HAL
open science

Influence de l'élasticité du substrat sur la plasticité de la chromatine de cellules épithéliales et sur la division de cellules tumorales

Morgane Rabineau

To cite this version:

Morgane Rabineau. Influence de l'élasticité du substrat sur la plasticité de la chromatine de cellules épithéliales et sur la division de cellules tumorales. Biologie cellulaire. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAJ079 . tel-01145267

HAL Id: tel-01145267

https://theses.hal.science/tel-01145267v1

Submitted on 23 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 DE STRASBOURG

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Inserm UMR-S 1121 « Biomatériaux et Bioingénierie »

THESE

présentée par : **Morgane RABINEAU**

Soutenue publiquement le : **24 septembre 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Spécialité : Biologie moléculaire et cellulaire

Influence de l'élasticité du substrat sur la plasticité de la chromatine de cellules épithéliales et sur la division de cellules tumorales

Thèse dirigée par : **Mr Dominique VAUTIER**

Ingénieur de Recherche, Inserm, Université de Strasbourg

Rapporteurs : **Mme Karine ANSELME**

Directeur de Recherche, CNRS, Université de Haute-Alsace

Mr Benoît LADOUX

Professeur des Universités, CNRS, Université Paris-Diderot

Examinateur : **Mr Michel LABOUESSE**

Directeur de Recherche, CNRS, Université de Strasbourg

« La science consiste à passer d'un étonnement à un autre. »

Aristote

Remerciements

C'est avec une immense reconnaissance que je remercie Dominique Vautier, mon directeur de thèse, pour son encadrement. Ta foi en moi dans ce travail a été sans faille. Tu m'as impressionné par ton implication à 2000%, ton optimisme et ta générosité. Ton encadrement m'a permis d'effectuer cette thèse dans d'excellentes conditions. Tes explications et ton partage de la science furent « très intéressants ».

Je remercie Jean-Claude Voegel, Directeur de Recherche de l'Unité Inserm 977, et Pierre Schaaf, Directeur de l'Unité Inserm 1121, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire et pour leur soutien. Les échanges scientifiques et leurs conseils avisés ont contribué à l'avancée de mes travaux.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude à la Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg pour m'avoir financée tout au long de la thèse. Je remercie madame le Professeur Corinne Taddeï, Doyen de la Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg, et le Professeur Youssef Haïkel, pour leur confiance et leur intérêt manifestés pour mon travail.

Je remercie l'association « Alsace Contre le Cancer » d'avoir soutenu une partie de mes travaux.

J'exprime ma profonde gratitude aux membres du jury, qui me font l'honneur d'évaluer mon travail : le Dr Karine Anselme, Directeur de Recherche à l'Institut de Science des Matériaux de Mulhouse, le Pr Benoît Ladoux, de l'Université Paris-Diderot, et le Dr Michel Labouesse, Directeur de Recherche à l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire d'Illkirch.

Je tiens à remercier Philippe Lavalle pour sa disponibilité tout au long de ma thèse et ses précieux conseils.

Une partie de ces travaux a été réalisée à la plateforme d'imagerie du Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, à Illkirch. Je remercie Romain Vauchelles et plus particulièrement Denis Dujardin pour leur participation et leur encadrement.

Je tiens à remercier Jean-Noël Freund, de l'unité Inserm 1113, pour sa contribution dans ces travaux de recherche.

Merci à Eric Mathieu pour son travail fourni en microscopie électronique et sa participation à mes travaux.

Je remercie Bernard Senger, dit « Maître Bernard », pour sa participation à nos réunions, ses conseils sur les statistiques, et également pour sa droiture scientifique sans faille.

Je remercie également Damien Metz pour nos longues discussions sur la recherche. Elles ont été très enrichissantes et m'ont confirmé que la recherche c'est d'abord une passion, ensuite un métier. J'espère que ma passion pour les sciences ne s'éteindra jamais.

A mes collègues de bureau : Armelle, Géraldine, Christian et Christophe. Je suis fière du bureau des Glandus. Un de mes meilleurs souvenirs avec vous restera la préparation de notre vidéo « Bad Project » : l'atelier « création des robes hautes coutures de laboratoire » faites de gants et de pipettes a été très imaginatif.

Aux autres membres du laboratoire avec qui j'ai partagé des discussions, qu'elles soient scientifiques ou non, je les remercie. Ils m'ont transmis leur savoir faire, donné de leur temps et de précieux conseils. Merci à Christine, Florent, Vincent, Christiane, Engin, Hayriye, Jöelle, Fabienne, Roxane F. et Joseph. Je garderai un très bon souvenir de ces trois ans.

A toutes les personnes qui m'ont initiée aux sciences et à la recherche. Mes différents stages à Strasbourg (au centre de Neurochimie, au centre d'imagerie de l'IGBMC et au LBP) m'ont donné cette envie de continuer mes études. Leur soutien, leur encadrement et leur partage de la science m'ont permis d'avancer pas à pas dans mon cursus. Merci à vous.

Etre thésard, c'est rentrer dans une communauté où les joies, les difficultés, les coups de gueule et les coups de blues, l'enseignement, les sorties, et la science bien sûr, sont partagés et compris. A mes amis thésards, quelques soit leurs disciplines, je les remercie pour nos discussions enrichissantes et ce soutien mutuel durant ces trois années. Aux thésards de l'Unité 1121 : Leyla, Roxane A., Agnès, Elisabeth, Cédric et Gaulthier, et à ceux de l'Institut Charles Sadron qui venaient régulièrement nous rendre visite : Audrey, Cesar, Yohan et Lydie. Je remercie également Noémie, avec qui je partageais repas et potins lors de mes sessions de vidéomicroscopie au LBP. Dans ce groupe, il y a surtout Christophe Chaubaroux et Julien Barthès, thésards physico-chimistes du laboratoire et amis. Je suis contente d'avoir fait votre rencontre, et d'avoir pu partager un peu de biologie avec vous. Je n'oublierai pas tous nos bons moments passés ensemble, nos échanges scientifiques et nos autres discussions extra-labo. Maintenant que Juju est devenu un pré-biologiste, je lui confie les yeux fermés mes cellules PtK2.

Durant ces trois ans, j'ai eu l'opportunité d'encadrer des stagiaires. Je me suis découvert un goût pour la transmission des connaissances et de l'encadrement. Merci à Pauline, Florence et Mathilde.

A ceux avec qui j'ai partagé des superbes moments d'enseignement à travers toute l'Alsace : Benjamin, Morgan, Claire, Mélanie, Anaïs, Léa et Patrick. Merci à vous et à OpenLab pour cette aventure. Un très grand merci à nos encadrants qui contribuent beaucoup à la mission OpenLab : à Laurence Drouard, Michel Labouesse, Catherine Florentz, Stéphane Vincent, Serge Potier et Emilie Bertrand.

Un merci particulier à mes amies du lycée, Diane, Rachel et Adeline, à qui enfin je peux annoncer que « oui » j'ai fini mes études ! Je rends ma carte d'étudiante avec un peu de mélancolie. Je les remercie pour leur soutien tout au long de ces huit années.

A mes amis Strasbourgeois ! Vous êtes nombreux. Il y a eu de très belles rencontres durant ces trois ans. Cette aventure n'aurait eu aucune valeur sans vous. Je vous remercie pour vos encouragements, votre présence et pour toutes ces « pauses ». J'espère que vous aussi vous allez retenir le titre de ma thèse.

A toute ma super grande famille ! En particulier mes parents, je les remercie chaleureusement de m'avoir portée jusqu'à ce doctorat et je leur en suis profondément reconnaissante. « Alors tu cherches ? », « Oui, et je cherche encore… ».

Pour finir, une pensée à toutes mes petites bestioles. Elles ont su charmer chaque personne du laboratoire.

Table des matières

Abréviations et Symboles 11

Introduction 16

1 Généralités 20

1.1 Les biomatériaux 20

1.1.1 La problématique 20

1.1.2 Stratégie pour mimer la matrice extracellulaire 22

1.1.3 Les différents biomatériaux 22

1.1.4 Réponses cellulaires aux propriétés physiques du substrat 25

1.2 La mécanobiologie 27

1.2.1 Bref état de l'art sur la mécanobiologie 27

1.2.2 La mécano-transduction 31

1.2.3 Mécanobiologie et physique du noyau 33

1.3 L'environnement cellulaire et sa connexion avec la cellule 36

1.3.1 Présentation générale de la matrice extracellulaire 36

1.3.2 Les intégrines 40

1.3.3 Le complexe adhésome 43

1.4 Le cytosquelette chez les cellules eucaryotes 45

1.4.1 Les principaux éléments du cytosquelette 46

1.4.2 Les fonctions du cytosquelette 48

1.5 Les protéines de signalisation Rac 1 et MAP kinase 49

1.5.1 La protéine Rac 1 49
1.5.2 La voie des MAP kinases 50
1.6 Le cycle cellulaire et sa phase mitotique 50
1.6.1 Les différentes phases du cycle cellulaire 51
1.6.2 La division cellulaire 52
1.6.3 Structure et dynamique du fuseau mitotique 55
1.7 Le noyau et ses constituants 57
1.7.1 Organisation des fibres de chromatine 57
1.7.2 La matrice nucléaire 58
1.7.3 Le nucléole 59
1.7.4 La chromatine 59
1.7.5 Les enzymes régulant l'expression de l'ADN 61
1.7.6 Communication entre le cytoplasme et le noyau 63
1.8 Activités nucléaires 64
1.8.1 La réplication chez les eucaryotes 64
1.8.2 La transcription chez les eucaryotes 67
1.8.3 Les complexes ribonucléoprotéiques hnRNPs 71
1.8.4 La trichostatine A 72
1.8.5 L'α-amanitine 73

2 Matériels et Méthodes 75
2.1 Les films multicouches de polyélectrolytes utilisés 75
2.1.1 La nature chimique des polyélectrolytes 75
2.1.2 La méthode de construction des PEMs 77
2.1.3 Les propriétés des films multicouches de polyélectrolytes 79
2.2 Les méthodes d'observation des échantillons 82

2.2.1 Le microscope à force atomique par nano-indentation 82

2.2.2 Le microscope optique à épifluorescence 84

2.2.3 Le microscope confocal à balayage laser 85

2.2.4 La vidéomicroscopie 87

2.2.5 Le microscope électronique à transmission 89

2.3 Etude de la réponse cellulaire sur les films polyélectrolytes 90

2.3.1 Les modèles cellulaires étudiés 90

2.3.2 La culture cellulaire 92

2.3.3 La synchronisation mécanique 93

2.3.4 L'immunomarquage fluorescent 93

2.3.5 Analyse de l'expression des protéines Rac 1 et integrine-β1 par Western-blot 96

2.3.6 Expérience de réplication 99

2.3.7 Marquage des cellules pour la vidéomicroscopie 100

2.3.8 Pré-conditionnement des cellules PtK2 avec la trichostatine A 100

2.3.9 Pré-conditionnement des cellules PtK2 avec les drogues TSA et α-amanitine 101

2.3.10 Fixation des cellules PtK2 pour une observation au microscope électronique à transmission 101

2.3.11 Transfert des cellules PtK2 de E_0 + TSA sur verre 103

2.4 Quantification des évènements biologiques 103

2.4.1 Quantification d'un évènement mitotique en vidéomicroscopie 103

2.4.2 Quantification de l'hétérochromatine à partir des images de MET 104

2.4.3 Quantification du signal nucléaire fluorescent correspondant au marquage de hnRNP A1, de hNRP L, de HP1β et du BrdU 104

2.4.4 Quantification des bandes protéiques sur Western-blot 105

3 The control of chromosome segregation during mitosis in epithelial cells by substrate elasticity 107

3.1 Introduction 107

3.2 Article 109

3.3 Résumé 122

4 Contribution of soft substrates to malignancy and tumor suppression during cancer cell division 125

4.1 Introduction 125

4.2 Article 126

4.3 Résumé 137

5 Regulation of chromatin plasticity of epithelial cells in response to the substrate elasticity 140

5.1 Introduction 140

5.2 Materials and Methods 142

5.3 Results 144

5.4 Conclusion 159

5.5 References 159

Conclusion et perspectives 162

Références bibligraphiques 166

Publications scientifiques 179

Communications 180

Abréviations et Symboles

- **Matrices et polymères :**

HA : *hyaluronic acid*

LbL : *layer by layer*

PA : polyacrylamide

PAH : *poly(allylamine hydrochloride)*

PDMS : polydiméthylsiloxane

PEG : polyéthylène glycol

PEM : *polyelectrolyte multilayer film*

PLL : poly-L-lysine

PSS : poly(4-styrène sulfonate) de sodium

- **Cellules et milieux de culture :**

ATCC : *American Type Culture Collection*

CoEpiCM : *Colonic Epithelial Cell Medium*

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EMEM : *Eeagles Minimum Essential Medium*

FBS : *fœtal bovine serum*

HCoEpiC : *Human Colonic Epithelial Cells*

PtK2 : *Potorous Tridactylis Kidney 2*

RPMI : *Roswell Parc Memorial Institute*

SaOs-2 : cellule d'ostéosarcome

- **Molécules biologiques et protéines :**

A : adénine

Ac I : anticorps primaire

Ac II : anticorps secondaire

ADN: acide désoxyribonucléique

Ag : antigène

ADN pol: acide désoxyribonucléique polymérase

AMA : α-amanitine

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messager

ARNr : acide ribonucléique ribosomique

ARNt : acide ribonucléique de transfert

ARN pol: acide ribonucléique polymérase

ATP : adénosine triphosphate

BrdU : bromodéoxyuridine

BSA : *bovine serum albumine*

C : cytosine

CAP : *capping protein*

CDC : *cell division control protein*

CTD : *carboxy terminal domain*

FA : filament d'actine

FAK : *focal adhesion kinase*

FI : filament intermédiaire

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

G : guanine

GAG : glycosaminoglycane

GIT-1 : *G protein-coupled receptor kinase interacting ArfGAP 1*

GP : glycoprotéine

GTF : *general transcription factor*

GTP : *guanosine triphosphate*

H3K9 : lysine 9 sur l'histone H3

HAT : histone acétyltransférase

HDAC : histone désacétylase

hnRNA : *heterogeneous nuclear ribonucleic acid*

hnRNP : *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex*

hnRNP A1 : *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex* A1

hnRNP L : *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex L*

HP1 : hétérochromatine protéine de type 1

HRP : *horseradish peroxidase*

KDAC : désacétylase lysine

LINC : *linkers of nucleoskeleton and cytoskeleton*

MAP : *mitogen activated protein*

MEC : matrice extracellulaire

MED-23 : *mediator complex subunit 23*

MSH : *melanocyte stimulating hormone*

MT : microtubule

NELF : *negative elongation factor*

NLS : *nuclear localisation signal*

OR : origine de réplication

PCNA: *proliferating cell nuclear antigen*

Phase G_0 : phase *gap 0*

Phase G_1 : phase *gap 1*

Phase G_2 : phase *gap 2*

Phase M : phase mitotique

Phase S : phase de synthèse

PIC : *preinitiation complex*

PIX-1 : *PAK-interacting exchange factor*

Pol β : ADN polymerase de type β

Pol α : ADN polymerase de type α

Pol δ : ADN polymerase de type δ

Rac : acronyme désignant les chercheurs Ratchet et Clank

RE : réticulum endoplasmique

RGD : séquence tripeptide arginine-glycine-acide aspartique

Rho : rhodamine

RP-A : *replication protéin-A*

snRNP : *small nuclear ribonucleoprotein*

TRITC : *tetra methyl rhodamine isothiocyanate*

TSA : trichostatine A

- **Réactifs et solvants :**

ECL : *enhanced chemiluminescent*

NaCl : chlorure de sodium

PBS : *phosphate bufferd saline*

PFA : paraformaldéhyde

Tris : tris(hydroxyméthyl) aminométhane

T-TBS : *tween-tris buffered salt solution*

- **Symboles et unités de mesures :**

2-D : deux dimensions

3-D : trois dimensions

6-D : six dimensions

CO_2 : dioxyde de carbone

d : déflection

Da : Dalton

dpi : *dots inch per*

F : force

E : module de Young

E_{ap} : module élastique apparent

E_0 : $(PLL/HA)_{24}$: substrat ayant une élasticité mesurée de 0 kPa

E_{20} : $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_1$: substrat ayant une élasticité mesurée de 20 kPa

E_{50} : $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_2$: substrat ayant une élasticité mesurée de 50 kPa

E_{200} : $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_5$: substrat ayant une élasticité mesurée de 200 kPa

E_{500} : $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_{12}$: substrat ayant une élasticité mesurée de 500 kPa

k_c : constante de raideur

N : newton

P : position du champ en vidéomicroscopie

Pa : pascal

R: rayon

rpm : *revolutions per minute*

s : seconde

T : différents temps d'acquisition en vidéomicroscopie

T 0h : 0 heure de contact des cellules sur le substrat

T 30 min : 30 minutes de contact des cellules sur le substrat

T 1h : 1 heure de contact des cellules sur le substrat

T 2h : 2 heures de contact des cellules sur le substrat

T 3h : 3 heures de contact des cellules sur le substrat

T 4h : 4 heures de contact des cellules sur le substrat

T 5h : 5 heures de contact des cellules sur le substrat

T 24h : 24 heures de contact des cellules sur le substrat

U : unité

U.A. : unité arbitraire

V : volt

X : plan de l'abscisse

Y : plan de l'ordonnée

Z : profondeur d'acquisition du champ

Δd : déviation de la déflection

ρ: résistivité

λ : longueur d'onde

δ : indentation

Ø : diamètre

- **Appareils et techniques :**

AFM : *atomique force microscopy*

HBO : lampe à gaz au mercure

MET : microscopie électronique à transmission

Introduction

Des années 1960 jusqu'à nos jours, plusieurs générations de biomatériaux se sont succédées en gardant toujours pour objectif d'améliorer leur intégration dans l'organisme. La première génération de biomatériaux devait être la plus inerte possible pour permettre une réponse inflammatoire de l'hôte minimale. Aujourd'hui, l'enjeu des nouvelles générations de biomatériaux consiste à présenter des propriétés de bioactivité. Cet objectif a ouvert un vaste champ de possibilités pour créer de nouveaux matériaux dits intelligents capables d'induire des réactions contrôlées dans l'environnement physiologique. On citera par exemple, des matériaux conçus comme plateforme pour :

- Agir en tant que réservoir et libérer des médicaments dans l'organisme (Garza *et al.* 2004) ;
- Transplanter ou attirer des cellules dans des sites anatomiques en ingénierie tissulaire (Knoblich 2010) ;
- Contrôler l'activité de systèmes biocatalytiques par des stimuli extérieurs (Mertz *et al.* 2009).

Parallèlement, une nouvelle manière d'appréhender la biologie de la cellule est en plein essor. Il s'agit d'étudier la cellule, isolée ou en groupe, à travers des lois physiques issues de la mécanique, de la thermodynamique ou de la mécanique des fluides. Cette nouvelle discipline, nommée mécanobiologie, étudie les mécanismes par lesquels une force, une viscosité, une pression, un confinement, ou une topographie régulent de nombreux comportements cellulaires tels que l'adhésion, la migration, la prolifération, la survie et la différenciation cellulaires (du Roure *et al.* 2005; Engler *et al.* 2006; Vogel et Sheetz 2006; Wang *et al.* 2009). La mécanobiologie ouvre ainsi de nouveaux champs d'investigation très prometteurs dans des domaines aussi divers que la médecine régénérative, la biologie du développement (Zhang *et al.* 2011) et la cancérologie.

Au sein du laboratoire du Pr Pierre Schaaf, l'Unité Inserm 1121 « Biomatériaux et Bioingénierie », une méthode de revêtement est développée depuis plusieurs années

pour le traitement de surfaces de biomatériaux. Il s'agit d'un dépôt réalisé par auto-assemblage de polycations et de polyanions, qui conduit à la formation de films multicouches de polyélectrolytes aux propriétés contrôlées en termes d'épaisseur, de viscosité et de rigidité (Decher *et al.* 1992; Ladam *et al.* 2001; Picart *et al.* 2001; Lavalle *et al.* 2002; Richert *et al.* 2003; Porcel *et al.* 2006; Mertz *et al.* 2009). Ces films sont utilisés dans cette thèse pour mimer l'élasticité des tissus biologiques. Ils se composent de deux strates construits à partir de deux paires de polyélectrolytes différents : une strate épaisse et molle constituée de 24 bicouches de poly-L-lysine et d'acide hyaluronique $(PLL/HA)_{24}$ et une strate très mince et rigide constituée de n bicouches de poly(4-styrène sulfonate) de sodium et de poly(hydrochlorure d'allylamine) $(PSS/PAH)_n$. La rigidité du film $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_n$, mesurée par son module de Young, E, augmente avec le nombre n (Francius *et al.* 2007). Elle passe de $E \approx 0$ kPa pour $n = 0$ à $E \approx 500$ kPa pour $n = 12$, couvrant ainsi la gamme d'élasticité des tissus biologiques.

Cette thèse de doctorat s'inscrit dans la continuité de travaux portant sur l'influence de l'élasticité du substrat sur la réplication et la transcription de cellules épithéliales (Kocgozlu *et al.* 2010). Ces réponses ont été largement étudiées sur des cellules en interphase. Cependant, nos connaissances sont encore limitées sur le rôle mécanique joué par l'élasticité du substrat sur la division cellulaire. La première partie de la thèse traite de l'influence de l'élasticité du substrat sur la ségrégation des chromosomes de cellules épithéliales PtK2 (Kocgozlu *et al.* 2012).

Dans la cas du cancer du côlon, une maladie très agressive, la progression à travers la séquence maligne est accompagnée par de nombreux remaniements chromosomiques (Rajagopalan *et al.* 2003). Pour coloniser des organes cibles, les cellules invasives traversent plusieurs tissus de différents modules d'élasticité. Une attention toute particulière est portée à la capacité des substrats de très faibles rigidités (E voisin de 0 kPa) à exercer une barrière physique vis-à-vis des cellules tumorales en bloquant le processus de division cellulaire. Le modèle cellulaire de cancer du côlon utilisé est une cellule épithéliale humaine SW480, issue d'une lignée d'adénocarcinome colorectal.

