersen, A. Buguin, P. Silberzan and R. M. Mege (2010). "Strength dependence of cadherin-mediated adhesions." *Biophys J* **98**(4): 534-542.
- Languino, L. R., K. R. Gehlsen, E. Wayner, W. G. Carter, E. Engvall and E. Ruoslahti (1989). "Endothelial cells use alpha 2 beta 1 integrin as a laminin receptor." *J Cell Biol* **109**(5): 2455-2462.
- Lauffenburger, D. A. and A. F. Horwitz (1996). "Cell Migration: a physically integrated molecular process." *Cell* **84**: 359-369.
- Laurent, V. M., P. Cañadas, R. Fodil, E. Planus, A. Asnacios, S. Wendling and D. Isabey (2002). "Tensegrity behaviour of cortical and cytosolic cytoskeletal components in twisted living adherent cells." *Acta Biotheor* **50**(4): 331-356.
- Laurent, V. M., R. Fodil, P. Canadas, S. Féreol, B. Louis, E. Planus and D. Isabey (2003). "Partitioning of cortical and deep cytoskeleton responses from transient magnetic bead twisting." *Ann Biomed Eng* **31**(10): 1263-1278.
- 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." *Journal of Biomechanical Engineering* **124**(4): 408-421.
- Laurent, V. M., E. Planus, R. Fodil and D. Isabey (2003). "Mechanical assessment by magnetocytometry of the cytosolic and cortical cytoskeletal compartments in adherent epithelial cells." *Biorheology* **40**(1-3): 235-240.
- Lawler, J. and R. O. Hynes (1989). "An integrin receptor on normal and thrombasthenic platelets that binds thrombospondin." *Blood* **74**(6): 2022-2027.
- Lee, C. K., Y. M. Wang, L. S. Huang and S. Lin (2007). "Atomic force microscopy: determination of unbinding force, off rate and energy barrier for protein-ligand interaction." *Micron* **38**(5): 446-461.

Bibliographie

- Legrand, P., S. Bibert, M. Jaquinod, C. Ebel, E. Hewat, F. Vincent, C. Vanbelle, E. Concord, T. Vernet and D. Gulino (2001). "Self-assembly of the vascular endothelial cadherin ectodomain in a Ca²⁺-dependent hexameric structure." *J Biol Chem* **276**(5): 3581-3588.
- Lele, T. P., J. E. Sero, B. D. Matthews, S. Kumar, S. Xia, M. Montoya-Zavala, T. Polte, D. Overby, N. Wang and D. E. Ingber (2007). "Tools to study cell mechanics and mechanotransduction." *Methods Cell Biol* **83**: 443-472.
- Levental, K. R., H. Yu, L. Kass, J. N. Lakins, M. Egeblad, J. T. Erler, S. F. Fong, K. Csiszar, A. Giaccia, W. Weninger, M. Yamauchi, D. L. Gasser and V. M. Weaver (2009). "Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling." *Cell* **139**(5): 891-906.
- Li, J., Y. P. Zhang and R. S. Kirsner (2003). "Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix." *Microsc Res Tech* **60**(1): 107-114.
- Li, L. F., S. K. Liao, C. C. Huang, M. J. Hung and D. A. Quinn (2008). "Serine/threonine kinase-protein kinase B and extracellular signal-regulated kinase regulate ventilator-induced pulmonary fibrosis after bleomycin-induced acute lung injury: a prospective, controlled animal experiment." *Crit Care* **12**(4): R103.
- Li, Y. S., J. H. Haga and S. Chien (2005). "Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells." *J Biomech* **38**(10): 1949-1971.
- Liang, T. W., R. A. DeMarco, R. J. Mrsny, A. Gurney, A. Gray, J. Hooley, H. L. Aaron, A. Huang, T. Klassen, D. B. Tumas and S. Fong (2000). "Characterization of hJAM: evidence for involvement in cell-cell contact and tight junction regulation." *Am J Physiol Cell Physiol* **279**(6): C1733-1743.
- Lilien, J. and J. Balsamo (2005). "The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin." *Curr Opin Cell Biol* **17**(5): 459-465.
- Liu, M., A. K. Tanswell and M. Post (1999). "Mechanical force-induced signal transduction in lung cells." *Am J Physiol* **277**(4 Pt 1): L667-683.
- Liu, Y., B. P. Chen, M. Lu, Y. Zhu, M. B. Stemerman, S. Chien and J. Y. Shyy (2002). "Shear stress activation of SREBP1 in endothelial cells is mediated by integrins." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**(1): 76-81.
- Liu, Y., J. C. Loijens, K. H. Martin, A. V. Karginov and J. T. Parsons (2002). "The association of ASAP1, an ADP ribosylation factor-GTPase activating protein, with focal adhesion kinase contributes to the process of focal adhesion assembly." *Mol Biol Cell* **13**(6): 2147-2156.
- Lo, S. H. (2004). "Tensin." *Int J Biochem Cell Biol* **36**(1): 31-34.
- Lock, J. G., B. Wehrle-Haller and S. Stromblad (2008). "Cell-matrix adhesion complexes: master control machinery of cell migration." *Semin Cancer Biol* **18**(1): 65-76.
- MacKintosh, F. C., J. Kas and P. A. Janmey (1995). "Elasticity of semiflexible biopolymer networks." *Phys Rev Lett* **75**(24): 4425-4428.
- Maksym, G. N., B. Fabry, J. P. Butler, D. Navajas, D. J. Tschumperlin, J. D. Laporte and J. J. Fredberg (2000). "Mechanical properties of cultured human airway smooth muscle cells from 0.05 to 0.4 Hz." *Journal of Applied Physiology* **89**: 1619-1632.
- Mammoto, A., S. Huang and D. E. Ingber (2007). "Filamin links cell shape and cytoskeletal structure to Rho regulation by controlling accumulation of p190RhoGAP in lipid rafts." *J Cell Sci* **120**(Pt 3): 456-467.
- Mammoto, A., T. Mammoto and D. E. Ingber (2008). "Rho signaling and mechanical control of vascular development." *Curr Opin Hematol* **15**(3): 228-234.
- Mammoto, A., T. Mammoto, M. Kanapathipillai, C. Wing Yung, E. Jiang, A. Jiang, K. Lofgren, E. P. Gee and D. E. Ingber (2013). "Control of lung vascular permeability and endotoxin-induced pulmonary oedema by changes in extracellular matrix mechanics." *Nat Commun* **4**: 1759.
- Mammoto, T., A. Mammoto and D. E. Ingber (2013). "Mechanobiology and developmental control." *Annu Rev Cell Dev Biol* **29**: 27-61.
- Mandelkow, E. and E. M. Mandelkow (1995). "Microtubules and microtubule-associated proteins." *Curr Opin Cell Biol* **7**(1): 72-81.

Bibliographie

- Maniotis, A. J., K. Bojanowski and D. E. Ingber (1997). "Mechanical continuity and reversible chromosome disassembly within intact genomes removed from living cells." J Cell Biochem **65**(1): 114-130.
- Marsden, M. and D. W. DeSimone (2003). "Integrin-ECM interactions regulate cadherin-dependent cell adhesion and are required for convergent extension in *Xenopus*." Curr Biol **13**(14): 1182-1191.
- Matthay, M. A. and G. A. Zimmerman (2005). "Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management." Am J Respir Cell Mol Biol **33**(4): 319-327.
- May, C., J. F. Doody, R. Abdullah, P. Balderes, X. Xu, C. P. Chen, Z. Zhu, L. Shapiro, P. Kussie, D. J. Hicklin, F. Liao and P. Bohlen (2005). "Identification of a transiently exposed VE-cadherin epitope that allows for specific targeting of an antibody to the tumor neovasculature." Blood **105**(11): 4337-4344.
- Medley, Q. G., E. G. Buchbinder, K. Tachibana, H. Ngo, C. Serra-Pages and M. Streuli (2003). "Signaling between focal adhesion kinase and trio." J Biol Chem **278**(15): 13265-13270.
- Mege, R. M., J. Gavard and M. Lambert (2006). "Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton." Curr Opin Cell Biol **18**(5): 541-548.
- Mehta, D., C. Tiruppathi, R. Sandoval, R. D. Minshall, M. Holinstat and A. B. Malik (2002). "Modulatory role of focal adhesion kinase in regulating human pulmonary arterial endothelial barrier function." J Physiol **539**(Pt 3): 779-789.
- Michel, C. C. and F. E. Curry (1999). "Microvascular permeability." Physiol Rev **79**(3): 703-761.
- Mijailovich, S. M., M. Kojic, M. Zivkovic, B. Fabry and J. J. Fredberg (2002). "A finite element model of cell deformation during magnetic bead twisting." J Appl Physiol (1985) **93**(4): 1429-1436.
- Millard, T. H., S. J. Sharp and L. M. Machesky (2004). "Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex." Biochem J **380**(Pt 1): 1-17.
- Miyoshi, J. and Y. Takai (2005). "Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity." Adv Drug Deliv Rev **57**(6): 815-855.
- Morel, N. M., P. P. Petruzzo, H. B. Hechtman and D. Shepro (1990). "Inflammatory agonists that increase microvascular permeability in vivo stimulate cultured pulmonary microvessel endothelial cell contraction." Inflammation **14**(5): 571-583.
- Morita, K., M. Furuse, K. Fujimoto and S. Tsukita (1999). "Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(2): 511-516.
- Mow, V. C., C. C. Wang and C. T. Hung (1999). "The extracellular matrix, interstitial fluid and ions as a mechanical signal transducer in articular cartilage." Osteoarthritis Cartilage **7**(1): 41-58.
- Moy, A. B., K. Blackwell and A. Kamath (2002). "Differential effects of histamine and thrombin on endothelial barrier function through actin-myosin tension." Am J Physiol Heart Circ Physiol **282**(1): H21-29.
- Moy, A. B., J. Van Engelenhoven, J. Bodmer, J. Kamath, C. Keese, I. Giaever, S. Shasby and D. M. Shasby (1996). "Histamine and thrombin modulate endothelial focal adhesion through centripetal and centrifugal forces." J Clin Invest **97**(4): 1020-1027.
- Mulivor, A. W. and H. H. Lipowsky (2002). "Role of glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**(4): H1282-1291.
- Mullins, R. D., J. A. Heuser and T. D. Pollard (1998). "The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6181-6186.
- Murray, J. F., M. A. Matthay, J. M. Luce and M. R. Flick (1988). "An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome." Am Rev Respir Dis **138**(3): 720-723.
- Na, S., F. Chowdhury, B. Tay, M. Ouyang, M. Gregor, Y. Wang, G. Wiche and N. Wang (2009). "Plectin contributes to mechanical properties of living cells." Am J Physiol Cell Physiol **296**(4): C868-877.