La chromatine, principal constituant du noyau, est organisée en deux structures distinctes qui sont l'hétérochromatine et l'euchromatine. L'hétérochromatine est une structure de chromatine condensée dont les gènes sont inactivés (chromatine silencieuse). L'euchromatine est structurée en chromatine décondensée, accessible à la machinerie de transcription, permettant l'expression des gènes. La dernière partie de la thèse s'intéresse à l'influence de l'élasticité du substrat sur la plasticité de la chromatine, à ce jour encore peu connue. Les cellules PtK2 sont utilisées comme modèle pour ces travaux.

Le travail présenté dans ce mémoire s'articule en six chapitres. Le premier définit le contexte scientifique de la thèse, le deuxième expose les matériels et les méthodes utilisés. Le troisième chapitre analyse le rôle joué par l'élasticité du substrat sur la ségrégation des chromosomes de cellules épithéliales PtK2. Le quatrième présente l'influence mécanique des substrats très mous dans la progression en mitose des cellules tumorales SW480. Le dernier chapitre traite les résultats obtenus concernant la régulation de la plasticité de la chromatine en réponse à l'élasticité du substrat. Le mémoire se termine par une conclusion et quelques perspectives de poursuite du travail exposé ici.

Chapitre 1 : Généralités

1 Généralités

1.1 Les biomatériaux

1.1.1 La problématique

L'élaboration de biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire a pour but de mimer au plus juste la complexité de l'environnement extracellulaire naturel favorisant la régénération tissulaire. Reproduire la matrice extracellulaire (MEC) d'un tissu signifie de créer un réseau fibreux tridimensionnel complexe, contenant des espaces dans lesquels se trouvent des facteurs solubles, tels que des facteurs de croissance et des cytokines. La régénération tissulaire doit également prendre en compte la grande variabilité des propriétés physiques de la MEC, comme la topographie, la compliance et l'élasticité. Pour permettre l'assemblage de cellules précurseur en tissu, il est important de reconstituer tous les signaux physiques et biochimiques indispensables à l'élaboration d'un tissu.

Construire des nouveaux biomatériaux synthétiques et étudier leurs propriétés *in vitro* tout d'abord, puis *in vivo* dans un second temps, nécessite plusieurs domaines de compétences scientifiques. Elles rassemblent la chimie, la biophysique, la biologie moléculaire et cellulaire et la chirurgie. Chaque discipline apporte ses connaissances pour contrôler au mieux ces biomatériaux, et pour comprendre les effets induits sur les processus cellulaires.

Pour étudier des comportements cellulaires, les biologistes utilisent généralement comme substrat le verre ou des surfaces de polystyrène. Ces surfaces sont cependant extrêmement rigides (de l'ordre du GPa) et ne représentent pas l'élasticité réelle de la MEC, ni celle des tissus. Typiquement, la rigidité tissulaire peut varier du Pa au GPa. La fabrication de systèmes modèles intégrant les contraintes de la MEC, comme les propriétés physiques dont l'élasticité de la matrice, permet une meilleure compréhension de la réponse cellulaire à son environnement (Figure 1-1). Il devient primordial de prendre en compte l'environnement extracellulaire des cellules pour mieux les étudier, notamment en modulant l'élasticité du substrat. Car, bien que la plupart des cellules soient stabilisées dans un tissu et ne voient leur environnement

extracellulaire que très peu varier, d'autres cellules (comme les cellules migratoires à l'exemple des cellules de la crête neuronale ou également des cellules tumorales au cours de la dissémination métastatique) traversent différents environnements qui varient chimiquement et mécaniquement.

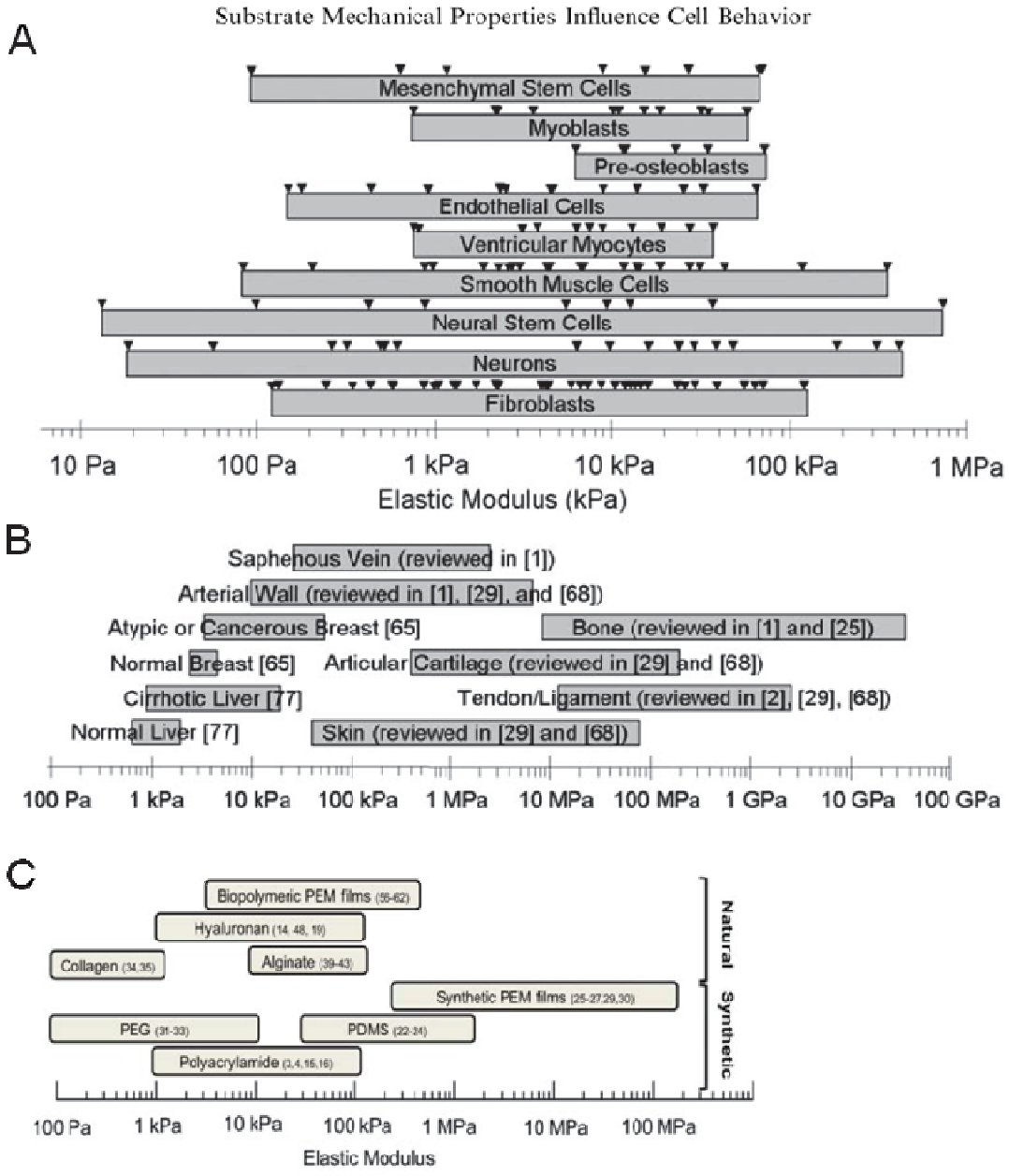


Figure 1-1 : Gamme de rigidité A) de différents types de cellules humaines B) des mesures faites sur différents tissus humains (Nemir et West 2010) ; C) de différents biomatériaux utilisés pour l'étude des processus cellulaires (Gribova et al. 2011).

1.1.2 Stratégie pour mimer la matrice extracellulaire

L'adhésion des cellules à la surface d'un substrat étant la première étape nécessaire pour obtenir une réponse cellulaire, les propriétés adhésives des biomatériaux ont fait l'objet de premières études dans les années 80 (Garrouste *et al.* 1982). Pour cela, la surface d'un matériau non-adhésif a été modifiée et fonctionnalisée par ajout de molécules induisant l'adhésion des intégrines ou par l'incorporation de peptides présentant des séquences pouvant interagir avec les récepteurs cellulaire, comme la séquence RGD (arginine-glycine-acide aspartique) (Shin *et al.* 2003).

Le paramètre de la rigidité d'un biomatériau est une propriété physique du microenvironnement suscitant un grand intérêt pour aborder la réponse cellulaire à ce signal. En effet, les premiers travaux de Pelham et Wang en 1997 ont mis en évidence *in vitro* les effets de la rigidité de gels de polyacrylamide sur l'adhésion des cellules (Pelham et Wang 1997). L'incorporation de facteurs de croissance et l'importance des propriétés mécaniques ont été pris en compte plus tardivement pour l'élaboration de nouveaux substrats (Lee *et al.* 2011).

Depuis ses 30 dernières années, de nombreux biomatériaux ont été conçus pour étudier *in vitro* divers processus cellulaires. Ils sont construits à partir de matériaux synthétiques et/ou naturels, et peuvent être fonctionnalisés par incorporation de molécules. Voici une liste non exhaustive des matériaux qui ont montré un intérêt de par leurs propriétés (Tableau 1-A).

1.1.3 Les différents biomatériaux

- **Les substrats synthétiques** : trois types de substrats sont couramment employés dans le cadre des études de la réponse cellulaire à la rigidité de leur environnement extracellulaire : les gels de polyacrylamide (PAs), les gels de polydiméthylsiloxane (PDMSs) et les gels de polyéthylène glycol (PEGs).

  – Les PAs sont relativement simples à mettre en œuvre et leur rigidité est facilement contrôlable. L'élasticité de ces hydrogels est contrôlée de manière linéaire en ajustant la concentration en acrylamide et de l'agent réticulant de bis-acrylamide. Ils sont fréquemment utilisés pour étudier l'effet mécanique sur l'adhésion, la migration et la différenciation cellulaire (Pelham et Wang 1997;

Engler *et al.* 2006). Cependant, par leur nature chimique, les PAs ne permettent pas l'adhésion de cellules. Un traitement préalable est nécessaire pour greffer des protéines de la MEC, telles que la fibronectine et le collagène de type I (Kandow *et al.* 2007). Les applications de ces gels sont limitées due au fait de la toxicité de l'acrylamide.

– Les PDMS sont des gels hydrophobes qui permettent l'adsorption de protéines de la MEC. Comme pour les PAs, il est possible de moduler l'élasticité du gel en jouant sur la concentration d'agent réticulant. On peut obtenir une gamme de 50 kPA à 1,7 MPa (Chou *et al.* 2009). Cependant, l'adsorption des protéines étant difficilement contrôlable et le gel étant très dense pour encapsuler des cellules, les PDMS ont une application limitée.

– Contrairement aux deux autres gels, les PEGs permettent de contrôler précisément les propriétés mécaniques du gel et l'étude du comportement des cellules dans des niches en 3-D. Cependant, étant biologiquement inerte, il est nécessaire d'incorporer des peptides d'adhésion pendant la polymérisation du gel. De nombreuses stratégies ont été élaborées pour les fonctionnaliser, comme par exemple l'incorporation de molécules d'adhésions (Zisch *et al.* 2003; Raeber *et al.* 2005). Ils permettent de créer des gels mixtes et sont hautement modulables pour l'étude des processus cellulaires.

▪ **Les substrats naturels** : la construction de substrat à base de polymères naturels a l'avantage de présenter de fortes ressemblances de structure avec la MEC, mais aussi de fonction. Bien que ces substrats soient le plus souvent poreux et biodégradables, ils sont aussi plus fragiles et leurs propriétés physiques sont difficilement contrôlables. Ces substrats présentent des signaux physiques et biochimiques de par leur nature biologique initiale.

Les gels de collagène (Miron-Mendoza *et al.* 2010), d'alginate (Huebsch *et al.* 2010) et d'hyaluronane (Ren *et al.* 2008) sont les plus couramment utilisés sous la forme de biopolymères. Un mélange de protéines de la MEC, connu sous le nom de Matrigel (composé de collagènes, de laminines et de facteurs de croissance), fournit des conditions de culture proches de l'élasticité physiologique (Wells *et al.* 2008). Dans le

cas des gels de collagène, ces protéines s'assemblent en fibres et forment une architecture organisée et tridimensionnelle, permettant des études en 3-D des processus cellulaires. Pendant la formation de la matrice, les propriétés du gel peuvent être modulées en variant simplement le pH, la concentration du collagène ou encore la force ionique. Ces substrats peuvent avoir un module élasticité variant de 5 à 1000 Pa.

- **Les films multicouches de polyélectrolytes** (PEMs pour « *polyelectrolyte multilayer films* ») : ces films sont des assemblages de polymères naturels ou synthétiques de molécules chargés. Dans le domaine biomédical, ces substrats suscitent un intérêt grandissant depuis ces 10 dernières années en raison de leurs nombreuses fonctionnalités (Boudou *et al.* 2010).

Ils présentent l'avantage de pouvoir être déposés sur des surfaces de tout type : des surfaces plans verre, or, silicium par exemple, des particules sphériques colloïdales, de nature minérale, métallique ou organique, ou sur des surfaces élastomères comme le silicone. Les propriétés de ces films sont très modulables par le choix des polymères, le nombre de couches de polyélectrolytes et les paramètres chimiques d'assemblages (pH, force ionique). Dans certaines conditions, les films possèdent les caractéristiques d'un gel dont on peut moduler les propriétés viscoélastiques.

Les films à base de polymères synthétiques sont en général plus rigides et sont plus faciles à modifier chimiquement. Ceux à base de polymères naturels permettent d'obtenir des substrats à fort degré de similitude avec la MEC. Des protéines de la MEC, comme la gélatine, le collagène ou la fibronectine, ou encore des polysaccharides comme l'héparine, le chitosan, et le hyaluronane sont utilisées pour construire des PEMs (Matsusaki *et al.* 2012).

Les PEMs sont formés par l'adsorption séquentielle de polymères chargés négativement et de polymères chargés positivement. Le film s'auto-assemble couche par couche *via* des interactions électrostatiques entre les polymères chargés. Il existe plusieurs façons de construire des PEMs : la méthode la plus répandue est celle du procédé d'immersion dans les différentes solutions de polyélectrolytes (méthode « *dip-coating* ») (Decher *et al.* 1992; Decher 1997). La construction par pulvérisation alternée des solutions de polyanions et polycations, et plus récemment ce même procédé de

nébulisation par pulvérisations simultanées des polyélectrolytes est également utilisée (Porcel *et al.* 2005). La méthode par pulvérisation a l'avantage de réduire le temps de dépôt des solutions pour aboutir aux mêmes constructions que les films construits par « *dip-coating* ». Le principe d'assemblage des films par « *dip-coating* » est exposé plus en détails dans le chapitre 2 de ce mémoire, les PEMs étant utilisés comme substrat modèle dans le cadre des travaux de cette thèse.

Un des intérêts majeurs de ces substrats est de permettre leur fonctionnalisation par insertion, lors de leur construction, de facteurs biologiques, tels que des protéines, de l'ADN ou des médicaments (Boudou *et al.* 2010). Par exemple, il a été possible de conférer à des prothèses trachéales des propriétés anti-inflammatoire par l'action du peptide α-MSH (« *α-melanocyte stimulating hormone* ») adsorbé à la surface des multicouches de polyélectrolytes (Schultz *et al.* 2005).

PROPERTIES	SYNTHETIC	NATURAL
2D 3D	PEM films PA gels PDMS PEG IPN Composites	PEM films Fibrin Collagen Hyaluronan Alginate
Physical/mechanical properties	- Pure elasticity - No physical architecture - Small porosity - Non biodegradable (unless grafted with degradable sequences)	- Viscoelasticity - Physical architecture - Porosity (nm to µm scale) - Degradability (proteases)
Biochemical properties	- Inertness - Need grafting with ligands	- Non specific interactions (electrostatic, H-bonds) - Specific (natural ligands)
Main disadvantage	- High swellability (for PEG) - Stability over time	- Difficulty to decouple mechanics and chemistry
Main advantage	-Versatility of the control	-Biomimetism (natural presence in tissues)

Tableau 1-A : Résumé des principales propriétés de matériaux synthétiques et naturels (Gribova et al. 2011).

1.1.4 Réponses cellulaires aux propriétés physiques du substrat

Les premières études concernant l'effet de la rigidité d'un substrat sur les processus cellulaires ont commencé avec les travaux de Pelham et Wang (Pelham et Wang 1997). Ils ont montré que la rigidité des gels de PAs fonctionnalisés par du

collagène influençait la morphologie et la migration de cellules épithéliales et de fibroblastes. Les travaux sur la mécanotransduction se sont multipliés, et des études ont permis de mettre en évidence l'effet de la rigidité d'une matrice sur la différenciation cellulaire (Engler *et al.* 2006).

- **La migration et l'adhésion cellulaire** : il a été montré que la migration des cellules est dépendante des propriétés physiques du substrat. Sur des gels de PAs de rigidité variable, les fibroblastes migrent vers les zones les plus rigides. La rigidité du substrat augmente également l'adhésion cellulaire (Lo *et al.* 2000; Zaari *et al.* 2004).

- **L'étalement cellulaire** : des études utilisant un large panel de substrats, tels que les gels de PAs, de PDMSs, de PEGs ou encore des PEMs, et de nombreux types cellulaires, ont montré que l'aire d'étalement des cellules augmente avec la rigidité du substrat (Engler *et al.* 2004; Richert *et al.* 2004; Chou *et al.* 2009; Kocgozlu *et al.* 2010). Sur des films PEMs, ces réponses similaires des cellules ont été démontrées. Il s'avère que l'augmentation de l'étalement des cellules est accompagnée par la formation de fibres d'actine et par l'augmentation des plaques d'adhérences (Figure 1-2).

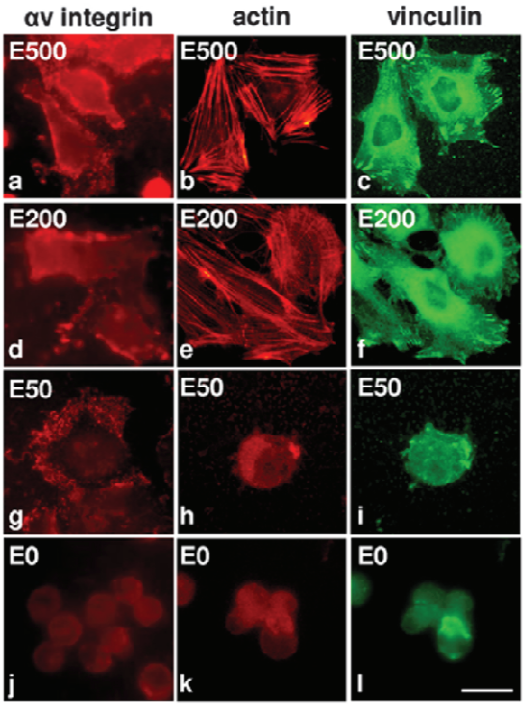


Figure 1-2 : Observations de la densité des protéines intégrines, actines et vinculines, et de l'étalement de cellules épithéliales sur différentes élasticités de films PEMs (Kocgozlu et al. 2010).

- **La prolifération cellulaire** : la croissance cellulaire et l'apoptose ont également été étudiées en fonction de l'élasticité du substrat. Wang et al, ont cultivé des cellules épithéliales normales et des cellules transformées ayant la capacité de faire des métastases sur des gels de PAs, en modulant la rigidité du film (Wang *et al.* 2000). Les observations ont montré que les cellules normales voient leur taux de croissance diminuer et le taux d'apoptose augmenter lorsque les cellules sont déposées sur des gels moins rigides par rapport aux gels rigides. Par contre, les cellules transformées montrent un taux de croissance et d'apotose similaires quelque soit l'élasticité du gel. Ces travaux montrent que les cellules normales sentent la rigidité de la matrice et y répondent en régulant la prolifération, et que les cellules transformées ont une perte de sensibilité à la rigidité. Cette perte de réponse s'explique par la croissance anormale des cellules tumorales (cf. chapitre 4).

1.2 La mécanobiologie

1.2.1 Bref état de l'art sur la mécanobiologie

Dès 1892, le chirurgien Wolff décrivait le phénomène de remodelage de l'os généré par des contraintes mécaniques. Wilhelm Roux définissait en 1880 le concept d'adaptation fonctionnelle d'un tissu soumis à un stimulus mécanique comme la pression ou la tension. Cependant, ces premières observations ont été laissées longtemps sans suite. Depuis une vingtaine d'années, avec la possibilité de mesurer des forces de l'ordre du pN et des déformations nanométriques, il a été clairement démontré que, parallèlement aux réponses à des signaux chimiques, à des hormones et à des facteurs de croissance, les cellules répondent à leur environnement mécanique selon les pressions et les résistances qu'elles rencontrent (Galbraith et Sheetz 1997; Balaban *et al.* 2001; Munevar *et al.* 2001; Helmke et Davies 2002; Wang *et al.* 2002; Saif *et al.* 2003; Mack *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2004). Par exemple, les cellules du corps sont exposées en permanence à des contraintes liées aux mouvements, à la pression sanguine... Celles-ci varient de quelques Pa pour les contraintes de cisaillement au niveau de la paroi des vaisseaux jusqu'au MPa pour les contraintes sur le cartilage de la hanche.