Bibliographie

- Na, S., O. Collin, F. Chowdhury, B. Tay, M. Ouyang, Y. Wang and N. Wang (2008). "Rapid signal transduction in living cells is a unique feature of mechanotransduction." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(18): 6626-6631.
- Nagy, J. A., L. Benjamin, H. Zeng, A. M. Dvorak and H. F. Dvorak (2008). "Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis." Angiogenesis **11**(2): 109-119.
- Nawroth, R., G. Poell, A. Ranft, S. Kloep, U. Samulowitz, G. Fachinger, M. Golding, D. T. Shima, U. Deutsch and D. Vestweber (2002). "VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts." EMBO J **21**(18): 4885-4895.
- Network, T. A. R. D. S. (2000). "Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network." N Engl J Med **342**(18): 1301-1308.
- Niessen, C. M., D. Leckband and A. S. Yap (2011). "Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation." Physiol Rev **91**(2): 691-731.
- Nitta, T., M. Hata, S. Gotoh, Y. Seo, H. Sasaki, N. Hashimoto, M. Furuse and S. Tsukita (2003). "Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice." J Cell Biol **161**(3): 653-660.
- Nobes, C. D. and A. Hall (1995). "Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility." Biochem Soc Trans **23**(3): 456-459.
- Nojima, Y., N. Morino, T. Mimura, K. Hamasaki, H. Furuya, R. Sakai, T. Sato, K. Tachibana, C. Morimoto, Y. Yazaki and et al. (1995). "Integrin-mediated cell adhesion promotes tyrosine phosphorylation of p130Cas, a Src homology 3-containing molecule having multiple Src homology 2-binding motifs." J Biol Chem **270**(25): 15398-15402.
- Ohayon, J. and P. Tracqui (2005). "Computation of adherent cell elasticity for critical cell-bead geometry in magnetic twisting experiments." Ann Biomed Eng **33**(2): 131-141.
- Ohayon, J., P. Tracqui, R. Fodil, S. Fereol, V. M. Laurent, E. Planus and D. Isabey (2004). "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**(6): 685-698.
- Ohta, Y., N. Suzuki, S. Nakamura, J. H. Hartwig and T. P. Stossel (1999). "The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 2122-2128.
- Oliver, T., M. Dembo and K. Jacobson (1999). "Separation of propulsive and adhesive traction stresses in locomoting keratocytes." J Cell Biol **145**(3): 589-604.
- Orfanos, S. E., I. Mavrommati, I. Korovesi and C. Roussos (2004). "Pulmonary endothelium in acute lung injury: from basic science to the critically ill." Intensive Care Med **30**(9): 1702-1714.
- Orr, A. W., R. Stockton, M. B. Simmers, J. M. Sanders, I. J. Sarembock, B. R. Blackman and M. A. Schwartz (2007). "Matrix-specific p21-activated kinase activation regulates vascular permeability in atherogenesis." J Cell Biol **176**(5): 719-727.
- Overby, D. R., B. D. Matthews, E. Alsberg and D. E. Ingber (2005). "Novel dynamic rheological behavior of individual focal adhesions measured within single cells using electromagnetic pulling cytometry." Acta Biomater **1**(3): 295-303.
- Pappenheimer, J. R., E. M. Renkin and L. M. Borrero (1951). "Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes; a contribution to the pore theory of capillary permeability." Am J Physiol **167**(1): 13-46.
- Parker, J. C., E. C. Breen and J. B. West (1997). "High vascular and airway pressures increase interstitial protein mRNA expression in isolated rat lungs." J Appl Physiol (1985) **83**(5): 1697-1705.
- Parker, J. C., M. I. Townsley, B. Rippe, A. E. Taylor and J. Thigpen (1984). "Increased microvascular permeability in dog lungs due to high peak airway pressures." J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol **57**(6): 1809-1816.

Bibliographie

- Partridge, C. A., C. J. Horvath, P. J. Del Vecchio, P. G. Phillips and A. B. Malik (1992). "Influence of extracellular matrix in tumor necrosis factor-induced increase in endothelial permeability." *Am J Physiol* **263**(6 Pt 1): L627-633.
- Partridge, C. A., J. J. Jeffrey and A. B. Malik (1993). "A 96-kDa gelatinase induced by TNF-alpha contributes to increased microvascular endothelial permeability." *Am J Physiol* **265**(5 Pt 1): L438-447.
- Passi, A., D. Negrini, R. Albertini, G. Misericocchi and G. De Luca (1999). "The sensitivity of versican from rabbit lung to gelatinase A (MMP-2) and B (MMP-9) and its involvement in the development of hydraulic lung edema." *FEBS Lett* **456**(1): 93-96.
- Paszek, M. J. and V. M. Weaver (2004). "The tension mounts: mechanics meets morphogenesis and malignancy." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **9**(4): 325-342.
- Paszek, M. J., N. Zahir, K. R. Johnson, J. N. Lakin, G. I. Rozenberg, A. Gefen, C. A. Reinhart-King, S. S. Margulies, M. Dembo, D. Boettiger, D. A. Hammer and V. M. Weaver (2005). "Tensional homeostasis and the malignant phenotype." *Cancer Cell* **8**(3): 241-254.
- Patel, S. D., C. Ciatto, C. P. Chen, F. Bahna, M. Rajebhosale, N. Arkus, I. Schieren, T. M. Jessell, B. Honig, S. R. Price and L. Shapiro (2006). "Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity." *Cell* **124**(6): 1255-1268.
- Patton, W. F., M. U. Yoon, J. S. Alexander, N. Chung-Welch, H. B. Hechtman and D. Shepro (1990). "Expression of simple epithelial cytokeratins in bovine pulmonary microvascular endothelial cells." *J Cell Physiol* **143**(1): 140-149.
- Pelham, R. J., Jr. and Y. Wang (1997). "Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13661-13665.
- Petrache, I., A. Birukova, S. I. Ramirez, J. G. Garcia and A. D. Verin (2003). "The role of the microtubules in tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial cell permeability." *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**(5): 574-581.
- Phillips, P. G., H. Lum, A. B. Malik and M. F. Tsan (1989). "Phalloidin prevents thrombin-induced increases in endothelial permeability to albumin." *Am J Physiol* **257**(3 Pt 1): C562-567.
- Pierschbacher, M. D. and E. Ruoslahti (1984). "Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(19): 5985-5988.
- Planus, E., S. Galiacy, S. Fereol, R. Fodil, V. M. Laurent, M. P. d'Ortho and D. Isabey (2005). "Apical rigidity of an epithelial cell monolayer evaluated by magnetic twisting cytometry: ICAM-1 versus integrin linkages to F-actin structure." *Clin Hemorheol Microcirc* **33**(3): 277-291.
- Planus, E., S. Galiacy, M. Matthay, V. Laurent, J. Gavrilovic, G. Murphy, C. Clérici, D. Isabey, C. Lafuma and M. P. d'Ortho (1999). "Role of collagenase in mediating in vitro alveolar epithelial wound repair." *Journal Of Cell Science* **112** (Pt 2): 243-252.
- Pober, J. S. and W. C. Sessa (2007). "Evolving functions of endothelial cells in inflammation." *Nat Rev Immunol* **7**(10): 803-815.
- Poli, A., R. M. Mason and J. R. Levick (2004). "Effects of Arg-Gly-Asp sequence peptide and hyperosmolarity on the permeability of interstitial matrix and fenestrated endothelium in joints." *Microcirculation* **11**(6): 463-476.
- Pollard, T. D. (1990). "Actin." *Curr Opin Cell Biol* **2**(1): 33-40.
- Pollard, T. D. (2007). "Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **36**: 451-477.
- Polte, T. R., G. S. Eichler, N. Wang and D. E. Ingber (2004). "Extracellular matrix controls myosin light chain phosphorylation and cell contractility through modulation of cell shape and cytoskeletal prestress." *Am J Physiol Cell Physiol* **286**(3): C518-528.
- Potter, M. D., S. Barbero and D. A. Cheresh (2005). "Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state." *J Biol Chem* **280**(36): 31906-31912.
- Pratt, B. M., D. Form and J. A. Madri (1985). "Endothelial cell-extracellular matrix interactions." *Ann N Y Acad Sci* **460**: 274-288.

Bibliographie

- Provenzano, P. P. and P. J. Keely (2011). "Mechanical signaling through the cytoskeleton regulates cell proliferation by coordinated focal adhesion and Rho GTPase signaling." *J Cell Sci* **124**(Pt 8): 1195-1205.
- Puklin-Faucher, E. and M. P. Sheetz (2009). "The mechanical integrin cycle." *J Cell Sci* **122**(Pt 2): 179-186.
- Qian, J. and H. Gao (2010). "Soft matrices suppress cooperative behaviors among receptor-ligand bonds in cell adhesion." *PLoS One* **5**(8): e12342.
- Qian, J., J. Wang and H. Gao (2008). "Lifetime and strength of adhesive molecular bond clusters between elastic media." *Langmuir* **24**(4): 1262-1270.
- Qiao, R. L., H. S. Wang, W. Yan, L. E. Odekon, P. J. Del Vecchio, T. J. Smith and A. B. Malik (1995). "Extracellular matrix hyaluronan is a determinant of the endothelial barrier." *Am J Physiol* **269**(1 Pt 1): C103-109.
- Qiao, R. L., W. Yan, H. Lum and A. B. Malik (1995). "Arg-Gly-Asp peptide increases endothelial hydraulic conductivity: comparison with thrombin response." *Am J Physiol* **269**(1 Pt 1): C110-117.
- Quadri, S. K. (2012). "Cross talk between focal adhesion kinase and cadherins: role in regulating endothelial barrier function." *Microvasc Res* **83**(1): 3-11.
- Rand, R. P. and A. C. Burton (1964). "MECHANICAL PROPERTIES OF THE RED CELL MEMBRANE. I. MEMBRANE STIFFNESS AND INTRACELLULAR PRESSURE." *Biophys J* **4**: 115-135.
- Reinhard, M., K. Jouvenal, D. Tripier and U. Walter (1995). "Identification, purification, and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(17): 7956-7960.
- Resnikoff, M., T. Brien, P. A. Vincent, R. F. Rotundo, E. Lewis, P. J. McKeown-Longo and T. M. Saba (1999). "Lung matrix incorporation of plasma fibronectin reduces vascular permeability in postsurgical bacteremia." *Am J Physiol* **277**(4 Pt 1): L749-759.
- Ricard, J. D., D. Dreyfuss and G. Saumon (2003). "Ventilator-induced lung injury." *Eur Respir J Suppl* **42**: 2s-9s.
- Ridley, A. J., M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons and A. R. Horwitz (2003). "Cell migration: integrating signals from front to back." *Science* **302**(5651): 1704-1709.
- Rimm, D. L., E. R. Koslov, P. Kebriaei, C. D. Cianci and J. S. Morrow (1995). "Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(19): 8813-8817.
- Rosenblatt, N., S. Hu, J. Chen, N. Wang and D. Stamenovic (2004). "Distending stress of the cytoskeleton is a key determinant of cell rheological behavior." *Biochem Biophys Res Commun* **321**(3): 617-622.
- Rottner, K., A. Hall and J. V. Small (1999). "Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics." *Curr Biol* **9**(12): 640-648.
- Rozario, T. and D. W. DeSimone (2010). "The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view." *Dev Biol* **341**(1): 126-140.
- Ruoslahti, E. (1991). "Integrins." *J Clin Invest* **87**(1): 1-5.
- Ruoslahti, E. and M. D. Pierschbacher (1987). "New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins." *Science* **238**(4826): 491-497.
- Sakamoto, Y., H. Ogita, H. Komura and Y. Takai (2008). "Involvement of nectin in inactivation of integrin alpha(v)beta(3) after the establishment of cell-cell adhesion." *J Biol Chem* **283**(1): 496-505.
- Sakisaka, T., W. Ikeda, H. Ogita, N. Fujita and Y. Takai (2007). "The roles of nectins in cell adhesions: cooperation with other cell adhesion molecules and growth factor receptors." *Curr Opin Cell Biol* **19**(5): 593-602.
- Satchi-Fainaro, R., R. Mamluk, L. Wang, S. M. Short, J. A. Nagy, D. Feng, A. M. Dvorak, H. F. Dvorak, M. Puder, D. Mukhopadhyay and J. Folkman (2005). "Inhibition of vessel permeability by TNP-470 and its polymer conjugate, caplostatin." *Cancer Cell* **7**(3): 251-261.