Dans ces microenvironnements aux propriétés physiques hautement complexes, les cellules développent un véritable « sens du toucher » pour se déplacer, s'associer, se

dissocier, se contracter et se dilater. Cette mécanique du vivant est présente dans chacun des processus physiopathologiques des cellules lorsqu'elles migrent, prolifèrent, se divisent, meurent, réparent des lésions, répondent à une inflammation, sculptent un embryon ou dégénèrent en métastase. Les chercheurs ont encore peu de connaissance sur les mécanismes qui assemblent les cellules pour donner une morphologie précise aux tissus. Néanmoins, cette jeune discipline, nommée mécanobiologie, ouvre de nouvelles voies de recherche passionnantes pour comprendre les interactions subtiles entre intérieur et extérieur de la cellule. En 1997, Donald Ingber, directeur du « *Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering* » à l'Université d'Harvard, a proposé un modèle de propagation de tensions au sein de la cellule vivante qu'il a qualifié de « tenségrité » (intégrité par la tension : contraction de « *tensile integrity* »). Dans ce modèle, le cytosquelette de la cellule est comparé à des câbles tendus et à des barres qui supportent la compression. Ces structures de « tenségrité » sont autocontraintes et autoéquilibrées. Les microtubules (MTs), éléments rigides et volumineux du cytosquelette, correspondent aux barres des structures de « tenségrité ». Les filaments d'actine associés à la myosine, représentant les câbles, assurent la propagation des forces de tension. Les filaments intermédiaires exercent un rôle de support de tension passif ou soutiennent les microtubules lors d'efforts importants de compression. Ce modèle explique certains comportements cellulaires tels que l'étirement ou la déformation de la cellule (Maniotis *et al.* 1997; Wang *et al.* 2001).

La cellule utilise aussi d'autres mécanismes pour transmettre les forces mécaniques à travers le cytoplasme jusqu'au noyau. La cellule possède à sa surface des protéines « mécano-sensibles » capables de transformer un signal mécanique en signal biochimique. Ce processus est nommé la « mécano-transduction » (Vogel et Sheetz 2006). Les intégrines sont les principales protéines « mécano-transductrices » comprenant un domaine extracellulaire qui attache la cellule à sa MEC et un domaine cytoplasmique assurant une connexion de la MEC au cytosquelette *via* une plateforme protéique. Ce complexe protéique active en cascade de nombreuses voies de signalisations intracellulaires. Un changement de conformation des intégrines peut exposer des sites d'interactions avec des ligands de la MEC. Les interactions avec la MEC sont suffisamment fortes pour permettre aux intégrines de transmettre des forces nécessaires, par exemple, pour la migration cellulaire. Depuis deux décennies, les

scientifiques multiplient les applications basées sur les propriétés mécaniques des cellules et de leurs environnements. Une des découvertes les plus spectaculaires a été réalisée en 2006, par l'équipe de Dennis Discher, de l'Université de Pennsylvanie. Cette équipe a montré que selon la rigidité du substrat, des cellules souches mésenchymateuses ont la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires sans qu'il soit nécessaire de modifier la composition chimique du milieu de culture dans lequel elles prolifèrent. Sur un substrat mou, correspondant à l'élasticité du tissu cérébral, les cellules souches se transforment en neurones. Sur un substrat équivalent à l'élasticité d'un tissu musculaire, les cellules deviennent des cellules musculaires. Sur un substrat plus rigide, comparable à l'élasticité de l'os, les cellules prennent le phénotype osseux (Engler *et al.* 2006). L'équipe de Benoît Ladoux, de l'Université Paris Diderot – Institut Jacques Monod – Mechanobiology Institute à Singapore, développe des substrats de micropiliers d'élastomère à partir de PDMS de rigidités et de topographies variables permettant de mimer l'environnement mécanique des cellules. Lors des processus d'adhésion ou de migration de cellules épithéliales individuelles ou en groupe, les cellules tirent sur ces micropiliers et provoquent leur déformation. Les forces de traction induites par les cellules sont alors déduites de la mesure de la flexion des piliers. Ces forces sont de l'ordre de quelques pN. Les données quantitatives sont également corrélées avec d'autres évènements de transduction des forces mécaniques tels que la croissance des plaques d'adhésion, la dynamique de l'actine et des microtubules et l'activation de voies de signalisation associées (du Roure *et al.* 2005). Les équipes de Michael Sheetz et de James Hone de l'Université de Columbia se sont intéressées à l'adhésion de fibroblastes embryonnaires de souris sur des piliers en PDMS de diamètres décroissants de 2 µm à 0,5 µm. Pour des diamètres de 2 µm, les cellules forment des contacts d'adhésion de paxilline à la périphérie des piliers. Les forces cellulaires sont dirigées vers le centre de la cellule. Pour des diamètres de 0,5 µm, les contacts de paxilline se forment sur les sommets des piliers. Les cellules génèrent une contraction locale entre piliers voisins avec des déplacements maxima d'environ 60 nm. Ce sont précisément les piliers de plus faible diamètre qui ont permis de mettre en évidence le rôle de la myosine dans la contraction locale des cellules (Ghassemi *et al.* 2012). L'équipe de Karine Anselme, de l'Institut de Science des Matériaux de Mulhouse « Biointerfaces et Biomatériaux », conçoit d'autres substrats de micropiliers constitués

d'acide poly-L-lactique. Ils ont démontré que sur ces substrats, des cellules d'ostéosarcome SaOs-2 déforment fortement leur noyau contrairement aux noyaux des cellules saines. La déformation nucléaire dépend plus de la taille et de l'espacement des piliers que de leurs propriétés mécaniques et chimiques. Le réseau d'actine ainsi que les filaments intermédiaires, notamment les filaments de vimentine, sont essentiels dans les mécanismes de déformation du noyau. A l'inverse, la myosine et les microtubules ne semblent pas impliqués dans ces processus (Badique *et al.* 2013). Si la compréhension de la mécanique du vivant s'avère déjà difficile à l'échelle de la cellule unique, lorsqu'elle s'adresse à des dizaines ou à des milliers de cellules, par exemple au cours du développement d'un embryon, l'identification des mécanismes mis en jeu devient encore beaucoup plus compliquée. C'est pourtant ce défi ambitieux qu'Emmanuel Farge et son équipe « Mécanique et génétique du développement embryonnaire et tumoral » de l'Institut Curie à Paris, ont tenté de relever. Farge a révélé le lien étroit qui existe entre l'environnement mécanique de l'embryon, sa déformation morphologique et l'expression de gènes du développement. Au moyen d'impulsions laser, les chercheurs ont réalisé une ablation de cellules dorsales. Ils ont ainsi effectué une déconnection entre les cellules stromales de l'embryon en pleine croissance des tissus qui exercent sur ces cellules une compression mécanique. Dans cette région l'expression de Twist se trouve fortement réduite. Des nanoparticules magnétiques sont injectées dans cette zone. Sous l'effet d'électroaimants, une nouvelle compression des cellules antéro-dorsale restaure l'expression de Twist. L'expression du gène est bien induite par des contraintes mécaniques (Farge 2003; Desprat *et al.* 2008). Michel Labouesse et son équipe de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, du laboratoire de « Biologie du développement et cellules souches » à Strasbourg, cherchent à comprendre comment à partir d'un petit groupe de cellules en forme de disque ou de sphère, un organe, comme l'intestin, se sculpte. Le rôle des forces mécaniques impliquées dans les processus de déformation et de croissance des différentes couches cellulaires impliquées dans l'ébauche de l'organe est finement analysé. Les chercheurs ont mis en lumière un phénomène très important. Le concept de mécano-transduction qui explique comment une force mécanique se transforme en signal biochimique au sein d'une cellule isolée fonctionne également entre deux couches cellulaires superposées de muscle et d'épiderme. Dans le modèle *Caenorhabditis elegans*, les cellules musculaires exercent

une série de contractions qui se transmettent mécaniquement à la couche de cellules épithéliales. La sollicitation mécanique active dans ces cellules une cascade de voies de signalisation permettant l'allongement et l'intercalation d'autres cellules épithéliales. Plus précisément, la tension exercée par les muscles maintient GIT-1 (« *G protein-coupled receptor kinase Interacting ArfGAP 1* ») au niveau des hémidesmosomes et stimule l'activité de « *Protein-Activated Kinase-1* » *via* PIX-1 (« *PAK-interacting exchange factor* ») et Rac. Cette voie favorise la maturation des hémidesmosomes et renforce la coordination de la morphogenèse des tissus musculaires et épidermiques alors plus résistants aux contraintes mécaniques (Zhang *et al.* 2011).

1.2.2 La mécano-transduction

La cellule utilise la MEC et les cellules avoisinantes comme principaux signaux environnementaux pour maintenir et établir sa morphologie. La structure des cellules eucaryotes et de l'organisme qu'elles forment est définie par des forces extracellulaires et intracellulaires. Les cellules sondent perpétuellement ces forces et s'y adaptent (c'est la mécano-sensation). Les forces provenant de son environnement sont transformées en signaux biochimiques (c'est la mécano-transduction) afin de produire des réponses adaptées, telles que le changement de morphologie, la croissance, la différenciation ou la mort cellulaire (c'est la mécano-réponse). En retour, la réponse de la cellule peut induire une modification de la MEC qui pourra induire d'autres signaux mécaniques. Dans une cellule a lieu constamment ce cycle de mécano-sensation, de mécano-transduction et de mécano-réponse (Figure 1-3). Ces étapes impliquent un sondage régulier par les cellules des propriétés mécaniques ou de la teneur en glycoprotéines de la MEC. La cellule perçoit aussi la topographie de la surface, variant de l'échelle nanométrique à l'échelle micrométrique. La perception de la géométrie fait intervenir des propriétés de forme du substrat. Cette étape s'avère être cruciale dans la mécano-sensation de la cellule à ces signaux physiques. Par exemple, une matrice protéique organisée soit en filaments tridimensionnels, soit distribuée de façon uniforme sur une surface bidimensionnelle entraînera une réponse cellulaire différente et peut imposer une morphologie particulière à la cellule.

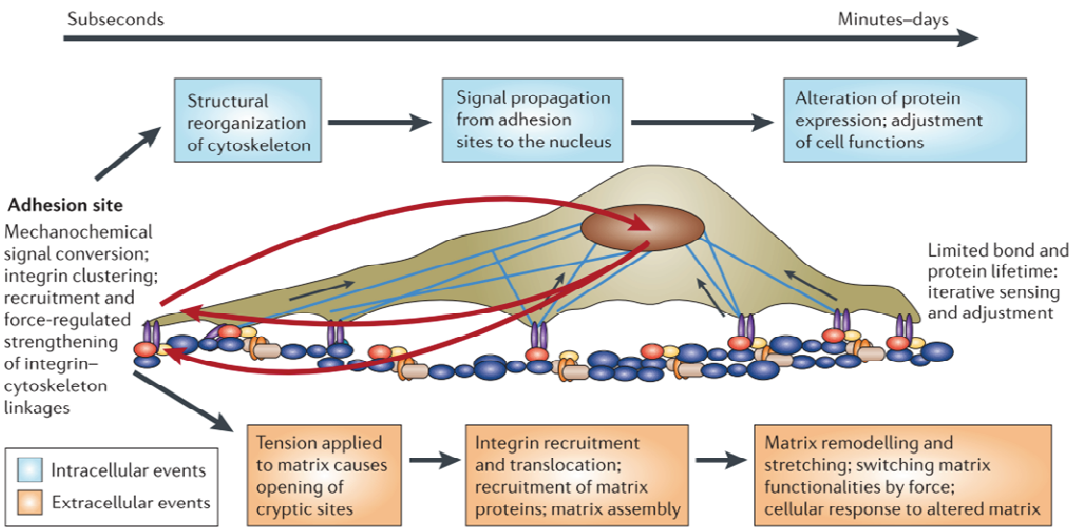


Figure 1-3: Les étapes de mécano-sensation, mécano-transduction et de mécano-réponse au cours du temps (Vogel et Sheetz 2006).

Les plaques d'adhérence des cellules s'adaptent aux contraintes de l'environnement extracellulaire telles que la rigidité ou la densité de la MEC. Quatre paramètres clefs déterminent la gamme de rigidité que la cellule peut ressentir par les intégrines : la force de liaison entre la matrice et les intégrines, la force de rétraction des cellules, la vitesse de cette rétraction et la sensibilité des mécano-senseurs qui leur sont associés (Moore *et al.* 2010).

La cellule adopte des réponses différentes selon les signaux mécaniques provenant de son environnement extracellulaire qu'elle « ressent ». Cette mécano-sensation de la MEC est possible par l'adhésion des intégrines qui propagent les signaux mécaniques de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (Katsumi *et al.* 2004; Schwartz et DeSimone 2008). Les intégrines sont des protéines « mécano-transductrices » capables de détecter et de transmettre des forces provenant de la MEC, et de les transformer en signaux biochimiques. Les adhésomes engendrent par la suite une activation en cascade de nombreuses voies de signalisation intracellulaire. La transduction d'un signal mécanique en un signal biochimique nécessite différents facteurs : des récepteurs, des acteurs transmettant les forces (le cytosquelette) et des mécano-senseurs capables d'adapter la réponse biochimique à la sollicitation mécanique. En effet, les signaux mécaniques extracellulaires peuvent être traduits en signaux biochimiques par le déclenchement de voies de signalisation par l'intermédiaire de la tyrosine kinase

(Wozniak *et al.* 2003). Plusieurs enzymes, dont les kinases, les phosphatases et les RhoGTPases adaptent leurs activités en fonction des signaux biochimiques perçus. Les signaux mécaniques peuvent également se propager de manière mécanique, sous forme d'onde de stress le long du cytosquelette. Certaines protéines changent de conformation en réponse à leur étirement mécanique dans la cellule : ces changements peuvent permettre l'exposition de sites cryptiques, comme c'est le cas dans l'étirement de la taline qui expose un site d'interaction pour la vinculine. Une propagation mécanique est plus rapide qu'une propagation chimique : de 1 à 5 s pour les ondes de stress, contre 1 à 5 µs pour la propagation chimique des signaux de la membrane cellulaire au noyau (Wang *et al.* 2009). Les signaux transmis au noyau vont modifier au fil du temps l'activité nucléaire. D'autres signaux extracellulaires, comme des facteurs de croissance peuvent également modifier le devenir de la cellule et de son environnement.

1.2.3 Mécanobiologie et physique du noyau

Les cellules s'adaptent aux changements des propriétés physiques des tissus en modifiant leurs profils d'expression des gènes. De nombreuses voies de signalisation biochimiques impliquées dans ces réponses ont été élucidées. Cependant, il existe encore peu de connaissances sur les relations spatio-temporelles entre les forces mécaniques perçues au niveau de la membrane plasmique, la déformation du noyau et l'organisation fonctionnelle de la chromatine. Cette partie donne un bref aperçu de ce nouvel aspect de la mécanobiologie, centré sur la physique du noyau. Lyer et al., ont appliqué des forces mécaniques à des cellules vivantes à l'aide de particules magnétiques insérées dans la membrane plasmique. Par imagerie d'anisotropie de fluorescence à haute résolution, l'équipe a révélé que les forces mécaniques induisent la polymérisation de l'actine et un changement dans le rapport actine F/actine G. Cette variation résulte de la translocation nucléaire de l'actine G en corrélation avec l'import du cofacteur « *megakaryoblastic acute leukemia factor-1* », lié à la transcription de l'ARN. La propagation physique des forces mécaniques entraîne une déformation nucléaire puis une réorganisation de la chromatine (Lyer *et al.* 2012). Versaevel et al. ont réalisé des micro-manipulations sur des cellules endothéliales isolées en faisant varier la surface d'adhésion (fabrication de « micropatterns » de différentes formes) et en soumettant la cellule à différentes forces de compression par pression hydrostatique. Ils

ont montré que la déformation du noyau est dûe à des forces de compression latérale induites par la tension des fibres d'actomyosine. Cette tension modifie l'organisation spatiale des fibres de stress d'actine et la géométrie des contacts d'adhésion focaux permettant l'élongation et l'étalement de la cellule. Leurs résultats indiquent que ces changements de forme de la cellule et de son noyau s'accompagnent d'une forte condensation de la chromatine ainsi que d'une diminution importante de la prolifération cellulaire (Versaevel *et al.* 2012). En utilisant des substrats constitués de micropiliers mimant le confinement tridimensionnel de l'environnement tissulaire, Booth-Gauthier et al., se sont intéressés au mouvement et à la déformation de noyau de cellules saines et de cellules atteintes du syndrome de Hutchinson-Gilford. Les cellules porteuses de ce syndrome sont engagées dans un processus de vieillissement. Leurs résultats montrent que les noyaux de ces cellules vieillissantes ont une dysmorphie augmentée et une rigidité accrue corrélées avec une mobilité fortement réduite. Les auteurs suggèrent que les défauts de formes du nucléosquelette (invagination, froissement et forme en bulle) des cellules vieillissantes altèrent considérablement la transmission des forces au noyau. Ces cellules sont alors piégées dans ce microenvironnement tridimensionnel (Booth-Gauthier *et al.* 2013). Des études précédentes ont montré que la transmission des forces du cytoplasme au noyau s'effectue par l'intermédiaire d'un complexe protéique, nommé complexe LINC (« *linkers of nucleoskeleton and cytoskeleton* »), liant physiquement les macromolécules du cytosquelette (filament d'actine, microtubule et filament intermédiaire) à l'enveloppe nucléaire (Crisp *et al.* 2006 ; Lombardi *et al.* 2011). Récemment, Anno et al. se sont focalisés sur l'interaction mécanique entre l'actine F et le noyau via une des protéines du complexe LINC : la nesprine-1. Ils ont développé un système d'étirement cyclique uniaxial permettant de suivre en vidéo-microscopie les déformations nucléaires de cellules endothéliales dont l'expression du gène nesprine-1 a été bloquée par des ARNs d'interference (siRNA). Les résultats révèlent que les noyaux des cellules « nesprine-1 bloquées » sont plus petits que les noyaux des cellules sauvages. Sous étirement, les cellules nesprine-1 déficientes subissent une plus forte compression exercée par la couche d'actine corticale. L'absence de nesprine-1 induit une déconnection physique de l'actine-F au noyau. Le noyau est ainsi libéré des forces de tension que l'actine-F n'est plus en mesure de lui transmettre. Dans ces conditions, la déformabilité du noyau est augmentée avant étirement mécanique. Ces travaux ont

permis de préciser le rôle essentiel de la liaison de l'actine-F au noyau via la nesperine-1 permettant une transmission stable des forces au noyau (Anno *et al.* 2012). Après avoir imposé à des cellules HeLa des déformations de fortes amplitudes, Haase et Pelling ont étudié le retour de la membrane plasmique et du noyau à une forme initiale. Pour réaliser ces expériences, ils ont utilisé un AFM comme nanoindenteur couplé à un microscope confocal. L'AFM impose à une cellule vivante des indentations d'une profondeur maximum de 5 µm avec une force maximum de 20 nN sur une durée de 10 min. Leurs données montrent que la membrane plasmique et le cortex d'actine récupérent rapidement leur forme initiale. Ils ont mis en évidence que les régions cytoplasmiques entourant le noyau sont plus résistantes aux compressions à long terme que les régions nucléaires. Cette conservation de forme est supportée par le cytosquelette d'actine maintenu intact et par l'activité de contractilité de l'actomyosine. En réponse à des déformations locales, ces résultats suggèrent que le noyau est faiblement résistant aux contraintes mécaniques et n'exerce pas un rôle déterminant dans le rétablissement de la forme des cellules. Au contraire, la membrane plasmique et le cortex d'actine offrent clairement une stabilité mécanique remarquable à la cellule (Haase et Pelling 2013). En comprimant une cellule par un système de presse, l'équipe de Piel est capable de modifier le confinement cellulaire. Ils ont ainsi déterminé une déformation seuil pour laquelle la lamina nucléaire se rompt et se reconstruit, autorisant d'importants changements de volume nucléaire. Ces déformations nucléaires sont corrélées à des variations d'expression de gènes impliqués dans différentes voies de mécanotransduction intracellulaire (Le Berre *et al.* 2012). Qin et Buehler se sont plus particulièrement intéressé à la réponse physique de la lamina nucléaire lui permettant de résister à une déformation mécanique extrème de 100%. Dans ce travail, la lamina nucléaire est considérée comme un maillage de protéines de structure de la membrane nucléaire. Les auteurs démontrent que la lamina nucléaire amortit les fortes contraintes par des mécanismes à l'échelle nanométrique de dépliement, de glissement et de transition de chaîne α et β des protéines du maillage. Quantitativement, ces phénomènes d'extension du maillage protéique sont caractéristiques de courbes de force d'énergie de dissipation non linéaire. A l'échelle microscopique, une délocalisation de cette énergie évite la propagation de rupture mécanique de filament protéique individuel, préservant l'ensemble du maillage (Qin et Buehler 2011). Récemment, des travaux très importants

du groupe de Discher ont révélé que le taux d'expression de la lamina A nucléaire, en fonction de l'élasticité des tissus, régule la différenciation de cellules souches mésenchimateuses (Swift *et al.* 2013).

1.3 L'environnement cellulaire et sa connexion avec la cellule

1.3.1 Présentation générale de la matrice extracellulaire

L'environnement extracellulaire d'une cellule est composé de cellules avoisinantes et de macromolécules produites et sécrétées par les cellules dans cet espace. Les macromolécules sont synthétisées principalement par des cellules mésenchymateuses. La MEC est constituée d'eau, de glycoprotéines (GPs), de glycosaminoglycanes (GAGs) et de protéines solubles. Les différentes activités cellulaires dépendent des propriétés physiques et biochimiques de la MEC.

La structure de la MEC se présente comme un maillage de fibres composé de différentes protéines : le collagène, la fibronectine, la vitronectine et la laminine (Hynes 2009). Ces protéines permettent des interactions avec les autres constituants de la MEC et sont responsables de l'organisation et de l'architecture de la matrice. Entre ces fibres, s'insèrent des GAGs, créant un gel hydraté.