Bibliographie

- Sato, M., N. Ohshima and R. M. Nerem (1996). "Viscoelastic properties of cultured porcine aortic endothelial cells exposed to shear stress." *J Biomech* **29**(4): 461-467.
- Sato, M., W. H. Schwarz and T. D. Pollard (1987). "Dependence of the mechanical properties of actin/alpha-actinin gels on deformation rate." *Nature* **325**(6107): 828-830.
- Schlaepfer, D. D. and S. K. Mitra (2004). "Multiple connections link FAK to cell motility and invasion." *Curr Opin Genet Dev* **14**(1): 92-101.
- Schnittler, H. J., B. Puschel and D. Drenckhahn (1997). "Role of cadherins and plakoglobin in interendothelial adhesion under resting conditions and shear stress." *Am J Physiol* **273**(5 Pt 2): H2396-2405.
- Schumacker, P. T. (2002). "Straining to understand mechanotransduction in the lung." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282**(5): L881-882.
- Schwartz, M. A. and M. H. Ginsberg (2002). "Networks and crosstalk: integrin signalling spreads." *Nat Cell Biol* **4**(4): E65-68.
- Schwartz, M. A., M. D. Schaller and M. H. Ginsberg (1995). "Integrins: emerging paradigms of signal transduction." *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**: 549-599.
- Shasby, D. M., S. S. Shasby, J. M. Sullivan and M. J. Peach (1982). "Role of endothelial cell cytoskeleton in control of endothelial permeability." *Circ Res* **51**(5): 657-661.
- Shasby, D. M., T. Stevens, D. Ries, A. B. Moy, J. M. Kamath, A. M. Kamath and S. S. Shasby (1997). "Thrombin inhibits myosin light chain dephosphorylation in endothelial cells." *Am J Physiol* **272**(2 Pt 1): L311-319.
- Shen, Q., M. H. Wu and S. Y. Yuan (2009). "Endothelial contractile cytoskeleton and microvascular permeability." *Cell Health Cytoskelet* **2009**(1): 43-50.
- Sheppard, D. (2004). "Roles of alpha v integrins in vascular biology and pulmonary pathology." *Curr Opin Cell Biol* **16**(5): 552-557.
- Shin, D. and K. Athanasiou (1999). "Cytoindentation for obtaining cell biomechanical properties." *J Orthop Res* **17**(6): 880-890.
- Shroff, S. G., D. R. Saner and R. Lal (1995). "Dynamic micromechanical properties of cultured rat atrial myocytes measured by atomic force microscopy." *Am J Physiol* **269**(1 Pt 1): C286-292.
- Simionescu, N., M. Simionescu and G. E. Palade (1981). "Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium. I. Preferential distribution of anionic sites." *J Cell Biol* **90**(3): 605-613.
- Singh, B., C. Fu and J. Bhattacharya (2000). "Vascular expression of the alpha(v)beta(3)-integrin in lung and other organs." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **278**(1): L217-226.
- Sitko, J. C., E. M. Mateescu and H. G. Hansma (2003). "Sequence-dependent DNA condensation and the electrostatic zipper." *Biophys J* **84**(1): 419-431.
- Small, J. V., M. Herzog and K. Anderson (1995). "Actin filament organization in the fish keratocyte lamellipodium." *J Cell Biol* **129**(5): 1275-1286.
- Smith, J. W. and D. A. Cheresh (1990). "Integrin (alpha v beta 3)-ligand interaction. Identification of a heterodimeric RGD binding site on the vitronectin receptor." *J Biol Chem* **265**(4): 2168-2172.
- Soellner, P., R. A. Quinlan and W. W. Franke (1985). "Identification of a distinct soluble subunit of an intermediate filament protein: tetrameric vimentin from living cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(23): 7929-7933.
- Soler, M., S. Desplat-Jego, B. Vacher, L. Ponsonnet, M. Fraterno, P. Bongrand, J. M. Martin and C. Foa (1998). "Adhesion-related glycocalyx study: quantitative approach with imaging-spectrum in the energy filtering transmission electron microscope (EFTEM)." *FEBS Lett* **429**(1): 89-94.
- Spring, K. R. (1998). "Routes and mechanism of fluid transport by epithelia." *Annu Rev Physiol* **60**: 105-119.
- Squire, J. M., M. Chew, G. Nneji, C. Neal, J. Barry and C. Michel (2001). "Quasi-periodic substructure in the microvessel endothelial glycocalyx: a possible explanation for molecular filtering?" *J Struct Biol* **136**(3): 239-255.

Bibliographie

- Stahlhut, M. and B. van Deurs (2000). "Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton." *Mol Biol Cell* **11**(1): 325-337.
- Stamenovic, D. (2005). "Effects of cytoskeletal prestress on cell rheological behavior." *Acta Biomater* **1**(3): 255-262.
- Stamenovic, D. and D. E. Ingber (2002). "Models of cytoskeletal mechanics of adherent cells." *Biomech Model Mechanobiol* **1**(1): 95-108.
- Stamenovic, D., B. Suki, B. Fabry, N. Wang and J. J. Fredberg (2004). "Rheology of airway smooth muscle cells is associated with cytoskeletal contractile stress." *J Appl Physiol* (1985) **96**(5): 1600-1605.
- Stamenovic, D. and N. Wang (2000). "Invited review: engineering approaches to cytoskeletal mechanics." *J Appl Physiol* **89**(5): 2085-2090.
- Stickel, S. K. and Y. L. Wang (1988). "Synthetic peptide GRGDS induces dissociation of alpha-actinin and vinculin from the sites of focal contacts." *J Cell Biol* **107**(3): 1231-1239.
- Stossel, T. P. (1993). "On the crawling of animal cells." *Science* **260**(5111): 1086-1094.
- Strelkov, S. V., H. Herrmann and U. Aebi (2003). "Molecular architecture of intermediate filaments." *Bioessays* **25**(3): 243-251.
- Stromberg, D. D. and C. A. Wiederhielm (1969). "Viscoelastic description of a collagenous tissue in simple elongation." *J Appl Physiol* **26**(6): 857-862.
- Su, G., M. Hodnett, N. Wu, A. Atakilit, C. Kosinski, M. Godzich, X. Z. Huang, J. K. Kim, J. A. Frank, M. A. Matthay, D. Sheppard and J. F. Pittet (2007). "Integrin alphavbeta5 regulates lung vascular permeability and pulmonary endothelial barrier function." *Am J Respir Cell Mol Biol* **36**(3): 377-386.
- Suetsugu, S. and T. Takenawa (2003). "Regulation of cortical actin networks in cell migration." *Int Rev Cytol* **229**: 245-286.
- Suki, B., S. Ito, D. Stamenovic, K. R. Lutchen and E. P. Ingenito (2005). "Biomechanics of the lung parenchyma: critical roles of collagen and mechanical forces." *J Appl Physiol* (1985) **98**(5): 1892-1899.
- Taddei, A., C. Giampietro, A. Conti, F. Orsenigo, F. Breviario, V. Pirazzoli, M. Potente, C. Daly, S. Dimmeler and E. Dejana (2008). "Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5." *Nat Cell Biol* **10**(8): 923-934.
- Takai, E., R. Landesberg, R. W. Katz, C. T. Hung and X. E. Guo (2006). "Substrate modulation of osteoblast adhesion strength, focal adhesion kinase activation, and responsiveness to mechanical stimuli." *Mol Cell Biomech* **3**(1): 1-12.
- Takeichi, M. (1990). "Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion." *Annu Rev Biochem* **59**: 237-252.
- Tan, J. L., J. Tien, D. M. Pirone, D. S. Gray, K. Bhadriraju and C. S. Chen (2003). "Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4): 1484-1489.
- Tarone, G., G. Stefanuto, P. Mascarello, P. Defilippi, F. Altruda and L. Silengo (1990). "Expression of receptors for extracellular matrix proteins in human endothelial cells." *J Lipid Mediat* **2 Suppl**: S45-53.
- Theret, D. P., M. J. Levesque, M. Sato, R. M. Nerem and L. T. Wheeler (1988). "The application of a homogeneous half-space model in the analysis of endothelial cell micropipette measurements." *J Biomech Eng* **110**(3): 190-199.
- Thoumine, O., M. Lambert, R. M. Mege and D. Choquet (2006). "Regulation of N-cadherin dynamics at neuronal contacts by ligand binding and cytoskeletal coupling." *Mol Biol Cell* **17**(2): 862-875.
- Tozzi, C. A., G. J. Poiani, A. M. Harangozo, C. D. Boyd and D. J. Riley (1989). "Pressure-induced connective tissue synthesis in pulmonary artery segments is dependent on intact endothelium." *J Clin Invest* **84**(3): 1005-1012.
- Trap-Jensen, J. and N. A. Lassen (1970). "Capillary permeability for smaller hydrophilic tracers in exercising skeletal muscle in normal man and in patients with long-term diabetes mellitus." (The Alfred Benzon Symposium II).

Bibliographie

- Trickey, W. R., T. P. Vail and F. Guilak (2004). "The role of the cytoskeleton in the viscoelastic properties of human articular chondrocytes." *J Orthop Res* **22**(1): 131-139.
- Tsai, J. and L. Kam (2009). "Rigidity-dependent cross talk between integrin and cadherin signaling." *Biophys J* **96**(6): L39-41.
- Tsukada, H., X. Ying, C. Fu, S. Ishikawa, P. McKeown-Longo, S. Albelda, S. Bhattacharya, B. A. Bray and J. Bhattacharya (1995). "Ligation of endothelial alpha v beta 3 integrin increases capillary hydraulic conductivity of rat lung." *Circ Res* **77**(4): 651-659.
- Tsukasaki, Y., K. Kitamura, K. Shimizu, A. H. Iwane, Y. Takai and T. Yanagida (2007). "Role of multiple bonds between the single cell adhesion molecules, nectin and cadherin, revealed by high sensitive force measurements." *J Mol Biol* **367**(4): 996-1006.
- Tsukimoto, K., O. Mathieu-Costello, R. Prediletto, A. R. Elliott and J. B. West (1991). "Ultrastructural appearances of pulmonary capillaries at high transmural pressures." *J Appl Physiol* (1985) **71**(2): 573-582.
- Turowski, P., R. Martinelli, R. Crawford, D. Wateridge, A. P. Papageorgiou, M. G. Lampugnani, A. C. Gamp, D. Vestweber, P. Adamson, E. Dejana and J. Greenwood (2008). "Phosphorylation of vascular endothelial cadherin controls lymphocyte emigration." *J Cell Sci* **121**(Pt 1): 29-37.
- Tzima, E., M. A. del Pozo, S. J. Shattil, S. Chien and M. A. Schwartz (2001). "Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment." *EMBO J* **20**(17): 4639-4647.
- Ueda, K., Y. Ohta and H. Hosoya (2003). "The carboxy-terminal pleckstrin homology domain of ROCK interacts with filamin-A." *Biochem Biophys Res Commun* **301**(4): 886-890.
- Uhlig, S. (2002). "Ventilation-induced lung injury and mechanotransduction: stretching it too far?" *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282**(5): L892-896.
- Valberg, P. A. and D. F. Albertini (1985). "Cytoplasmic motions, rheology, and structure probed by a novel magnetic particle method." *J Cell Biol* **101**(1): 130-140.
- Valberg, P. A. and J. P. Butler (1987). "Magnetic particle motions within living cells. Physical theory and techniques." *Biophys J* **52**(4): 537-550.
- Valberg, P. A. and H. A. Feldman (1987). "Magnetic particle motions within living cells. Measurement of cytoplasmic viscosity and motile activity." *Biophys J* **52**(4): 551-561.
- van Buul, J. D., F. P. van Alphen and P. L. Hordijk (2009). "The presence of alpha-catenin in the VE-cadherin complex is required for efficient transendothelial migration of leukocytes." *Int J Biol Sci* **5**(7): 695-705.
- van Horck, F. P., M. R. Ahmadian, L. C. Haeusler, W. H. Moolenaar and O. Kranenburg (2001). "Characterization of p190RhoGEF, a RhoA-specific guanine nucleotide exchange factor that interacts with microtubules." *J Biol Chem* **276**(7): 4948-4956.
- Vandenbroucke, E., D. Mehta, R. Minshall and A. B. Malik (2008). "Regulation of endothelial junctional permeability." *Ann N Y Acad Sci* **1123**: 134-145.
- Venkiteswaran, K., K. Xiao, S. Summers, C. C. Calkins, P. A. Vincent, K. Pumiglia and A. P. Kowalczyk (2002). "Regulation of endothelial barrier function and growth by VE-cadherin, plakoglobin, and beta-catenin." *Am J Physiol Cell Physiol* **283**(3): C811-821.
- Verin, A. D., A. Birukova, P. Wang, F. Liu, P. Becker, K. Birukov and J. G. Garcia (2001). "Microtubule disassembly increases endothelial cell barrier dysfunction: role of MLC phosphorylation." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**(3): L565-574.
- Verin, A. D., L. I. Gilbert-McClain, C. E. Patterson and J. G. Garcia (1998). "Biochemical regulation of the nonmuscle myosin light chain kinase isoform in bovine endothelium." *Am J Respir Cell Mol Biol* **19**(5): 767-776.
- Vicente-Manzanares, M., C. K. Choi and A. R. Horwitz (2009). "Integrins in cell migration--the actin connection." *J Cell Sci* **122**(Pt 2): 199-206.
- Vlahakis, N. E. and R. D. Hubmayr (2000). "Invited review: plasma membrane stress failure in alveolar epithelial cells." *J Appl Physiol* **89**(6): 2490-2496; discussion 2497.
- Vlahakis, N. E. and R. D. Hubmayr (2005). "Cellular stress failure in ventilator-injured lungs." *Am J Respir Crit Care Med* **171**(12): 1328-1342.