1.3.1.1 Composition de la matrice extracellulaire

- **Les GAGs** : sont de longues chaines carbonées linaires sous forme de polysaccharides. Il existe des GAGs sulfatés comme l'héparane, la kératine ou encore la chrondroïtine, et des GAGs non sulfatés, tel que l'acide hyaluronique (HA). L'HA a la faculté d'interagir avec de nombreuses molécules d'eau *via* des liaisons hydrogènes (Haxaire *et al.* 2003) : il est donc responsable des propriétés visqueuses des tissus. Les GAGs sulfatés sont capables de se lier de manière covalente à une protéine dite « cœur » et former des protéoglycanes. Le maillage des GAGs et leur taux élevé en charges négatives leur confèrent un rôle important de ces protéines dans la structure de la MEC.

- **Les glycoprotéines** : sont de courtes chaines riches en carbone sous forme d'oligosaccharides. Les GPs se divisent en deux familles selon leurs fonctions dans la MEC. Il existe des protéines fibreuses de structure, comme le collagène et l'élastine, et les protéines responsables de l'adhésion des cellules, telles que les fibronectines, les

vitronectines ou les laminines. Les protéines adhésives permettent aux cellules de s'attacher à la MEC par leurs intégrines *via* leurs séquences nucléotidiques RGD.

A la base de tous les feuillets épithéliaux et endothéliaux se trouve une fine couche compacte et résistante : c'est la lame basale. La lame basale entoure les cellules musculaires, les cellules adipeuses et les cellules de Schwann. Elle est constituée de collagènes de type IV, de laminines et de protéoglycanes. La lame basale sert de filtre moléculaire.

La MEC est en perpétuel renouvellement : elle est détruite par des protéases, et les cellules mésenchymateuses la renouvellent. Ce système est en permanence à l'équilibre.

1.3.1.2 Les protéines de structure

- **Le collagène** est un composé majeur des tissus constitués de trois chaines polypeptidiques associées. Les fibres de collagène ont une conformation en triple hélice due à la répétition de la séquence glycine-proline-hydroxyproline et des résidus prolyles et hydroxypropyles. Le collagène est un constituant essentiel du tissu conjonctif. Chez l'Homme il existe plusieurs types de collagènes qui ont des propriétés structurales et fonctionnelles différentes. Par exemple, le collagène de type I intervient dans la formation de la peau, des tendons, des os et de la cornée. Le collagène de type II participe à la formation du cartilage. Le collagène de type III est retrouvé au niveau du système cardiovasculaire (Ramachandran 1956).

- **L'élastine** est sécrétée dans l'espace extracellulaire par des fibroblastes, essentiellement durant la croissance. Cette protéine est constituée d'une longue chaine polypétidique de glycine et de proline. Ses acides aminés hydrophobes sont responsables des propriétés élastiques de la MEC. Elle est présente au niveau de la peau, des poumons, des vaisseaux sanguins, des tissus conjonctifs et dans certains tendons et cartilages.

1.3.1.3 Les protéines d'adhésion

- **La fibronectine** est une protéine constituée de deux sous-unités α et β. Les deux monomères sont reliés par une paire de ponts disulfures à leur extrémité C-terminale.

Elle peut simultanément se lier à des protéines de la MEC (le collagène, la fibrine et l'héparane sulfate) et aux intégrines des cellules. L'interaction de la fibrine aux intégrines est suivie d'une cascade de phosphorylation de protéines de signalisation aboutissant à la régulation du cytosquelette. A la surface de nombreuses cellules, les molécules de fibronectines s'assemblent pour former des fibrilles.

- **La vitronectine** est une protéine de 50 kDa contenue dans le tissu conjonctif et dans le plasma. Ses propriétés sont très proches de la fibronectine.

1.3.1.4 Les facteurs de croissance et les autres protéines

- **Les facteurs de croissance** sont distribués dans l'environnement extracellulaire. La MEC les régule, les distribue, les active et les présente aux cellules. Ils sont connus pour stimuler la prolifération et la différenciation cellulaire, mais aussi l'invasion tumorale. La MEC est un immense réservoir de facteurs de croissance qui les retient, les concentre et les protège de la dégradation (Labat-Robert *et al.* 1990; Labat-Robert et Robert 2005).

- D'autres protéines sont retrouvées dan la MEC. Par exemple, la fibrine intervient dans le processus de coagulation du sang et de cicatrisation. La thrombospondine est connue pour jouer un rôle dans la présentation des facteurs de croissance. On retrouve également la protéine tenascine dans la MEC, qui jouerait un rôle dans la cicatrisation d'une plaie.

1.3.1.5 Les fonctions de la matrice extracellulaire

Les propriétés physico-chimiques de la MEC sont essentiellement liées à sa composition. Par exemple, les GAGs fournissent la résistance aux forces de compressions et le collagène participe à la résistance aux forces de traction. L'élastine fournit aux tissus la capacité à retrouver leur forme initiale suite à l'application d'une force mécanique.

La MEC permet la connexion avec les différentes cellules d'un tissu et de réaliser une frontière entre plusieurs tissus. Elle assure notamment la cohésion des tissus et des organes, et elle maintient leur morphologie par de nombreux domaines de liaison. Hormis son rôle de soutien structural, la MEC influe sur le comportement cellulaire. Elle

facilite l'adhérence, le mouvement et la régulation du devenir des cellules par une multitude de signaux. Par ses propriétés biochimiques, physiques et biomécaniques, elle exerce une influence sur le processus du développement, de régénération des tissus ou encore sur la fonction des organes.

1.3.1.6 Un système de communication

Les signaux émis de par la MEC sont capables de se propager de la membrane plasmique d'une cellule jusqu'à son noyau par une cascade de signalisation, entraînant une modification du comportement cellulaire, tel que l'adhésion, la migration ou l'expression de gènes et contrôlant ainsi la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Mais réciproquement, les cellules modifient la composition et la structure de l'environnement extracellulaire.

La MEC est responsable du rôle et des fonctions de chaque tissu, ainsi la composition de la matrice diffère selon les nécessités fonctionnelles des tissus, mais aussi selon son état pathologique (Adams et Watt 1993). Par exemple, la matrice osseuse contient principalement du collagène de type I et des sels minéraux, la matrice cartilagineuse a une forte concentration de collagènes de type II et de protéoglycanes, et un tissu jeune contient d'avantage d'élastine qu'un tissu âgé.

Des dérégulations peuvent se produire lors de développement de cancer ou de maladie. De faibles variations physiques et biochimiques peuvent diriger la cellule vers un comportement anormal comme une prolifération incontrôlée. La composition de la matrice évolue au cours de la tumorigenèse, entrainant une modification des propriétés biologiques et une rigidité de la MEC (Frantz *et al.* 2010).

Chez la cellule, se sont les intégrines, protéines enchâssées dans la membrane cytoplasmique, qui assurent la communication entre la MEC et le milieu intracellulaire (Figure 1-4). Pour qu'une cellule se fixe à la matrice, il faut que les intégrines reçoivent un signal activateur provenant de la MEC, ce qui entraine un changement de conformation des intégrines et la fixation de la cellule. L'adhérence d'une cellule entraine une réorganisation des filaments du cytosquelette, car les intégrines sont reliées grâce à leur domaine cytoplasmique à un complexe protéique, l'adhésome, en contact directe avec les protéines du cytosquelette. A l'inverse, le détachement de la

cellule à la MEC se fait par une phosphorylation de l'intégrine dans leur domaine intracellulaire. Les intégrines ont donc un rôle dans l'organisation des cellules au sein d'un tissu.

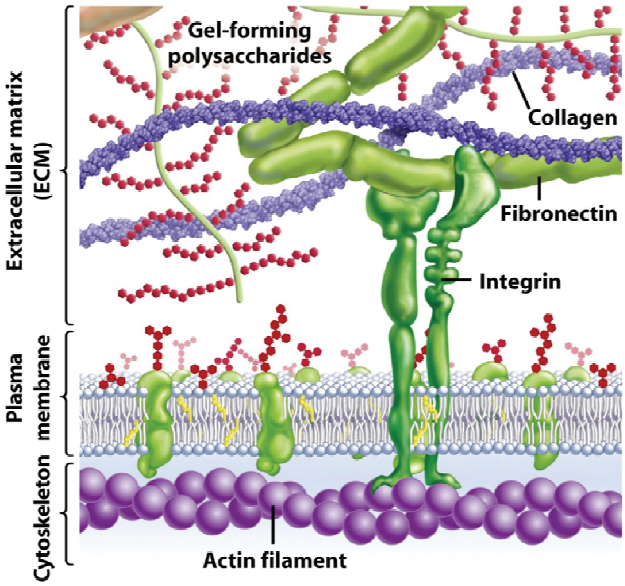


Figure 1-4 : Composition de la MEC et connexion avec la membrane cytoplasmique d'une cellule. Extrait du livre de Freeman S, 2005.

De toutes les propriétés biochimiques, physiques et biomécaniques énoncées ci-dessus, je m'attacherai à décrire principalement l'influence des propriétés élastiques de l'environnement extracellulaire sur le comportement des cellules.

1.3.2 Les intégrines

1.3.2.1 Rôles et compositions des intégrines

Les intégrines sont les récepteurs d'adhésion cellulaire. Ce sont des protéines transmembranaires localisées sur la membrane cytoplasmique, constituées de deux sous-unités α et β liées de façon non-covalente. Ces deux sous-unités sont très variables et leurs combinaisons induisent une spécificité de liaison de l'intégrine à son ligand. A ce jour, il a été dénombré 18 sous-unités α et 8 sous-unités β dont la combinaison aboutit à 24 couples d'hétérodimères (Hynes 2002). La séquence peptidique RGD retrouvée dans le collagène et d'autres protéines de la MEC est reconnue par huit intégrines différentes (Figure 1-5). L'expression des intégrines dépend du type cellulaire, et leur activation

dépend de l'attachement à la MEC selon la composition biochimique de celle-ci. De plus, en fonction de l'état de différenciation de la cellule, le répertoire d'expression et d'activation des intégrines peut évoluer. Les intégrines peuvent se lier à divers ligands de la MEC, tels que la lamine, le collagène et la fibronectine ou à des récepteurs membranaires des cellules avoisinantes (Humphries *et al.* 2006).

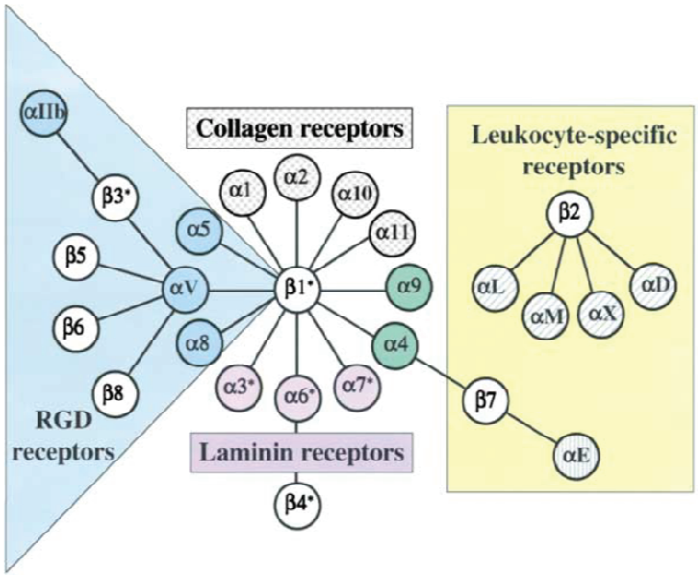


Figure 1-5 : Représentation de la famille des intégrine (Hynes 2002).

L'intégrine comprend trois domaines : un large domaine extracellulaire au contact de la MEC (par son extrémité N-terminale), un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique (par l'extrémité C-terminale). Les intégrines sont les premières protéines impliquées dans la mécanotransduction du signal provenant de l'environnement extérieur. Cette double interaction extra et intracellulaire lui donne un rôle important dans la transmission de signaux externes vers les composants des complexes d'adhésion focale. Ces signaux sont relayés jusqu'au noyau de la cellule par le cytosquelette. Elles participent également à l'intégrité et la stabilité de l'adhésion, la migration et la division cellulaire (Mettouchi *et al.* 2001; Reverte *et al.* 2006; Vicente-Manzanares *et al.* 2009). Son rôle d'ancrage et d'attachement des cellules à la MEC est important pour les cellules épithéliales qui sont rattachées à la lame basale. Les intégrines empêchent les cellules de se détacher du reste des tissus lors de frottement ou d'agression mécanique.

1.3.2.2 Activation des intégrines

La liaison des intégrines à des ligands de la MEC provoque une agglomération (appelée « *clustering* ») de ces dernières suite à un changement de conformation par modification des interactions des deux sous-unités α et β. Les intégrines ne possèdent pas d'activités catalytiques intrinsèques, c'est l'interaction ligand-intégrine puis l'agglomération des intégrines qui sont à l'origine des signaux cellulaires. Les agrégats d'intégrines influencent également la signalisation des intégrines.

Des études ont permis d'établir un modèle dynamique des intégrines montrant une communication bidirectionnelle. Cette communication passe par un changement de conformation des hétérodimères. Il existe ainsi un état « off » où les sites d'interaction avec le ligand extérieur sont masqués car l'hétérodimère est replié, et un état « on » correspondant à un état déplié permettant une exposition des sites d'interaction (Anthis et Campbell 2011) (Figure 1-6). Lors de la signalisation entrante « outside-in », le changement de conformation de l'intégrine permet au domaine intracellulaire de :

- Générer des voies de signalisation ;
- Contrôler la polarité, la survie et la prolifération de la cellule ;
- Structurer le cytosquelette ;
- Contrôler l'expression de gènes.

A l'inverse, pour une signalisation sortante « inside-out », l'ouverture de l'intégrine induit :

- Une interaction et une augmentation de l'affinité de celle-ci à son ligand extérieur ;
- L'adhésion et la migration de la cellule ;
- L'assemblage de la MEC.

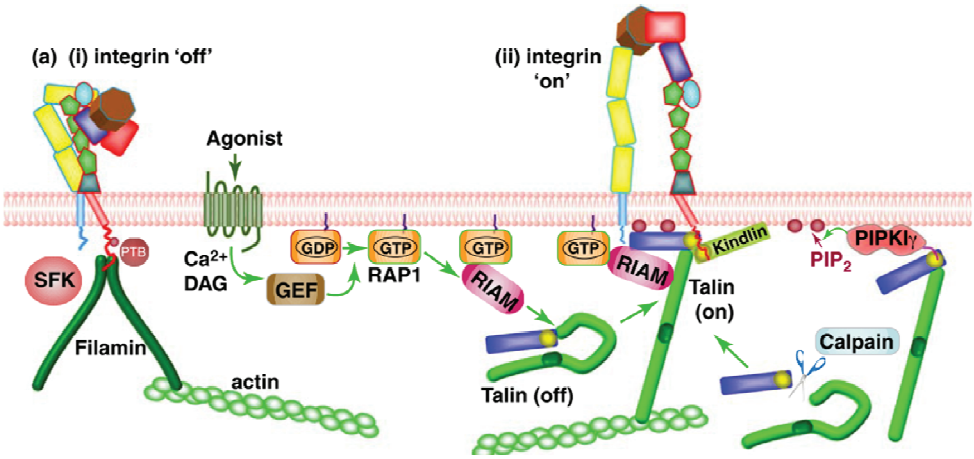


Figure 1-6 : Les principaux mécanismes d'activation des intégrines. Modifié d'après la figure de Anthis et Campbell, 2011.

1.3.3 Le complexe adhésome

Les intégrines forment des complexes multiprotéiques d'adhésion focale avec leur domaine intracellulaire, appelés adhésomes. C'est une structure d'adhérence qui lie la MEC au cytosquelette (Figure 1-7). Il a été identifié plus de 156 protéines liées entre elles pouvant faire intervenir plus de 700 interactions possibles. Ces protéines régulent l'activité de ces différentes protéines dans ce complexe (Humphries *et al.* 2009).

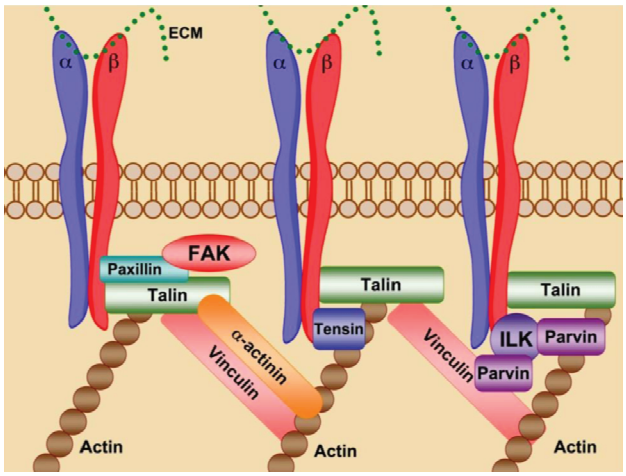


Figure 1-7: Architecture (non-exhaustive) d'un point d'adhérence au niveau de la membrane cytoplasmique (Serrels et al. 2007).

En fonction de leurs activités biologiques, ces protéines peuvent être classées en trois catégories :

- **Les protéines adaptatrices** : elles lient de façon directe ou indirecte les intégrines au cytosquelette. Parmi ces protéines, la taline et la vinculine sont particulièrement importantes pour le renforcement de la connexion entre les intégrines et l'actine (del Rio *et al.* 2009). D'autres protéines participent à cette connexion mécanique, comme la tensine et la paxilline.

- **Les protéines de signalisations** : elles régulent la dynamique des sites d'adhésion. Chez les protéines de signalisation, de nombreuses voies ont été étudiées. Une des plus connues est la voie de signalisation intracellulaire des FAKinases phosphatases, (FAK pour « *focal adhesion kinase* »). Ce sont des protéines qui se lient à la taline ou à la paxilline. Les FAKs contrôlent entre autre la machinerie de polymérisation de l'actine (Serrels *et al.* 2007).

- **Les protéines régulatrices** : du réseau d'actine de la famille des RhoGTPases : elles contrôlent l'organisation et la dynamique du cytosquelette. Dans cette famille de protéine, c'est essentiellement Rho A, Rac 1 et CDC42 (« *cell division control protein* ») qui participent à la régulation des fibres d'actine. Par exemple, la dynamique des fibres d'actines dans les lamellipodes est assurée par Rac 1, CDC42 organise plutôt le réseau d'actine dans les filopodes, et RhoA induit l'assemblage et la contraction des fibres de stress d'actomyosine (Figure 1-8).

En fonction des forces appliquées sur la cellule, un grand nombre de ces protéines répondent par un changement de conformation permettant l'exposition ou non de sites cryptiques.

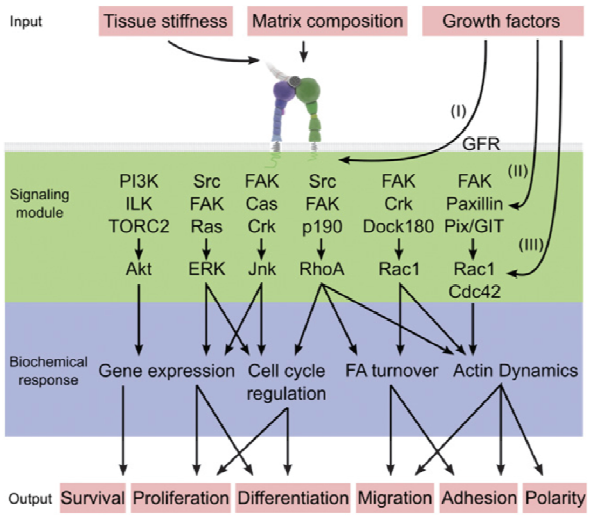


Figure 1-8 : Exemple de protéines régulatrices impliquées dans différentes voies de signalisation (Legate et al. 2009).

1.4 Le cytosquelette chez les cellules eucaryotes

Le cytosquelette est un réseau complexe de filaments protéiques s'étendant dans tout le cytoplasme. Il fait la liaison entre les plaques d'adhésion et le noyau cellulaire. Son organisation donne la morphologie de la cellule. C'est un réseau dynamique et ordonné qui s'adapte aux contraintes de la MEC et des signaux intracellulaires reçus. Le cytosquelette est à l'origine de la plupart des forces exercées par la cellule pour se déplacer et se nourrir.

Le cytosquelette est constitué de trois types de protéines : les filaments d'actine (FAs), les MTs et les filaments intermédiaires (FIs) (Figure 1-9).

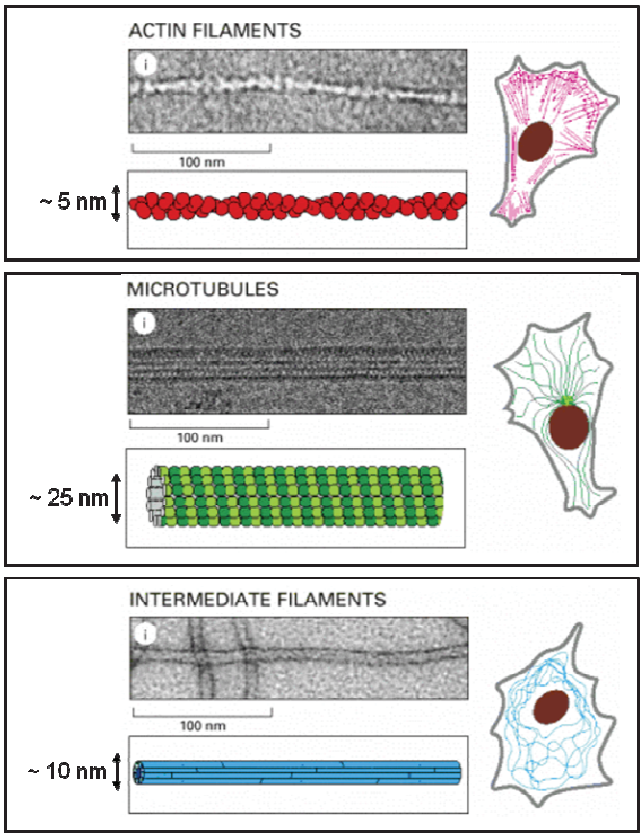


Figure 1-9 : Les principaux éléments du cytosquelette. Adaptée de Bruce Alberts, 2002.

La découverte d'un réseau structuré de fibres dans les cellules remonte à plus de 300 ans. Les fibres d'actine ont été identifiées à partir de cellules de muscle en 1887 par

le Pr Halliburton (Halliburton 1887), en tant qu'élément capable de coaguler des préparations de myosine. Mais c'est en 1942 que le Pr Straub leur donna le nom d'aujourd'hui. Les MTs sont nommés ainsi en 1963 par le Pr Slautterback (Slautterback 1963), bien que les premières observations dates du 19ème siècle. C'est plus tardivement que les FIs ont été identifiés en 1968. Leur nom est justifié par un diamètre intermédiaire à celui des FAs et des MTs (Ishikawa *et al.* 1968; Carlier 1991). Des protéines auxiliaires permettent d'organiser ce réseau. Ces principales protéines sont :

- Les protéines de pontage (les « *crosslinkers proteins* ») sont des protéines conduisant à la liaison entre les filaments. Elles sont contrôlées par la cellule par d'autres protéines de régulation, ce qui permet des réorganisations rapides du cytosquelette. En exemple, on peut citer la fimbrine.

- Les protéines dépolymérisantes (les « *severing proteins* »), comme les CAPs (« *capping protein* ») qui régulent le taux de polymérisation des filaments d'actine et des MTs à leur extrémité -.

- Les protéines d'ancrage, comme la formine et la spectrine qui amorcent la polymérisation des fibres d'actine.

1.4.1 Les principaux éléments du cytosquelette

1.4.1.1 Les filaments d'actine

Ces fibres sont localisées dans le cytoplasme où elles constituent un maillage bidimentionnel et également dans le noyau où elles forment en réseau tridiementionnel. Les FAs sont des protéines qui se présentent sous forme de monomère globulaire (actine-G) ou sous forme de polymère filamenteux (actine-F). Un microfilament d'actine est une structure chargée, composé d'une extrémité à croissance rapide (extrémité +) où se situe la poche de fixation pour l'ATP (adénosine triphosphate) et d'une extrémité à croissance lente (extrémité -). La polymérisation d'un actine-G en actine-F est amorcée par la présence d'ions Mg^{2+}, K^{+} ou Na^{+}. La polymérisation consiste à ajouter successivement des actines-G à l'extrémité + (Carlier 1991). Le processus est réversible ; la baisse de la force ionique dépolymérise le microfilament. La consolidation des filaments d'actine se fait en présence de la tropomyosine.

Les FAs sont reliés physiquement aux contacts focaux *via* les intégrines, ce qui permet la traction de la cellule lors de la migration (Vicente-Manzanares *et al.* 2009). L'organisation du réseau d'actine a un rôle primordial dans le maintien de la morphologie cellulaire, dans le maintien de la cohésion entre les cellules avoisinantes grâce à l'ancrage des plaques d'adhésion et dans la résistance aux stress mécaniques (Figure 1-10).

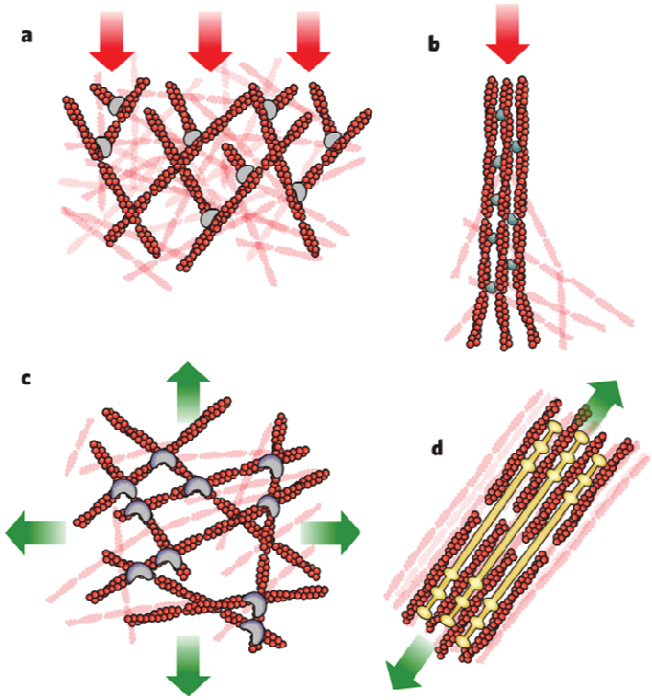


Figure 1-10 : Schéma des formes variables du réseau d'actine dépendant de ses différentes fonctions. Les flèches rouges représentent la direction de compression, et les flèches vertes indiquent les tensions. A) FAs ramifiés poussés contre la membrane plasmique, rencontrant ainsi des forces de compression interne. B) FAs regroupés dans les filopodes générant une force de propulsion. C) Réseaux non-alignés permettant de transporter des charges de traction dans de multiples directions. D) Fibres de stress de FA associés à la myosine responsable de la contraction cellulaire. D'après Fletcher et Mullins, 2010.

Les FAs ont plusieurs partenaires protéiques. Par exemple, la myosine de type II est impliquée dans le mouvement de vésicules sur le réseau d'actine. La spectrine est responsable de l'ancrage des FAs à la membrane plasmique. La fimbrine est impliquée dans la formation des faisceaux de FA.

1.4.1.2 Les microtubules

Les MTs sont les constituants les plus rigides du cytosquelette. Un paragraphe décrivant sa structure et sa participation importante lors de la mitose est abordé (cf. § les microtubules : structures et fonctions, p.45).

1.4.1.3 Les filaments intermédiaires

Les FIs sont principalement distribués autour du noyau et s'étendent vers la périphérie de la cellule. Leur taille est d'environ 10 nm de Ø. Les FIs sont regroupés en cinq classes : les kératines de type acide, les kératines de type basique, les vimentines, les neurofilaments et les lamines. Les lamines sont les seuls FIs présents dans le noyau. Contrairement aux FAs et aux MTs, les FIs sont les seuls protéines du cytosquelette ne présentant pas de polarité. Ils n'interviennent donc pas dans le transport directionnel.

1.4.2 Les fonctions du cytosquelette

Le jeu de toutes ces protéines se liant les unes aux autres permet d'agir de façon coopérative pour engendrer les mouvements de la cellule, la migration ou la réponse à un environnement défavorable. Le cytosquelette contribue à de nombreuses fonctions dans la cellule. Voici une liste non exhaustive de ses principales activités :

- L'ancrage à la MEC et aux cellules voisines ;
- La régulation de la morphologie de la cellule ;
- Le maintien de la structure interne ;
- Le transport de protéines et d'ARN messager (ARNm) ;
- La ségrégation des chromosomes lors de la mitose grâce aux MTs ;
- La formation de l'anneau contractile par les filaments d'actine lors de la cytokinèse ;
- La contraction musculaire ;
- La formation de protrusions membranaires, qui est importante lors de la phagocytose ou de la migration cellulaire par exemple.

1.5 Les protéines de signalisation Rac 1 et MAP kinase

1.5.1 La protéine Rac 1

Rac 1 fait partie de la famille des Rho GTPase G, de la superfamille des Ras. C'est une petite protéine de signalisation de 21 kDa qui est exprimée de manière ubiquitaire. Elle a de multiples fonctions dans la cellule : elle participe à la régulation du cytosquelette d'actine, à la croissance cellulaire, et également dans les phagocytes où elle contrôle la production d'anions superoxydes essentiels à la fonction de bactéricide par interaction avec le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxidase). Rac 1 interagit avec un complexe multiprotéique contrôlant la polymérisation de l'actine à l'origine de la formation des lamellipodes et des ondulations de la membrane (Figure 1-11) (Eden *et al.* 2002; Morgan *et al.* 2007). C'est en mutant Rac 1 que Ridley a vu l'inhibition du réarrangement du cytosquelette observée dans plusieurs types cellulaires dont les cellules épithéliales (Ridley 2001).

En mitose, Rac 1 exerce une activité de tension impliquée dans le positionnement correct des chromosomes et dans l'orientation du fuseau mitotique (Mitsushima *et al.* 2009). Cette activité est supprimée dans la zone de séparation des deux cellules filles et augmente en télophase dans la membrane plasmique des deux côtés polaires opposés pour permettre le processus de cytokinèse (Yoshizaki *et al.* 2003).

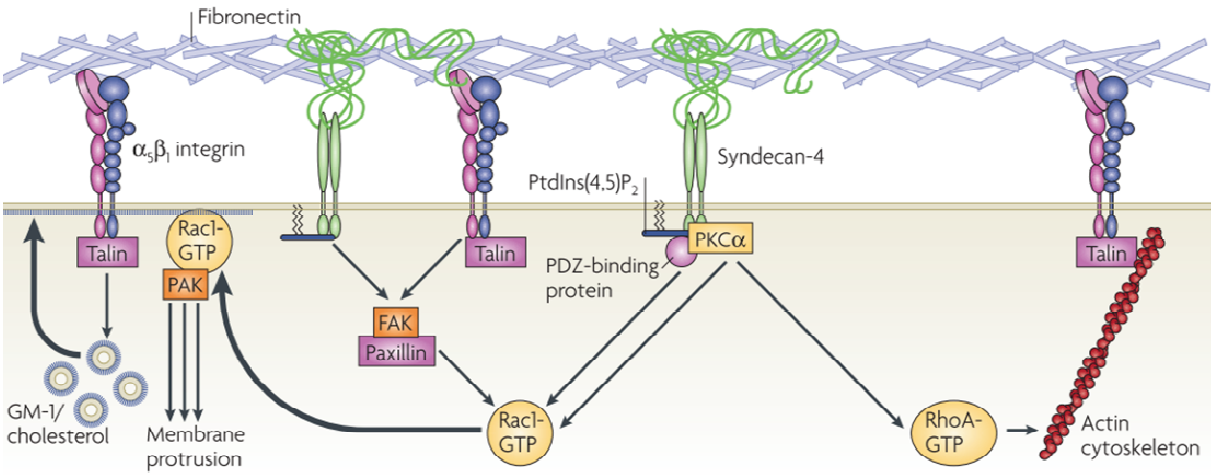


Figure 1-11: Activation des régulateurs Rac 1 et RhoA dépendant de la synergie entre l'intégrine et sundécan-4 pour réguler la prolifération des fibres d'actine et la protusion de la membrane plasmique Morgan et al. 2007.

1.5.2 La voie des MAP kinases

Les MAP kinases (MAP pour *« mitogen-activated protein »*) sont des protéines ubiquitaires qui catalysent la phosphorylation des protéines MAP. La voie des MAPs kinases est une des principales voies d'activation de la prolifération cellulaire. Toutes les cellules eucaryotes possèdent de nombreuses voies MAP kinases dont les fonctions sont de coordonner la régulation de diverses activités cellulaires, telles que la division, la mobilité, la survie, la différenciation cellulaire, le métabolisme, l'apoptose et l'expression génique. Trois sous familles composent les MAP kinases : les ERK (« *extracellular signal-regulated kinases* »), les JNK (« *Jun* NH_2*-terminal kinases* ») et les p38 kinases (Johnson et Lapadat 2002).

Les MAP kinases s'activent mutuellement les unes les autres en cascade. Ainsi activées, elles catalysent la phosphorylation sur des résidus sérine ou tyrosine d'une série de substrats, comprenant des phospholipases, des facteurs de transcription, des protéines du cytosquelette.

Il apparaît aussi clairement que l'activité de ces protéines est liée à leur degré de phosphorylation. Ainsi, il a été démontré chez les MAP kinases de mammifères seulement la double phosphorylation de la protéine mène à une activation complète et efficace (Anderson *et al.* 1990).

Comme la voie des MAP kinases stimule la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire, et que cette voie est généralement altérée dans différentes pathologies, il est apparu qu'elle représente un témoin de l'état de la cellule. Ainsi, la recherche de l'activation des MAP kinases, par exemple lors d'expériences de Western-blot, est une première indication sur l'état métabolique de la cellule.

1.6 Le cycle cellulaire et sa phase mitotique

Les premières descriptions du processus de division cellulaire datent de 1841 par les écrits de Robert Remark. Ces travaux sur l'embryologie lui ont permis de considérer que toutes les cellules proviennent d'une cellule. Cette théorie n'est acceptée qu'un peu plus tard par la communauté scientifique lorsque Rudolf Virchow affiche son soutien aux travaux de Remark en 1858. « *Omnis cellula e cellula* » : toute cellule provient d'une

cellule, tel est la célèbre proposition de Remarck et Virchow. Ce n'est qu'un siècle après, avec les travaux de Howard et Pelc en 1955, que la notion de cycle cellulaire est introduite (Pelc et Howard 1955). Ils démontrent que la duplication des chromosomes et le processus de division cellulaire sont deux processus temporellement dissociés.

Une brève introduction sur les différentes phases du cycle cellulaire sera abordée dans la première partie, avec une description plus complète sur la phase mitotique.

1.6.1 Les différentes phases du cycle cellulaire

A partir d'une cellule mère, un cycle cellulaire permet d'obtenir deux cellules filles, dont le patrimoine génétique reste identique. Ce cycle comprend deux grandes parties : l'interphase et la phase mitotique (ou la division cellulaire) (Figure 1-12). La cellule peut sortir du cycle cellulaire et se mettre dans un état de quiescence, cela correspond à la phase G_0 (G pour « *gap* »). Durant cette phase, la cellule est en repos : son métabolisme est fortement ralenti.

Le déroulement du cycle cellulaire est extrêmement régulé et contrôlé. A différentes étapes du cycle, des points de contrôle permettent à la cellule mère de vérifier l'intégrité du génome et sa répartition équitable entre les deux cellules filles (Hartwell et Weinert 1989).

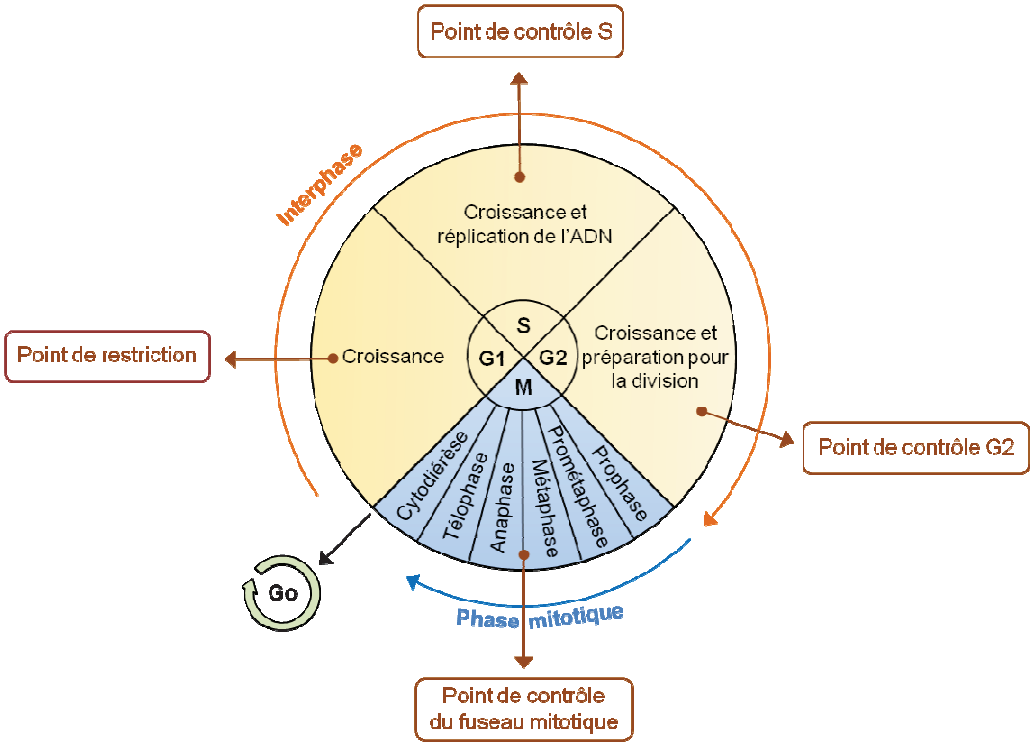


Figure 1-12 : Les différentes phases du cycle cellulaire et ses points de contrôle.

Les dérégulations du cycle cellulaire peuvent conduire à des proliférations anarchiques des cellules. C'est le cas des cellules cancéreuses qui poursuivent leur progression en interphase et en mitose, échappant aux nombreux points de contrôle du cycle cellulaire. La connaissance des différents mécanismes de régulation des phases du cycle cellulaire est donc un aspect fondamental qui pourrait servir à mettre au point de nouvelles approches thérapeutiques pour la cancérologie.

L'interphase est un temps de croissance cellulaire et de duplication de l'ADN. Elle regroupe trois phases:

- **La phase G_1** (G_1) est l'intervalle au cours de laquelle la cellule est en pleine croissance. Durant cette période, une fois le point de restriction passé, la cellule synthétise principalement les constituants qui lui seront nécessaires pour l'étape de réplication de son ADN. Le passage de la phase G_0 à G_1 nécessite la présence de signaux mitogènes qui activent l'entrée en interphase.
- **La phase S** (S pour synthèse) est un des évènements fondamentaux du cycle cellulaire. Alors que la cellule croît, la phase de synthèse de l'ADN est amorcée, permettant la duplication total des chromosomes selon un mécanisme de réplication semi-conservatif. Le centrosome est également dupliqué dans le cytoplasme lors de cette étape.
- **La phase G_2** (G_2) est une dernière phase de croissance. Elle permet à la cellule de se préparer à entrer en mitose et de synthétiser la plupart des protéines nécessaires à la poursuite du cycle cellulaire. Le dernier point de contrôle en G_2 vérifie l'achèvement total de la réplication et l'absence de lésions dans l'ADN.

1.6.2 La division cellulaire

La seconde partie du cycle cellulaire est identifiée par la mitose (la phase M) et la cytodiérèse (également appelée cytokinèse) noté en bleu dans la Figure 1-12.

La mitose a lieu uniquement dans les cellules eucaryotes : elle se caractérise par un cycle de condensation/décondensation des chromosomes dupliqués, les égales répartitions des chromatides entre les deux cellules filles, puis par la division « physique » de ces dernières. Alors qu'en interphase le noyau de la cellule est limité par

une enveloppe nucléaire, lors de la mitose cette enveloppe se déstructure, et cette phase est caractérisée par l'apparition des chromosomes visibles au microscope.

La mitose se divise en cinq étapes : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (Figure 1-13). Lors de ces phases, le cytosquelette interphasique subit une importante réorganisation, menant à la formation du fuseau mitotique composé principalement de microtubules (Wittmann et Waterman-Storer 2001).

- **La prophase**: c'est au cours de cette première étape que les chromosomes dupliqués commencent à se condenser. L'enveloppe nucléaire se dissocie et les centrosomes dupliqués en phase G_2 se séparent et se déplacent à deux pôles diamétralement opposés de la cellule. Ils forment ainsi les futurs pôles du fuseau mitotique.

- **La prométaphase** : la condensation des chromosomes continue et le fuseau mitotique se constitue dans toute la cellule. Chaque chromosome est capturé au niveau de son centromère par les fibres de microtubule polarisés grâce à une structure protéique appelée kinétochore.
- **La métaphase**: une plaque métaphasique se forme grâce à l'alignement des chromosomes sur un même plan. Chaque chromatine de chaque paire de chromosome est reliée à un pôle opposé du fuseau mitotique. A la fin de cette étape, un point de contrôle, le « *mitotic checkpoint* », vérifie que chaque chromosome dupliqué est correctement attaché en son centromère au fuseau mitotique avant la prochaine étape.
- **L'anaphase**: cette phase marque la séparation physique des chromosomes copiés en deux lots égaux. Les chromatides sont chacunes tirées vers un pôle opposé de la cellule par les MTs. Les MTs se dépolymérisent pour permettre la migration progressive des chromosomes.
- **La télophase** : lors de cette dernière étape de division, le réseau de microtubules se dépolymérisent progressivement et les chromosomes se décondensent. Une enveloppe nucléaire se forme autour de chaque groupe de chromosomes. Une invagination au centre du cytoplasme se forme progressivement préparant la cellule mère à se sépare en deux cellules filles.

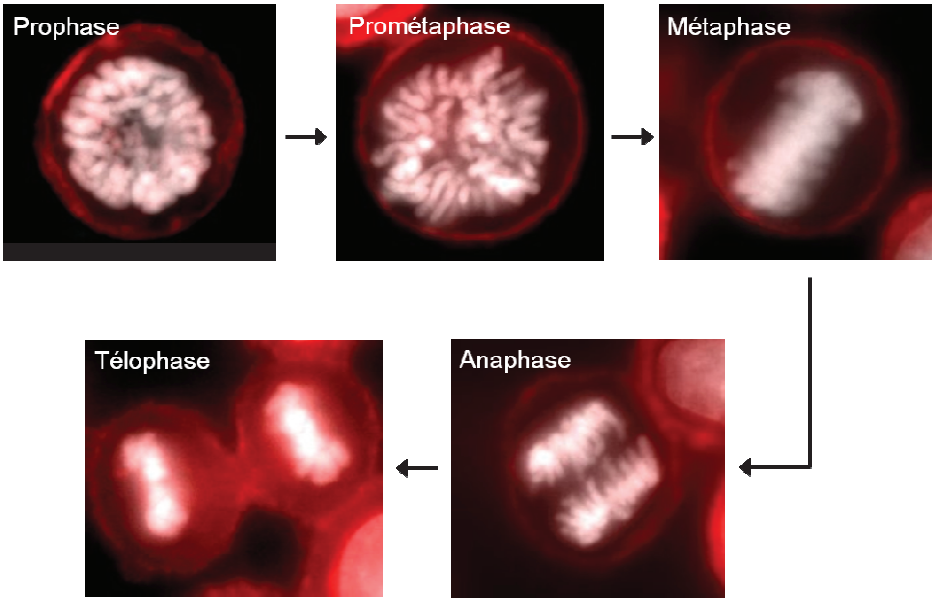


Figure 1-13 : Les différentes phases de la mitose observées par immunofluorescence chez une cellule épithéliale. L'ADN est visible en gris et les filaments d'actine sont marqués en rouge.