Bibliographie

- Vlodavsky, I., J. Folkman, R. Sullivan, R. Fridman, R. Ishai-Michaeli, J. Sasse and M. Klagsbrun (1987). "Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(8): 2292-2296.
- Vlodavsky, I., R. I. Michaeli, M. Bar-Ner, R. Fridman, A. T. Horowitz, Z. Fuks and S. Biran (1988). "Involvement of heparanase in tumor metastasis and angiogenesis." *Isr J Med Sci* **24**(9-10): 464-470.
- Wachsstock, D. H., W. H. Schwartz and T. D. Pollard (1993). "Affinity of alpha-actinin for actin determines the structure and mechanical properties of actin filament gels." *Biophys J* **65**(1): 205-214.
- Wade, R. H. and A. A. Hyman (1997). "Microtubule structure and dynamics." *Curr Opin Cell Biol* **9**(1): 12-17.
- Wainwright, M. S., J. Rossi, J. Schavocky, S. Crawford, D. Steinhorn, A. V. Velentza, M. Zasadzki, V. Shirinsky, Y. Jia, J. Haiech, L. J. Van Eldik and D. M. Watterson (2003). "Protein kinase involved in lung injury susceptibility: evidence from enzyme isoform genetic knockout and in vivo inhibitor treatment." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(10): 6233-6238.
- Wallez, Y., I. Vilgrain and P. Huber (2006). "Angiogenesis: the VE-cadherin switch." *Trends Cardiovasc Med* **16**(2): 55-59.
- Wang, B., A. Caluch, R. Fodil, S. Fereol, P. Zadigue, G. Pelle, B. Louis and D. Isabey (2012). "Force control of endothelium permeability in mechanically stressed pulmonary micro-vascular endothelial cells." *Biomed Mater Eng* **22**(1-3): 163-170.
- Wang, N. (1998). "Mechanical interactions among cytoskeletal filaments." *Hypertension* **32**(1): 162-165.
- Wang, N., J. P. Butler and D. E. Ingber (1993). "Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton." *Science* **260**(5111): 1124-1127.
- Wang, N., K. Naruse, D. Stamenovic, J. J. Fredberg, S. M. Mijailovich, I. M. Tolic-Norrelykke, T. Polte, R. Mannix and D. E. Ingber (2001). "Mechanical behavior in living cells consistent with the tensegrity model." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(14): 7765-7770.
- Wang, N., I. M. Tolic-Norrelykke, J. Chen, S. Mijailovich, J. P. Butler, J. J. Fredberg and D. Stamenovic (2002). "Cell prestress. I. Stiffness and prestress are closely associated in adherent contractile cells." *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282**: C606-C616.
- Wang, Y., H. Miao, S. Li, K. D. Chen, Y. S. Li, S. Yuan, J. Y. Shyy and S. Chien (2002). "Interplay between integrins and FLK-1 in shear stress-induced signaling." *Am J Physiol Cell Physiol* **283**(5): C1540-1547.
- Ware, L. B. and M. A. Matthay (2000). "The acute respiratory distress syndrome." *N Engl J Med* **342**(18): 1334-1349.
- Weinbaum, S., X. Zhang, Y. Han, H. Vink and S. C. Cowin (2003). "Mechanotransduction and flow across the endothelial glycocalyx." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(13): 7988-7995.
- Wendling, S., C. Oddou and D. Isabey (1999). "Stiffening response of a cellular tensegrity model." *Journal of Theoretical Biology* **196**(3): 309-325.
- Wendling, S., E. Planus, V. Laurent, L. Barbe, A. Mary, C. Oddou and D. Isabey (2000). "Role of cellular tone and microenvironmental conditions on cytoskeleton stiffness assessed by tensegrity model." *European Physical Journal Applied Physics* **9**: 51-62.
- West, J. B. (2000). "Invited review: pulmonary capillary stress failure." *J Appl Physiol* (1985) **89**(6): 2483-2489; discussion 2497.
- Wheatley, E. M., P. J. McKeown-Longo, P. A. Vincent and T. M. Saba (1993). "Incorporation of fibronectin into matrix decreases TNF-induced increase in endothelial monolayer permeability." *Am J Physiol* **265**(2 Pt 1): L148-157.
- Wheatley, E. M., P. A. Vincent, P. J. McKeown-Longo and T. M. Saba (1993). "Effect of fibronectin on permeability of normal and TNF-treated lung endothelial cell monolayers." *Am J Physiol* **264**(1 Pt 2): R90-96.
- Wiliam, S. (1924). "An elastic value of protoplasm, with further observations on the viscosity of protoplasm." *J. Exp. Biol.* **2**: 1-11.
- Williams, P. M. (2003). "Analytical descriptions of dynamic force spectroscopy: behaviour of multiple connections." *Analytica Chimica Acta* **479**: 107-115.