- **La cytodiérèse** n'est autre que la séparation physique de deux cellules filles obtenues à la fin du cycle mitotique. Durant la période de cytokinèse, le sillon de division se forme dans le plan perpendiculaire à l'axe du fuseau mitotique (Lafaurie-Janvore *et al.* 2013). Au niveau de l'invagination de la membrane cytoplasmique, un anneau contractile se forme, composé essentiellement de fibres d'actine et de myosines (Figure 1-14). L'anneau contractile disparait lors de l'individualisation complète des deux cellules filles. Puis, l'enveloppe nucléaire et les nucléoles se reconstituent. Une fois la séparation faite, les deux nouvelles cellules peuvent entrer à leur tour dans un cycle cellulaire ou rester en phase de repos G_0.

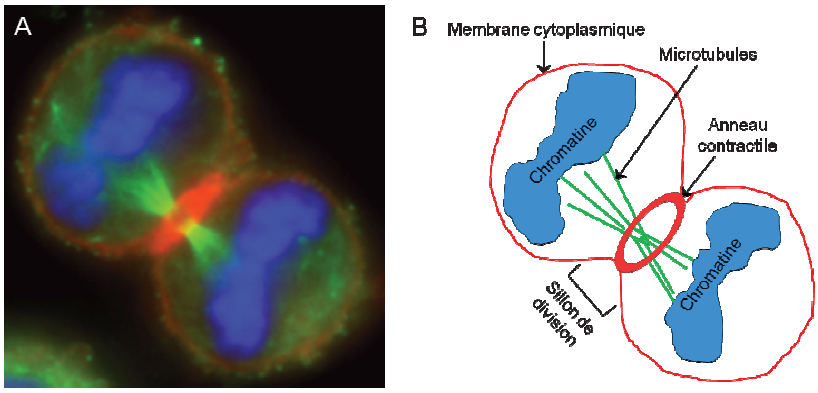


Figure 1-14 : Cellule épithéliale en fin de cytodiérèse : vu de l'anneau contractile en rouge. A) Cellule observée au microscope épifluorescent. B) Schéma de la cellule avec ses composants.

1.6.3 Structure et dynamique du fuseau mitotique

La propagation des signaux physiques à travers une cellule eucaryote est assurée par les fibres du cytosquelette. Ces fibres sont à l'origine de la plupart des forces générées par la cellule pour se déplacer et se développer (Wang *et al.* 2009). Les MTs sont fortement impliqués dans le processus mitotique, notamment dans la formation de la plaque équatoriale, la séparation et le déplacement des chromatines filles.

1.6.3.1 Les microtubules : structures et fonctions

Un MT constitue la fibre la plus rigide du cytosquelette du à sa conformation en tube. Elle est constituée de deux types de tubuline : l'α-tubuline et la β-tubuline. La tubuline est un hétérodimère formée d'une protéine α tubuline et d'une β-tubuline, de masse moléculaire d'environ 100 kDa. Ces deux sous-unités se distinguent par quelques acides aminés différents (5 à 10%). Les tubulines s'associent pour former un protofilament, et un MT est un cylindre creux d'environ 25 nm de Ø composé de 13 protofilaments (Figure 1-15).

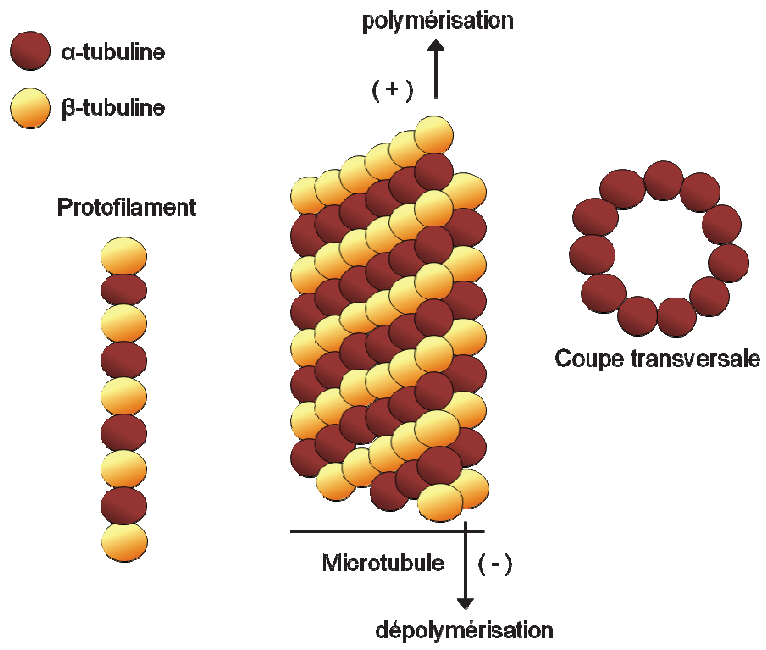


Figure 1-15 : Assemblages des tubulines pour obtenir un microtubule dynamique.

Le réseau de microtubules prend son origine du centrosome qui l'organise (Boveri 1900). Il possède des propriétés intrinsèques d'auto-assemblage qui implique l'hydrolyse de la molécule guanosine triphosphate (GTP). Le réseau de MTs est un

système extrêmement dynamique qui se polymérise ou se dépolymérise en fonction de réponses cellulaires. C'est l'α-tubuline qui fixe le GTP et la β-tubuline qui l'hydrolyse, créant ainsi une polarité aux extrémités des protofilaments. Si la concentration en tubuline-GTP augmente, l'extrémité (+) du microtubule se polymérise, et inversement si la concentration de tubuline-GTP est faible, le MT se dépolymérise à son extrémité (-). Le centrosome permet de polymériser les microtubules et d'assembler le fuseau mitotique pendant le cycle mitotique (Nigg 2002). Le désassemblement des fibres est considéré comme une catastrophe (Gardner *et al.* 2013). Un environnement défavorable, causant par exemple un stress, peut induire le désassemblement des microtubules.

Dans le domaine de la pharmacologie, trois sites de liaison à la tubuline sont utilisés comme cibles anti-cancéreuses. La colchicine et la vinblestine se lient aux MTs et inhibent la polymérisation. La dépolymérisation des microtubules peut être inhibée par le taxol.

1.6.3.2 Le fuseau mitotique

Le fuseau mitotique se forme dès le déclenchement du cycle mitotique. La stabilisation et le maintien du fuseau sont apportés par les centrosomes, la chromatine et les protéines associées, telles que les kinésines.

La chromatine a un effet important sur les MTs, elle seule est capable d'induire son assemblage, indépendamment des centres organisateurs (Carazo-Salas et Karsenti 2003). En effet, les microtubules kinétochoriens sont stabilisés au voisinage des chromosomes, ce qui permet un alignement correct des chromosomes sur la plaque métaphasique. A l'inverse, les MTs astraux se polymérisent ou se dépolymérisent en permanence. Afin d'assurer une ségrégation correcte des chromosomes, il est essentiel que les microtubules autour des chromosomes soient stables jusqu'à la métaphase et que les microtubules kinétochrorines se déstabilisent ponctuellement par dépolymérisation à partir de l'anaphase.

La formation du fuseau mitotique ne peut se faire sans certaines protéines. Des moteurs moléculaires, comme la kinésine CENP-E (« *centromere-associated protein* ») et la dynéine, interagissant à la fois avec les microtubules et la chromatine sont nécessaires pour l'assemblage du fuseau. Ces moteurs participent aux mouvements des

chromosomes *via* le fuseau mitotique. L'association de cette machinerie protéique combinée à la dynamique de polymérisation/dépolymérisation aux extrémités des microtubules permettent le déplacement des chromosomes (Figure 1-16).

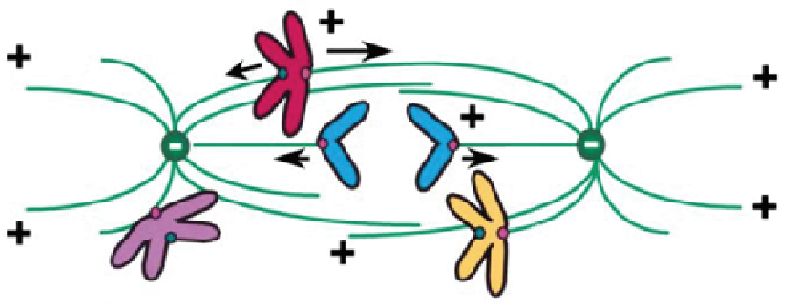


Figure 1-16: Mouvement des chromosomes sur le fuseau mitotique. Translocation rapide du chromosome mono-orienté (violet) vers un pôle. Chromosome à mouvement oscillatoires au niveau du pôle (jaune). Congression du chromosome vers le fuseau équatoriale (rouge). Séparation des deux chromatides sœurs vers les deux pôles en anaphase (bleu). Adaptée de Cleveland et al.,2003.

1.7 Le noyau et ses constituants

A l'exception des érythocytes et des thrombocytes, le noyau est présent dans toutes les cellules eucaryotes. Le noyau cellulaire est séparé du cytoplasme par une double membrane lipidique qui se prolonge par le réticulum endoplasmique (RE). Des pores nucléaires permettent le transport de molécules entre les deux compartiments (entre 2000 et 4000 pores par noyau). L'enveloppe nucléaire a également un rôle dans la transmission de signaux mécaniques par l'intermédiaire de complexes protéiques inclus dans la membrane plasmique (Crisp et Burke 2008). C'est dans le noyau qu'a lieu la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN.

Le noyau contient des protéines de structure, comme les lamines reliées aux protéines de l'enveloppe nucléaire, les histones, la chromatine, un ou plusieurs nucléoles et divers molécules impliquées dans les différentes activités nucléaires.

1.7.1 Organisation des fibres de chromatine

Chez l'humain, l'information génétique est portée par les nucléotides (environ $6{,}4.10^9$) répartis dans les 46 chromosomes, contenus dans le noyau sous forme

condensée selon plusieurs niveaux. Autour d'histones, 146 paires de bases d'ADN s'enroulent. Ces protéines permettent de compacter et d'organiser l'ADN (Noll et Kornberg 1977). Les histones sont chargées positivement et cela leur permet d'interagir et de se lier aux groupements phosphates de l'ADN. L'ensemble forme un nucléosome d'un diamètre d'environ 11 nm. En microscopie électronique cet assemblage est connu sous le nom de collier de perles. Les nucléosomes sont eux-mêmes super-enroulés pour former des fibres de chromatine, et ces chromatines sont condensées en chromatide, et un chromosome est constitué de deux chromatides (Figure 1-17).

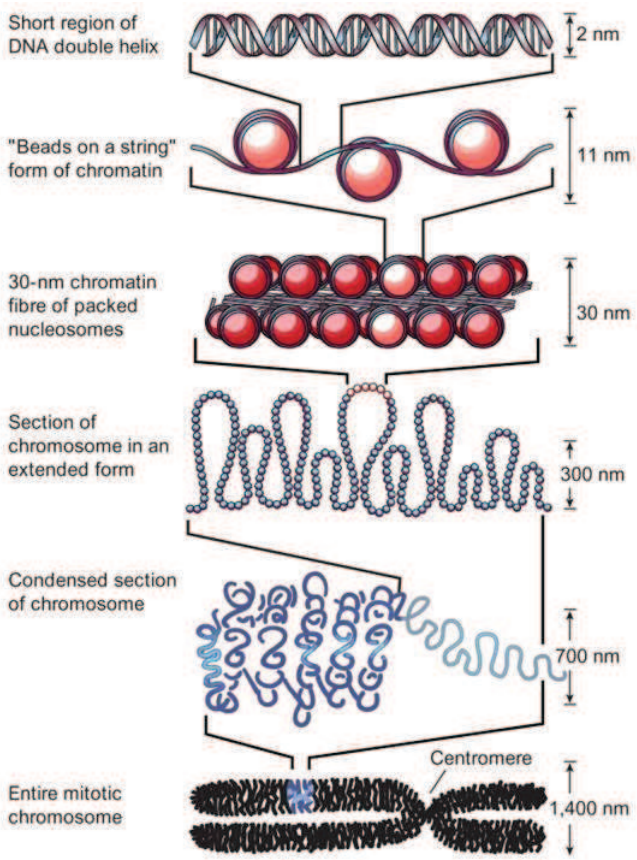


Figure 1-17: Les différents niveaux d'organisation de la chromatine (Felsenfeld et Groudine 2003).

1.7.2 La matrice nucléaire

La matrice nucléaire contient un réseau de fibres, un peu analogue à celui du cytosquelette. Ce réseau, nommé nucléosquelette, est la charpente du noyau et exerce un rôle dans l'organisation des chromosomes, la régulation de l'expression des gènes et la réplication de l'ADN.

La matrice nucléaire comporte trois types de constituants :

- Les lamines : qui sont des protéines fibrillaires faisant partie de la famille des filaments intermédiaires. Elles ont un rôle dans l'assemblage du noyau en fin de mitose, dans l'organisation de la chromatine, la réplication, la position des pores nucléaires et encore dans la régulation de certains gènes ;
- Des molécules dites « insolubles », tels que des polymérases, des ribonucléoprotéines, des protéines fibrillaires disposées en réseau sous membranaire associés aux pores nucléaires ou des protéines régulatrices qui contrôlent l'expression des gènes lors de la transcription ;
- Des constituants fibreux du nucléosquelette, tels que les « *Twisted fibrils* ».

Une cellule saine ne présente pas la même composition nucléaire qu'une cellule tumorale. En effet, le noyau de cellules tumorales contient plus d'ARNm nouvellement transcrits. Cette dominante a été utilisée pour caractériser des marqueurs anti-cancéraux (Miller *et al.* 1992).

1.7.3 Le nucléole

Le nucléole est un élément du noyau totalement dépourvu de membrane. Il est en relation étroite avec la chromatine. Le nucléole est le lieu de la transcription des ARN ribosomiques (ARNr) et le lieu de la maturation des ARN de transport (ARNt).

1.7.4 La chromatine

La chromatine est une structure dynamique pouvant se décondenser et se condenser au cours des différentes phases du cycle cellulaire. Il existe deux états de la chromatine dans les noyaux interphasiques. Ces états sont visibles en microscopie électronique où des zones de forte compaction (chromatine condensée : l'hétérochromatine) se distinguent des zones de chromatine diffuse (chromatine décondensée : l'euchromatine) (Figure 1-18). Les histones n'ont pas les mêmes propriétés selon le type de chromatine : chez l'euchromatine les histones sont acétylés, alors que dans l'hétérochromatine les histones sont méthylés.

- **L'euchromatine** forme des fibres chromatiniennes de 3,5 à 6 nm de diamètre, spiralés ou despiralés. Les zones de décondensation de la chromatine correspondent à des zones de gènes actifs c'est-à-dire que c'est le lieu d'activités transcriptionnelles. Elle correspond à la forme majoritaire de la chromatine (environ 80%).

- **L'hétérochromatine** est un ensemble de segments de chromosomes condensés pendant l'interphase. Elle représente entre 15 et 20% de l'ADN nucléaire. L'hétérochromatine est associée à la face interne de la membrane nucléaire par des complexes protéiques et est également localisée en amas isolés dans des régions périnucléolaires. Cette portion d'ADN est dite inactive, car dans cette zone la transcription est réprimée. La protéine HP1 (hétérochromatine protéine de type 1) participe à la condensation de la chromatine.

Des études sur la dynamique chromatinienne chez *Saccharomyces cerevisiae* ont permis de mettre en lumière deux types de complexes pouvant modifier l'état de condensation de la chromatine: les complexes ATP dépendants et les complexes modifiant post-traductionnellement les nucléosomes.

Pour passer de la chromatine relâchée à la chromatine condensée, deux enzymes sont en jeu : l'HAT (histone acétyltransférase) et HDAC (histone désacétylase). Ces enzymes régulent l'expression de l'ADN par acétylation et désacétylation des histones.

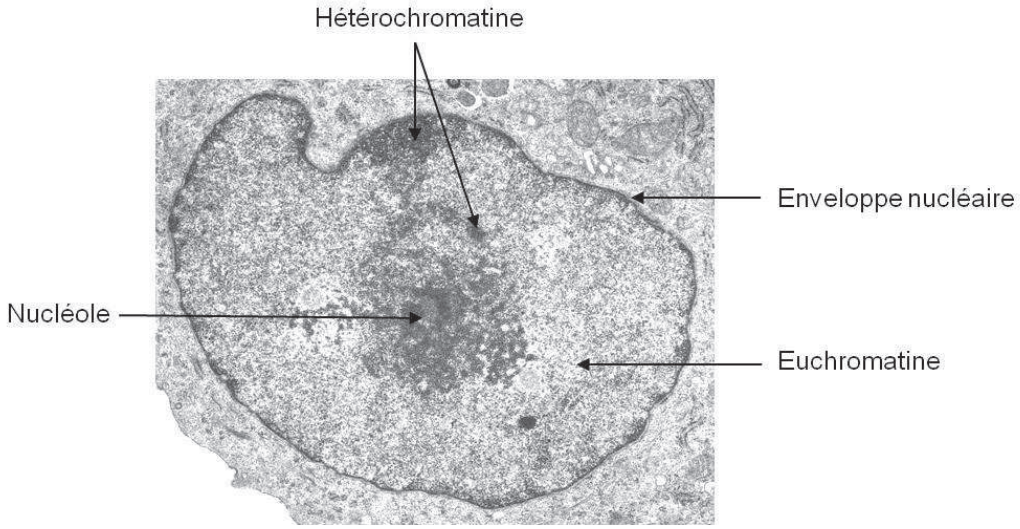


Figure 1-18: Les différents états de condensation de la chromatine dans un noyau d'une cellule épithéliale en interphase.

1.7.5 Les enzymes régulant l'expression de l'ADN

1.7.5.1 L'hétérochromatine protéine 1

La famille des hétérochromatines protéines de type 1 a des fonctions importantes dans le noyau cellulaire. Leur rôle le plus connu est leur implication dans la répression des gènes par formation de l'hétérochromatine. HP1 intervient dans la méthylation des histones en se fixant sur le groupement méthyle H3K9 (Figure 1-19). La fixation de HP1 attire la protéine Suv39, qui méthyle la lysine 9 de l'histone H3 (site H3K9) du nucléosome suivant. En conséquence, il résulte une condensation de la chromatine, conduisant au silence des gènes (Nielsen *et al.* 2002). L'action de Suv39 sera stoppée par la rencontre d'un groupement acétyle sur H3K9. Des travaux récents ont montré que HP1 a également d'autres fonctions : par exemple, elle interagit avec la membrane nucléaire, et a un rôle dans la métaphase pour l'organisation des chromatides en stabilisant les télomères (Fanti et Pimpinelli 2008). Chez les cellules de mammifères, il existe 3 types de HP1 : HP1α, HP1β et HP1γ (Singh *et al.* 1991).

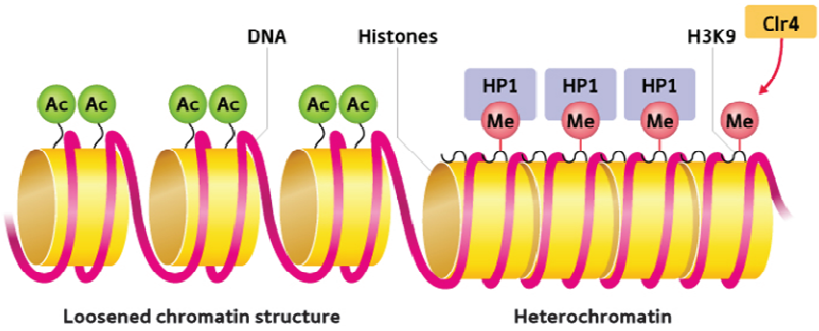


Figure 1-19: Modèle d'attachement de HP1 sur les histones méthylés (Nakayama 2010).

1.7.5.2 L'histone désacétylase

L'histone désacétylase est une classe d'enzyme qui élimine les groupements acétyles sur le site H3K9. Cette désacétylation permet aux histones d'envelopper plus étroitement l'ADN, donc de la condenser pour former de l'hétérochromatine. Récemment, cette protéine est désormais appelée désacétylase lysine (KDAC) à cause de sa fonction. Elle ne désacétyle pas seulement les histones mais aussi d'autres protéines non-histones (Choudhary *et al.* 2009). Les HDACs sont regroupés en quatre groupes en

fonction de leur activité et de leur similarité de séquence. Seule l'activité des groupes I et II est inhibé par la molécule trichostatine A (TSA).

1.7.5.3 L'histone acétylase

L'activité de l'HAT est opposée à celle de HDAC. Son rôle est d'acétyler les lysines présentes sur les histones. Cette régulation permet d'ouvrir la chromatine, en corrélation avec l'activité transcriptionnelle du noyau. L'acétylation des histones augmente l'expression des gènes. L'HAT peut également acétyler des protéines non-histones, telles que des récepteurs nucléaires et des facteurs de transcription (Roth *et al.* 2001). Historiquement, les HATs sont classés en deux groupes en fonction de leur localisation sub-cellulaire (Lee et Workman 2007), mais les fonctions complexes de certaines HATs ou leurs lieux d'activités font que des HATs ne s'intègrent pas dans une classe particulière.

L'HAT et l'HDAC sont recrutés par leur cible promoteur grâce à des interactions physiques avec des facteurs de transcription spécifiques d'une séquence. Les deux enzymes sont présentent dans un complexe protéique dans lequel des protéines sont nécessaires à leurs activités de modification des résidus lysines chez les histones (Figure 1-20).

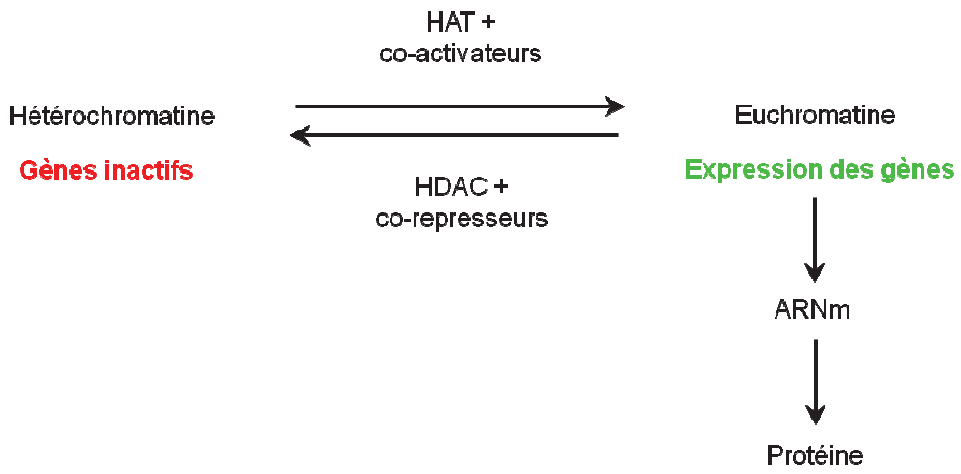


Figure 1-20: Rôle des enzymes HAT et HDAC dans la transcription des gènes d'une cellule eucaryote.

1.7.6 Communication entre le cytoplasme et le noyau

1.7.6.1 Les pores nucléaires

Les pores nucléaires sont les seuls lieux d'import et d'export de macromolécules entre le cytoplasme et le noyau. Un réseau structuré de protéines a pour rôle de contrôler l'état des ARNs qui sortent du noyau et de laisser entrer uniquement les protéines possédant une séquence signal qui les adressent au noyau (la séquence NLS « *nuclear localisation signal* »). Des petites protéines sont capables de rentrer par libre diffusion (protéines inférieures à 34 kDa). Ce filtrage est important pour la régulation de la réplication et la transcription de l'ADN.

1.7.6.2 Lien mécanique avec le cytoplasme

L'enveloppe nucléaire est un intégrateur de l'architecture nucléaire et cytoplasmique. Le nucléosquelette est relié au cytosquelette par un ensemble de protéines associées, appelé le complexe LINC. Ce complexe est principalement composé de nesprines 1/2/3, de protéines SUN ½ (SUN : acronyme de Sad1p, UNC-84), d'émerine et de lamines A/B/C. Les FAs et les FIs sont connectées aux nesprines. Les nesprines sont liées aux protéines transmembranaires SUN *via* leurs domaines KASH (acronyme de Klarsicht-ANC-1). Les SUNs sont directement connectées au noyau par les lamines. Les lamines sont reliées à la chromatine ; ils font le lien entre le complexe LINC et l'ADN. Les émerines sont des protéines liées aux lamines et à la face interne de l'enveloppe nucléaire (Figure 1-21).

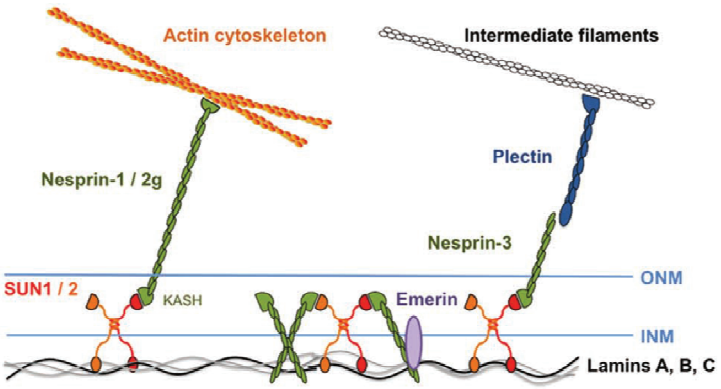


Figure 1-21 : Les différents liens protéiques du complexe LINC avec le cytosquelette chez les cellules eucaryotes (Mejat et Misteli 2010).

L'activité de transcription est liée mécaniquement au cytosquelette par les émerines. Ces protéines sont liées à la lamine A, mais aussi à des facteurs de transcription, notamment des facteurs d'épissage. Ainsi les forces transmises par le cytosquelette à ces protéines *via* le complexe LINC peuvent altérer l'expression de gènes (Figure 1-22).

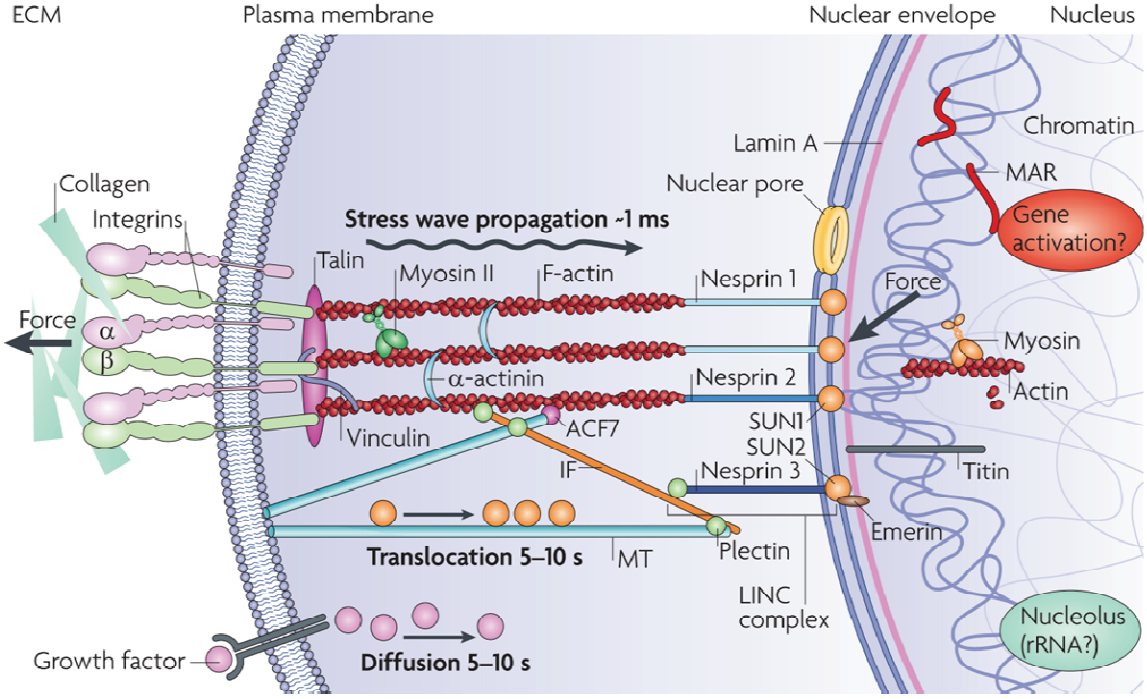


Figure 1-22 : Molécules prenant part à la propagation mécanique des signaux émis depuis la MEC (Wang et al. 2009).

1.8 Activités nucléaires

1.8.1 La réplication chez les eucaryotes

1.8.1.1 Rôle de la réplication

Chez une cellule, la phase de réplication est un processus qui permet de reproduire fidèlement le matériel génétique et d'obtenir deux molécules d'ADN identiques à la molécule initiale. Dans le cycle cellulaire, ce processus s'effectue au cours de la phase S, et est hautement contrôlé par le point de contrôle S qui vérifie l'intégrité du génome (Figure 1-12). Deux principes doivent être respectés : l'ensemble de l'ADN doit être répliqué au cours de chaque division cellulaire et chaque molécule d'ADN ne

doit être répliquée qu'une seule fois par cycle. En 1958, l'expérience de Meselson et Stahl a montré que chez la bactérie *Escherichia coli*, la réplication se réalise selon un mode semi-conservatif : l'ADN sert de matrice à sa propre réplication (Meselson et Stahl 1958). Ce mode de conservation est le même chez les cellules eucaryotes. La réplication se déroule en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Les ADN polymérases (ADN pol) jouent un rôle essentiel dans ce processus. Trois ADN pol participent à la réplication du génome nucléaire chez les cellules eucaryotes : α ADN polymérase (Polα), δ ADN polymérase (Polδ) et ε ADN polymérase (Polε).

1.8.1.2 Les différentes phases de la réplication

- **La phase d'initiation** : la taille des brins d'ADN chromosomique étant très grande, la réplication a plusieurs origines de réplication (ORs) sur un brin. L'ADN peut être répliqué à plusieurs endroits en même temps. Des hélicases ouvrent la double hélice en rompant les liaisons hydrogènes en utilisant de l'ATP et progressent le long de la double hélice. Cette étape aboutit à des segments monocaténaires de l'ADN, qui sont ensuite stabilisés par des protéines appelées RP-A (« *replication protéin-A* ») afin d'éviter la reformation des brins. Les fourches de réplication ainsi formées permettent d'amorcer la synthèse des nouveaux fragments (Figure 1-23). Le déplacement de la fourche de réplication induit la formation de super tours positifs.

-

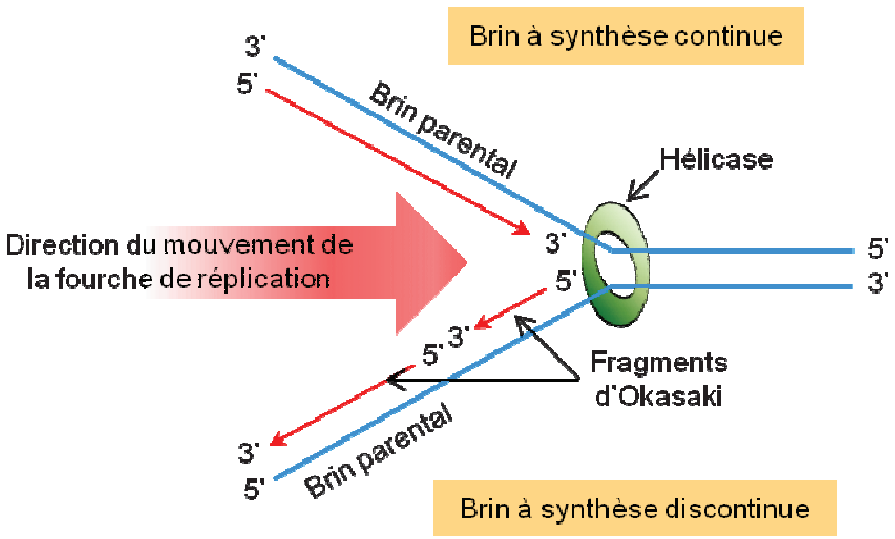


Figure 1-23: Schéma simplifié de la fourche de réplication chez une cellule eucaryote.

- **La phase d'élongation** : le replisome est le complexe de réplication qui se fixe sur chaque OR. Cinq types de protéines cohabitent : l'hélicase, deux ADN pol chacune sur un des brins en cours de synthèse, une primase (Polα) synthétisant des séquences d'amorce ARN des fragments d'Okasaki, deux anneaux protéiques (« *clamp* » ou PCNA pour « *proliferating cell nuclear antigen* ») glissant le long du fragment à copier augmentant la processivité des ADNs et un chargeur de clamp. Les polymérases effectuent exclusivement la synthèse de l'ADN dans le sens 5' vers 3' du brin néo-synthétisé. La réplication chez les eucaryotes progressant de manière bidirectionnelle et de façon simultanée sur les deux brins modèles. Le fonctionnement de la machinerie réplicative se réalise de façon différente sur les deux brins. Un des brins est copié de manière continue par la Polε (brin appelé direct ou précoce), alors que le brin opposé sera répliqué de façon discontinue par la succession de petits fragments nommés fragments d'Okasaki d'environ 200 paires de bases par Polδ (brin indirect ou attardé) (Stillman 2008). La Polα initie la réplication en synthétisant une amorce ARN d'une dizaine de nucléotides au début de chaque fragment d'Okasaki. Après synthèse de l'amorce ARN/ADN, le complexe RFC (« r*eplication factor C* ») permet l'élongation des amorces avec la Polδ (Figure 1-24). La topoisomérase de type I permet la ligature des fragments d'ADN du brin attardé.

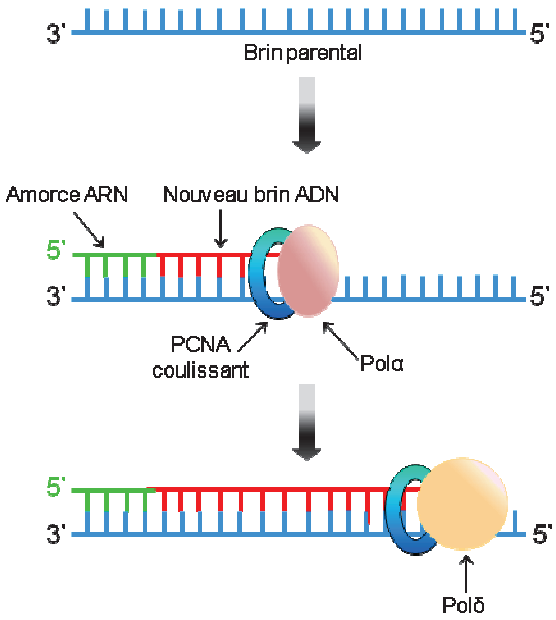


Figure 1-24 : Initiation de la synthèse du brin attardé.

- **La phase de terminaison** : la dernière étape de réplication a lieu lorsque les deux fourches de réplication se rencontrent. Afin de lier les deux nouveaux brins synthétisés, l'ADN ligase de type I catalyse la formation de liaisons phosphodiesters. La topoisomérase de type I permet d'annuler les contraintes topologiques engendrées tout au long de la réplication suite à l'ouverture du double brin d'ADN en coupant la double hélice, et la topoisomérase de type II déconcatène les molécules d'ADN filles.

- **La fidélité de réplication** : répliquer six milliards de nucléotides dans le cas d'une cellule humaine est un grand challenge. Des mésappariements qui peuvent être dus à des insertions, des délétions ou des substitutions de nucléotides se doivent d'être corrigés pour l'intégrité du génome à travers les générations. La fidélité de réplication est assurée par la combinaison de trois mécanismes. Les ADN pol réplicatives (Polδ et Polε) sélectionnent avec beaucoup de précision le nucléotide homologue à la base qu'elles vont répliquer. De plus, certaines polymérases possèdent une activité exo-nucléasique 3' vers 5' mise à contribution lors des erreurs de réplication. Elles peuvent corriger l'incorporation d'une base non appropriée sur le brin néo-synthétisé en cours de l'élongation. Un mécanisme post-réplication de reconnaissance et de réparation des mésappariements, le MMR (« *mismatch repair* »), rétablit la séquence d'ADN correcte si une erreur de copie avait échappé à l'activité correctrice des ADN pol. La contribution de ces mécanismes assure une réplication fidèle estimée à moins de 1.10^{-9} (McCulloch et Kunkel 2008).

1.8.2 La transcription chez les eucaryotes

Un des processus vitaux chez une cellule eucaryote est la production de protéines qui lui permettent de vivre et de se reproduire. Deux processus cellulaires sont nécessaires pour basculer de l'information génétique à une protéine fonctionnelle : se sont la transcription et la traduction.

1.8.2.1 Rôle de la transcription

La transcription permet de transcrire des régions d'ADN en molécules d'ARN. Trois ARN polymérases ADN dépendantes sont impliquées dans ce processus chez les eucaryotes (contre une chez les procaryotes). Ces ARN polymérases (ARN pol) ont été longuement étudiés par le Pr Pierre Chambon à Strasbourg (Chambon 1975). La

transcription a lieu dans le noyau, et pour que les différents acteurs accèdent facilement à l'ADN il faut que la chromatine soit décondensée. Les pré-ARNm produits subiront plusieurs étapes de maturation post-transcriptionnelle, puis seront transportés dans le cytoplasme afin de pouvoir être synthétisés en séquences protéiques par les acteurs de la traduction (Figure 1-25).

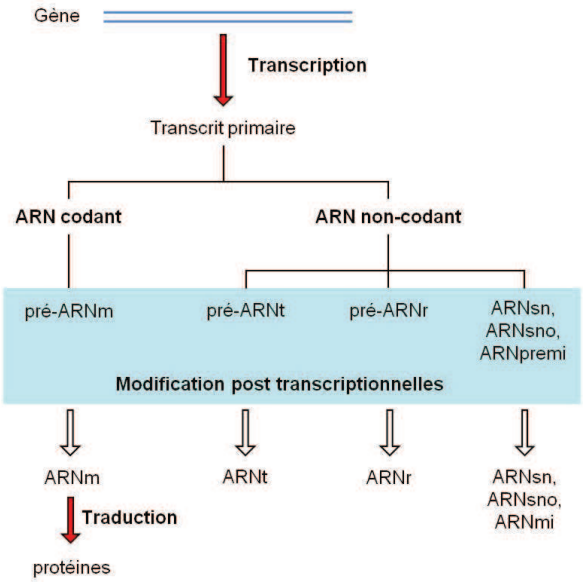


Figure 1-25: Passage du gène à la protéine chez les cellules eucaryotes.

1.8.2.2 Les différentes phases de la transcription

La transcription est subdivisée en trois étapes distinctes : l'initiation, l'élongation et la maturation également appelée l'épissage.

- **La phase d'initiation** : cette première étape a lieu au niveau des séquences promotrices du gène à transcrire, connues sous le nom de TATA-box (thymine-adénine-thymine-adénine). Ces séquences sont situées entre 30 et 70 paires de base avant l'origine de transcription. Des facteurs de transcriptions, les GTFs (« *general transcription factors* »), sont recrutés au niveau du site d'initiation et s'associent à l'ARN polymérase ADN dépendante de type II (ARN pol II ou transcriptase). Cette association de protéines compose le PIC (« *preinitiation complex* ») (Figure 1-26-2). L'ARN pol II se place sur le TSS (« *transcription star site* ») au niveau du gène (Figure 1-26-3). Les GTFs vont stabiliser le complexe protéique-ADN pour ensuite ouvrir le double brin *via* une hélicase. L'ADN monobrin sert de matrice pour l'appariement des ribonucléotides. De nombreux autres facteurs de transcription s'associent au complexe d'initiation, tels que

les cis-activateurs et les trans-activateurs, permettant d'activer les séquences promotrices et augmenter la fréquence. Des co-facteurs régulent l'activation de l'initiation ou la répression de cette même activité. Contrairement à la réplication, la transcription ne nécessite pas d'amorce et il n'y a aucune correction possible.

- **La phase d'élongation** : afin de commencer l'élongation un nouveau brin d'ARN néo-synthétisé (ou le transcrit primaire), la phosphorylation du domaine CTD (« *carboxy terminal domain* »), sur le groupement hydroxyle riches en sérine et thréonine de l'ARN pol II est nécessaire. La polymérase rompt les liens avec les GTFs, et sa phosphorylation entraine son déplacement le long du brin matrice. La synthèse s'exécute de 5' en 3' et un hnRNA *(« heterogeneous nuclear RNA »)* est produit. En premier lieu, la polymérase transcrit entre 20 et 50 ribonucléotides en aval de la séquence TSS et le facteur d'élongation négatif (le NELF pour « *negative elongation factor* ») répète la phosphorylation sur le groupement hydroxyle chez l'ARN pol II (Figure 1-26-4). L'enzyme marque une pause, le complexe NELF se dissocie (Figure 1-26-5) et la synthèse du transcrit primaire peut alors commencer (Figure 1-26-6). Au cours de la synthèse, les transcrits primaires vont subir des modifications à leurs deux extrémités. Très rapidement, à l'extrémité 5', un nucléotide guanine est additionné et méthylé par une guanine-7-méthyl transférase, ce qui permet de protéger le brin d'ARN au cours de la synthèse des nucléases. Cette coiffe est également nécessaire pour la reconnaissance par les ribosomes lors de l'étape de traduction. La synthèse du brin d'ARN se termine lorsque la polymérase rencontre des signaux spécifiques, tels que la séquence AAUAAA. L'enzyme se libère du brin d'ADN sous l'action de différents facteurs (Figure 1-26-7). Une seconde polymérase entre en jeu, la polymérase A (ou PAP pour polyA polymérase). Cette enzyme ajoute environ 200 ribonucléotides adénine à l'extrémité 3' du résidu. Cette séquence poly-A, nommée queue poly-A, est essentielle à la stabilité pré-ARN messager : elle protège l'extrémité des hnRNAs des exonucléases et permettra son transport dans le cytoplasme. Les hnRNAs codants pour les histones sont les seuls à échapper à cette maturation de l'extrémité 3'.