Bibliographie

- Winder, S. J. and K. R. Ayscough (2005). "Actin-binding proteins." *J Cell Sci* **118**(Pt 4): 651-654.
- Witke, W., A. H. Sharpe, J. H. Hartwig, T. Azuma, T. P. Stossel and D. J. Kwiatkowski (1995). "Hemostatic, inflammatory, and fibroblast responses are blunted in mice lacking gelsolin." *Cell* **81**(1): 41-51.
- Wong, J. Y., J. B. Leach and X. Q. Brown (2004). "Balance of chemistry, topography, and mechanics at the cell-biomaterial interface: Issues and challenges for assessing the role of substrate mechanics on cell response." *Surface Science* **570**: 119-133.
- Wong, M. K. and A. I. Gotlieb (1990). "Endothelial monolayer integrity. Perturbation of F-actin filaments and the dense peripheral band-vinculin network." *Arteriosclerosis* **10**(1): 76-84.
- Wu, M. H., E. Ustinova and H. J. Granger (2001). "Integrin binding to fibronectin and vitronectin maintains the barrier function of isolated porcine coronary venules." *J Physiol* **532**(Pt 3): 785-791.
- Wu, X., S. Suetsugu, L. A. Cooper, T. Takenawa and J. L. Guan (2004). "Focal adhesion kinase regulation of N-WASP subcellular localization and function." *J Biol Chem* **279**(10): 9565-9576.
- Xiao, K., J. Garner, K. M. Buckley, P. A. Vincent, C. M. Chiasson, E. Dejana, V. Faundez and A. P. Kowalczyk (2005). "p120-Catenin regulates clathrin-dependent endocytosis of VE-cadherin." *Mol Biol Cell* **16**(11): 5141-5151.
- Yan, L., M. A. Moses, S. Huang and D. E. Ingber (2000). "Adhesion-dependent control of matrix metalloproteinase-2 activation in human capillary endothelial cells." *J Cell Sci* **113** (Pt **22**): 3979-3987.
- Yeung, T., P. C. Georges, L. A. Flanagan, B. Marg, M. Ortiz, M. Funaki, N. Zahir, W. Ming, V. Weaver and P. A. Janmey (2005). "Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion." *Cell Motil Cytoskeleton* **60**(1): 24-34.
- Zahalak, G. I., W. B. McConnaughey and E. L. Elson (1990). "Determination of cellular mechanical properties by cell poking, with an application to leukocytes." *J Biomech Eng* **112**(3): 283-294.
- Zeng, Q., D. Lagunoff, R. Masaracchia, Z. Goeckeler, G. Cote and R. Wysolmerski (2000). "Endothelial cell retraction is induced by PAK2 monophosphorylation of myosin II." *J Cell Sci* **113** (Pt **3**): 471-482.
- Zhao, X. H., C. Laschinger, P. Arora, K. Szaszi, A. Kapus and C. A. McCulloch (2007). "Force activates smooth muscle alpha-actin promoter activity through the Rho signaling pathway." *J Cell Sci* **120**(Pt 10): 1801-1809.
- Zhu, C., G. Bao and N. Wang (2000). "Cell mechanics: mechanical response, cell adhesion, and molecular deformation." *Annu Rev Biomed Eng* **2**: 189-226.
- Zucker, S., H. Mirza, C. E. Conner, A. F. Lorenz, M. H. Drews, W. F. Bahou and J. Jesty (1998). "Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation." *Int J Cancer* **75**(5): 780-786.

Résumé :

L'augmentation de la perméabilité microvasculaire est un problème majeur dans de nombreuses pathologies pulmonaires comme le Syndrome de Détresse Respiratoire Aigüe. La plupart des études se concentrent sur le rôle des facteurs inflammatoires sur la barrière endothéliale, et peu d'études concernent le versant mécanique des pathologies pulmonaires. Or, le poumon est soumis en permanence à des déformations cycliques en raison des mouvements respiratoires dont l'hétérogénéité augmente avec le caractère lésionnel et œdémateux. Si le rôle des propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire a été récemment mis évidence sur le contrôle de la perméabilité endothéliale, le rôle des forces mécaniques au sein du cytosquelette reste à préciser. Pour comprendre ces mécanismes, nous avons développé un modèle de cellules primaires microvasculaires pulmonaires humaines (HPMEC) en monocouche, dans lequel le stress mécanique est appliqué sur le cytosquelette via des microbilles ferromagnétiques fonctionnalisées avec un peptide RGD (magnétostimulation : MTS). Les résultats montrent un remaniement important du cytosquelette d'actine dans les cellules exposées à la MTS. Ce remaniement est cohérent avec les résultats obtenus en magnétocytométrie, qui vont dans le sens d'une augmentation de la tension interne pour les cellules exposées à la MTS. Ces effets sont modérés par l'utilisation d'inhibiteur de phosphorylation de la myosine empêchant la contraction actomyosine (ML9). Nous observons en parallèle un remaniement moléculaire avec une redistribution des sites d'adhésion au sein des HPMEC caractérisée par un affaiblissement des contacts intercellulaires mettant en jeu la VE-cadhérine et un renforcement avec clusterisation des contacts cellule-matrice mettant en jeu l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Ce remodelage est considéré comme responsable d'une augmentation de la perméabilité des HPMEC quantifiée par le passage d'un dextran-FITC, également modulé par ML9. En conclusion, nos résultats montrent le rôle central de l'augmentation de la tension interne du cytosquelette dans la mécanotransduction induite par le stress mécanique responsable de l'augmentation de la perméabilité des HPMEC.

Abstract :

Increase in microvascular permeability is a major concern in pulmonary pathologies like the Acute Respiratory Distress Syndrome. Most studies evaluate the role of inflammatory factors on the lack of endothelium integrity but few studies target the mechanical factors responsible of these pathologies. Due to the respiratory movements, the lungs are subjected to a permanent cyclic stretch whose heterogeneity increases when pulmonary oedema or lesions are present. While the role of extracellular matrix mechanical properties has recently been shown on endothelial permeability, the role of intra-cytoskeleton forces remain to be elucidated. To understand these mechanisms, we have developed a cellular model in which the cytoskeleton of primary Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells (HPMEC) in a monolayer are mechanically stimulated via ferromagnetic microbeads coated with the RGD peptide (magnetostimulation: MTS). Our results show a strong remodelling effect of MTS on HPMEC actin cytoskeleton. This remodelling is consistent with mechanical data obtained by magnetocytometry, which reveal an increase in internal tension of cells exposed to MTS. These stimulation effects are modulated by a treatment inhibiting myosin phosphorylation and contraction (ML9). We also observed a molecular remodelling characterized by a redistribution of cell adhesion sites such that VE-cadherin based intercellular junctions are weakened while $\alpha_v\beta_3$ integrin-based cell-matrix junctions are reinforced and clusterized. These remodelling effects seem responsible for an increase in HPMEC permeability assessed by dextran-FITC passage, which is only slightly modulated by ML9. To conclude, our results show the central role of higher cytoskeleton prestress in the stress-induced mechanotransduction responsible for the increase in endothelial permeability.