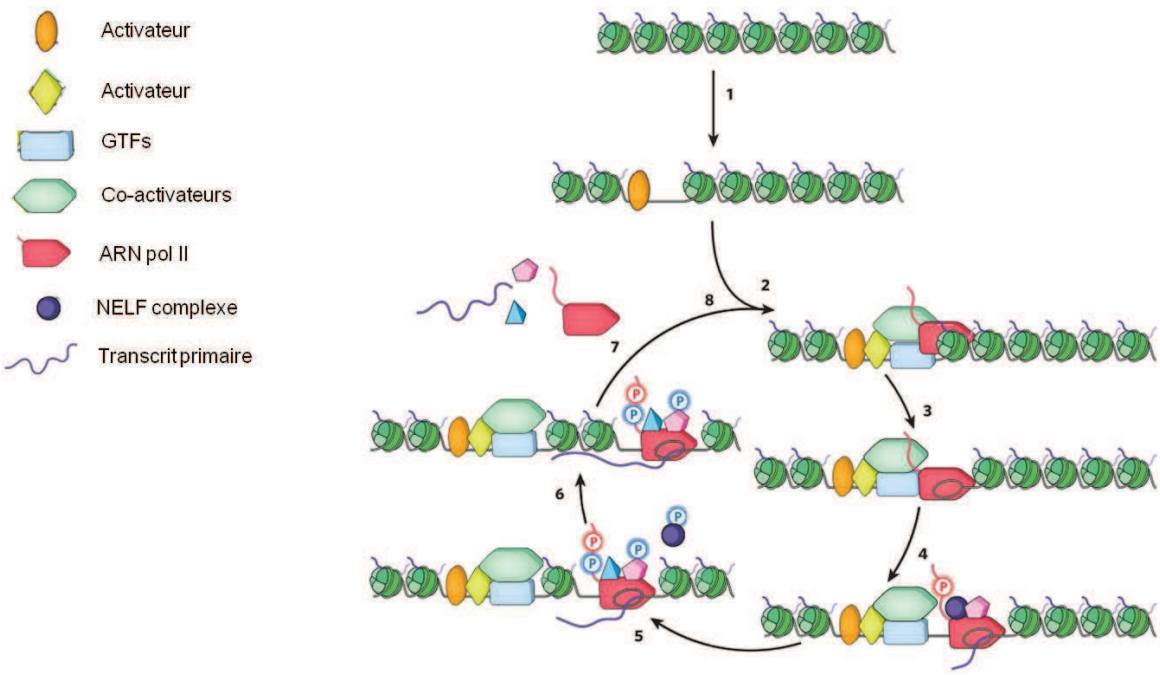


Figure 1-26: Le cycle de transcription chez la Drosophile. 1) Ouverture de la chromatine. 2) Formation du PIC. 3) Initiation : placement de l'ARN pol II sur TSS. 4) Phosphorylation du domaine CTD chez ARN pol II et détachement des promoteurs pour l'avancement de l'enzyme. 5) Pause: dissociation du NELF complexe. 6) Elongation : synthèse du transcrit primaire. 7) Terminaison : libération de l'ARN pol II et du transcrit primaire. 8) Nouveau cycle, l'ARN pol II peut se relancer. Schéma adapté de Fuda et al., 2009.

- **La phase d'épissage** : l'ARN pol II transcrit des séquences d'ADN codantes et non-codantes. Cette étape modifie le transcrit primaire en éliminant les séquences non-codantes (les introns), pour ne garder que les séquences codantes (les exons), car seuls les exons participent à la synthèse protéique. L'acteur principal de la maturation est le spliceosome, composé de divers ribonucléoprotéiques nucléaires, les snRNP (« *small nuclear ribonucleoprotein* »), et de hnRNPs (« *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complexes* »). Le rôle du spliceosome est de reconnaitre les introns, de les éliminer, et de relier les exons. L'épissage permet aussi d'obtenir différentes protéines à partir du même gène en sélectionnant les exons à conserver : c'est l'épissage alternatif. Les brins d'ARN maturés permettent d'obtenir des ARNm, indispensables pour l'export nucléaire et le processus de traduction.

1.8.3 Les complexes ribonucléoprotéiques hnRNPs

L'équipe du professeur Dreyfuss étudie depuis les années 80 les complexes ribonucléoprotéiques nucléaires. La famille des hnRNPs est constituée de plus de 20 protéines désignées de A1 à U (Piñol-Roma *et al.* 1988). Ces protéines s'associent aux pré-ARNm nouvellement transcrits lors de l'épissage. Elles participent aux réactions nécessaires à la génération d'un ARNm, et jouent un rôle important dans l'export de l'ARNm du noyau vers le cytoplasme (Matthew Michael *et al.* 1995; Izaurralde *et al.* 1997). Bien que toutes les hnRNPs soient localisées dans le noyau, certaines font la navette entre le noyau et le cytoplasme, c'est le cas de hnRNP A1, la plus petite des hnRNPs. Certaines aident au package des pré-ARNm dans le spliceosome, d'autres influencent le choix des sites d'épissage, et d'autres encore sont impliquées dans le transport des pré-ARNm dans le cytoplasme.

- **La hnRNP A1** : la protéine hnRNP de type A1 (A1) se lie à un pré-ARNm, et suit cette séquence ribonucléoprotéique lors de son importation dans le cytoplasme. Elle est recrutée lors de l'épissage des pré-ARNm et elle est présente lors de la traduction (Kim *et al.* 2000). Son domaine C-terminal lui permet une liaison avec un simple brin d'ADN ou d'ARN (Kumar et Wilson 1990). L'import nucléaire de A1 dépend de l'activité de l'ARN pol II. En effet, lorsque la cellule ne transcrit pas d'ADN, A1 est localisé dans le cytoplasme. Son recrutement se réalise dans le noyau seulement si l'ARN pol II est également recrutée dans le noyau, c'est-à-dire au moment où la cellule transcrit des pré-ARNm. Sous l'effet d'inhibiteur de l'ARN pol II, tel que l'α-amanitine, l'importation nucléaire de la protéine A1 étant bloquée, celle-ci reste localisée dans le cytoplasme (Pinol-Roma et Dreyfuss 1992; Piñol-Roma et Dreyfuss 1993). La visualisation de A1 dans le noyau cellulaire par immunofluorescence montre indirectement une activité transcriptionnelle chez la cellule.

- **La hnRNP L** : la hnRNP de type L (L) , fortement concentré dans le noyau a été la première hnRNP identifiée (Piñol-Roma *et al.* 1988). L'épissage de pré-ARNm est catalysé par l'activité du spliceosome et la protéine L a un rôle dans la suppression de plusieurs exons lors de l'épissage alternatif (Hung *et al.* 2008). Elle interagit avec la sous unité MED-23 du complexe médiateur (« *mediator complex subunit 23* ») lors de la régulation de la transcription (Huang *et al.* 2012). Chiou Ni-Ting a montré récemment

que la protéine L recrute A1 et travaillent ensemble pour supprimer les introns sur le pré-ARNm (Chiou *et al.* 2013). Contrairement à la protéine A1, l'activité de la protéine L ne dépend pas de l'ARN pol II.

1.8.4 La trichostatine A

La trichostatine A (TSA) est un antibiotique antifongique produit chez *Streptomyces hygroscopicus*.

La TSA inhibe de manière sélective les histones désacétylases de classe I et II. La suppression de l'activité de l'HDAC induit une augmentation de l'acétylation des histones (Figure 1-27). Une des conséquences est l'augmentation de l'expression de gènes spécifiques qui provoque d'importants changements morphologiques et métaboliques de la cellule. Un des mécanismes proposé est que la TSA favorise l'expression des gènes liés à l'apoptose. Cela conduit les cellules cancéreuses à un ralentissement de la progression du cancer, avec la présence de concentrations submicromolaires de TSA, et ce avec une très faible toxicité envers les cellules normales (Vigushin *et al.* 2001; Shankar et Srivastava 2007). Cette molécule aurait donc un potentiel en tant que médicament anti-cancéreux.

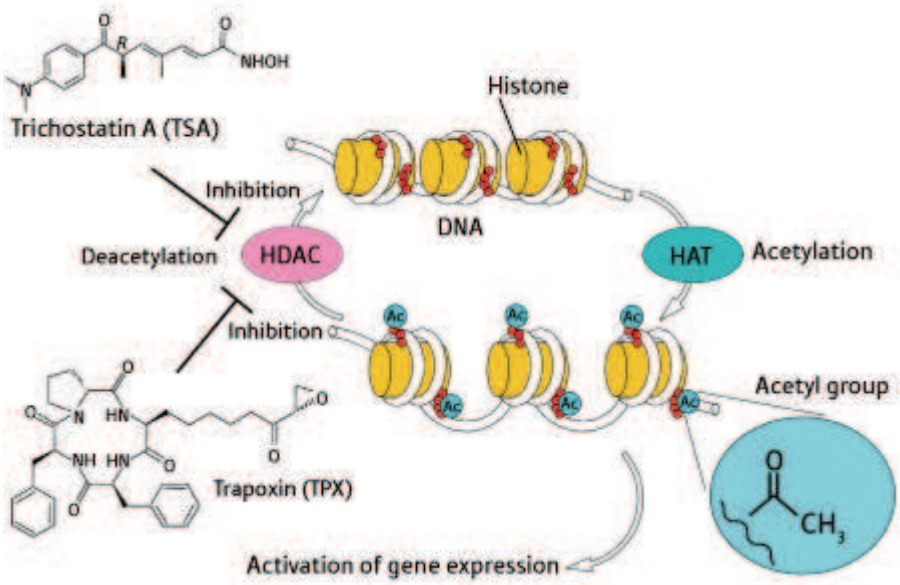


Figure 1-27 : Influence de TSA sur l'expression des gènes (Yoshida 2008).

Un traitement TSA réversible perturbe les domaines nucléaires enrichis en protéines HP1 (Taddei *et al.* 2001). La conséquence visible en microscopie électronique est une augmentation de la proportion d'euchromatine dans le noyau.

1.8.5 L'α-amanitine

Produite par le champignon vénéneux *Amanita phalloïde*, l'α-amanitine (AMA) est une toxine puissante utilisée en biologie pour inhiber la transcription. Son action touche l'ARN pol II (Gong *et al.* 2004). Elle se fixe sur des sous-unités de la polymérase et inhibe sa translocation.

Chapitre 2 :

Matériels et Méthodes

2 Matériels et Méthodes

2.1 Les films multicouches de polyélectrolytes utilisés

2.1.1 La nature chimique des polyélectrolytes

Un polyélectrolyte est un polymère constitué de plusieurs chaines de monomères comportant un grand nombre de sites ioniques. Une fois dissout dans un solvant polaire, comme l'eau, le polymère se dissocie et des charges sont exposées sur la molécule.

Six polyélectrolytes différents ont été utilisés au cours de ces travaux. Ils sont regroupés en trois catégories :

- **Les polyélectrolytes naturels** dégradables qui composent la première couche du substrat : la poly(L-lysine) (PLL) et l'acide hyaluronique (HA pour « *hyaluronic acid* ») ;

- **Les polyélectrolytes synthétiques** non dégradables qui constituent la deuxième couche du substrat : le poly(4-styrène sulfonate) de sodium (PSS) et le poly(hydrochlorure d'allylamine) (PAH pour « *poly(allylamine hydrochloride)* ») ;

- **Les polyélectrolytes fluorescents** utilisés pour visualiser l'architecture des films par microscopie confocale: la PLL marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine (PLL^{FITC}) et le PSS marqué à la rhodamine (PSS^{Rho}).

Les solutions de polyélectrolytes sont réalisées en présence d'une solution tampon à 20 mM de tris-(hydroxyméthyl) aminométhane (tris) et à 150 mM de chlorure de sodium (NaCl) préparée à base d'eau ultrapure (eau Milli-Q, de résistivité ρ= 18,2 MΩ.cm) et dont le pH est ajusté à 7,4 (solution tampon Tris/NaCl). Chacun des polyélectrolytes est utilisé à la concentration finale de 1 $mg.mL^{-1}$. Les caractéristiques de ces polyélectrolytes sont consignées dans le tableau ci-dessous (Tableau 2-A) :

Nature du polyélectrolyte	Notation et charge	Structure moléculaire	Masse molaire (g/mol)	pKa	Fournisseur
Poly(L-lysine)	PLL (+)		27 000	10,5	Sigma-Aldrich
Acide hyaluronique	HA (-)		412 000	2,9	Bioiberica Lifecore Biomedical
Poly(4-styrène sulfonate) de sodium	PSS (-)		70 000	/	Sigma-Aldrich
Poly (hydrochlorure d'allylamine)	PAH (+)		70 000	/	Sigma-Aldrich
PLL marquée à l' isothiocyanate de fluorescéine	PLL^{FITC} (+)	/	70 000	10,5	Sigma-Aldrich Taux de substitution: de 0,3 à 1 % FITC par lysine
PSS marqué à la rhodamine	PSS^{Rho} (-)	/	/	/	Réaction de polymérisation Purification par dialyse Caractérisation par spectroscopie UV/Vis Marquage réalisé au laboratoire

Tableau 2-A: Liste des polyélectrolytes utilisés pour la construction des PEMs.

Dans cette étude, les PEMs sont utilisés pour leurs propriétés viscoélastiques intéressantes pouvant mimer l'élasticité des différents types de tissus du corps humain. Ils se composent de deux couples de polyélectrolytes : une strate épaisse et molle constituée de 24 bicouches de PLL et de HA, $(PLL/HA)_{24}$, et une strate mince et rigide constituée de n bicouches de PSS et de PAH, $(PSS/PAH)_n$. La rigidité des films $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_n$, augmente avec le nombre n de paires de couches déposées. Elle passe ainsi de $E \approx 0$ kPa pour $n = 0$, à $E \approx 500$ kPa pour $n = 12$, couvrant ainsi la gamme d'élasticité des tissus vivants.

2.1.2 La méthode de construction des PEMs

2.1.2.1 Principe

Les polyélectrolytes offrent une très grande diversité de constructions qui dépend fortement de leurs propriétés chimiques et physiques. L'élaboration des films multicouches de polyélectrolytes se fait par la méthode d'assemblage couche par couche proposée par Decher (Decher *et al.* 1992; Decher 1997). Le principe de cette méthode de construction couche par couche (LbL de l'anglais « *layer by layer* ») est basé sur l'interaction électrostatique entre des polyélectrolytes anioniques et cationiques absorbés successivement sur un support. La méthode de construction utilisée lors de ces travaux de thèse est celle du procédé d'immersion en solution, appelée « *dip-coating* ». Elle consiste à tremper un support successivement dans des bains de solutions de polycations et de polyanions, chaque passage dans une solution est suivi d'un rinçage du support. La technique est décrite schématiquement dans la Figure 2-1.

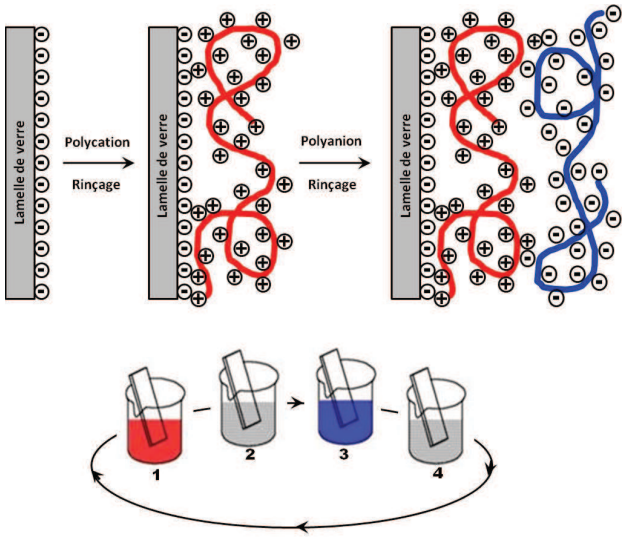


Figure 2-1: Schéma de la construction d'un film multicouche de polyélectrolytes par répétitions successives des étapes d'adsorption des polyélectrolytes et de rinçage. D'après (Decher 1997).

Le bécher 1 contient le polymère chargé positivement (polycation) alors que le bécher 3 contient un polymère chargé négativement (polyanion). Les béchers 2 et 4 contiennent une solution de rinçage. La première étape consiste à mettre en contact le support, initialement chargé négativement, dans le bécher 1 pendant un temps donné (entre 1 et 10 min). Les polycations s'adsorbent sur la surface par des liaisons

électrostatiques et les molécules non adsorbées sont éliminées lors de l'étape de rinçage. La surface sera donc chargée positivement après ce bain. Le support est ensuite déposé dans le bécher 3 contenant du polyélectrolyte anionique. L'excès de charge de la première couche est compensé avec ces molécules négatives. Un rinçage suivra afin d'éliminer les molécules anioniques non adsorbées à la surface. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention des *n* couches souhaitées. A la fin de la construction, le film construit est stocké dans une solution tampon à une température de 4°C. L'architecture du film dépend du nombre de couches choisies pour la construction, de la force ionique et du pH des solutions.

2.1.2.2 Constructions des films sur lamelles de verre

Pour mes travaux, les supports utilisés sont des lamelles de verre de 12 ou de 18 mm de Ø. Les lamelles de verre présentent de nombreux avantages :

- Elles sont naturellement chargées négativement à la surface ;
- Elles sont lisses ;
- Elles permettent l'observation des films au microscope ;
- Elles se logent facilement dans des plaques de 12 ou de 24 puits.

Ces lamelles sont préalablement nettoyées pour éliminer au maximum les résidus à la surface. Les lamelles sont plongées pendant 15 min dans une solution chauffée à 70°C de sodium dodecyl sulfate (SDS) à 10 mM, elles sont ensuite rincées à l'eau Milli-Q, puis elles sont de nouveau nettoyées pendant 15 min dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 100 mM chauffée à 70°C. Elles sont enfin rincées abondamment à l'eau Milli-Q, séchées puis autoclavées.

La construction des PEMs sur les supports de verre a été réalisée à l'aide d'un robot (*Dipping robot*, Riegler et Kirstein, Gmbh, Berlin, Allemagne) équipé d'un bras automatisé (Figure 2-2). Sur le bras est inséré un portoir pouvant contenir entre 4 et 6 lamelles de verre. Ce portoir va être déplacé séquentiellement dans les différentes solutions de polyélectrolytes à 1 $mg.mL^{-1}$ (solution de polycations et solution de polyanions) et de rinçage (solution tamponnée Tris/NaCl). Le temps d'immersion des

lamelles de verre dans les différentes solutions est de 5 min pour des couches de PLL/HA, et de 4 min pour la construction des couches PSS/PAH sur PLL/HA.

Figure 2-2: Photographie du robot « Dipping robot » utilisé au laboratoire pour la construction automatisée des PEMs sur lamelles de verre de 12 ou de 18 mm de diamètre.

Les films construits pour mes travaux de thèse sont répertoriés dans le tableau suivant (Tableau 2-B), associés à leur module de Young apparent (*E*ap), défini p.71, et leurs notations :

Architecture	*E*ap (kPa)	Notation
$(PLL/HA)_{24}$	~ 0	E_0
$(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_1$	~ 20	E_{20}
$(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_2$	~ 50	E_{50}
$(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_5$	~ 200	E_{200}
$(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_{12}$	~ 500	E_{500}

Tableau 2-B: Architecture des PEMs et leur module de Young Eap.

2.1.3 Les propriétés des films multicouches de polyélectrolytes

L'élasticité de ces substrats est déterminée par la technique de nano-indentation en microscopie AFM (cf. § le microscope à force atomique par nano-indentation, p.73). Bien que l'assemblage $(PLL/HA)_{24}$ soit mou avec *E*ap proche de 0 kPa, c'est en augmentant le nombre de paires de bicouches de PSS/PAH, *n*, déposées sur $(PLL/HA)_{24}$ que l'on augmente la rigidité système. Le film PLL/HA est connu pour être non-adhésif

pour les cellules (Mendelsohn *et al.* 2002). Au contraire, le film PSS/PAH présente des propriétés remarquables pour l'adhésion et la prolifération cellulaire (Boura *et al.* 2005).

- **Mode de croissance :** les couches PLL/HA et PSS/PAH ont un mode de croissance différent, l'une à une croissance dite linéaire, l'autre une croissance décrite comme exponentielle.

La première strate, $(PLL/HA)_{24}$, est un film à croissance exponentielle. Son épaisseur augmente de façon exponentielle en fonction du nombre de couches déposées. L'épaisseur de ces films peut atteindre plusieurs micromètres dès le dépôt d'une vingtaine de paires de couches. Certains travaux expliquent ce phénomène par une augmentation de la rugosité de la surface au fur-et-à-mesure de la construction du film, cela à pour conséquence d'augmenter la surface d'adsorption et donc la quantité de polyélectrolyte adsorbée. Les travaux de Philippe Lavalle expliquent cette donnée par le phénomène de diffusion d'au moins un des polyélectrolytes dans la section du film (Lavalle *et al.* 2004). En effet, dans le cas des films PLL/HA, les chaînes de polycations vont se complexer avec les chaînes de polyanions formant ainsi une nouvelle couche, mais elles vont également diffuser à l'intérieur du film formant ainsi un réservoir de polycations libres. Lors de l'étape de rinçage, seulement une partie des polycations libres migrent vers l'extérieur du film. La capacité du film à stocker une partie des chaines de PLL est due à l'excès de charges positives à la surface du film ce qui crée une barrière de potentiel empêchant la diffusion des polycations hors du film. Lorsque la solution de polyanions est ajoutée, ceux-ci se complexent avec l'excès de charges positives en surface et changent le signe de la barrière de potentiel, ce qui permet aux polycations libres de diffuser vers l'extérieur et former de nouvelles couches.

La seconde strate, $(PSS/PAH)_n$, est caractérisée par une croissance linéaire ; c'est-à-dire que son épaisseur augmente proportionnellement avec le nombre de couches déposées. Il a été mis en évidence que sur le film PSS/PAH, les polyélectrolytes ne pénètrent pas les couches adjacentes constituant ainsi une structure stratifiée. Ce film peut être utilisé comme une couche barrière à la diffusion de molécule.

- **Définition du *Eap*:** les propriétés viscoélastiques des films multicouches de polyélectrolytes ont été étudiées par Francius et ses collaborateurs par la technique de la sonde colloïdale au microscopie à force atomique (Francius *et al*. 2007). Au cours des mesures, on enregistre la déflexion du cantilever qui porte la sonde en fonction de la position de l'échantillon analysé déplacé par un quartz piézoélectrique. A partir de ces données expérimentales, on détermine la relation entre la force exercée sur le film et l'indentation qui en résulte. Afin d'extraire des caractéristiques de ces films, ils ont été modélisés par un ressort de module élastique *E1* en série avec une unité de Kelvin constituée d'un ressort (module élastique *E2*), en parallèle avec un piston qui représente l'élément de viscosité du système, c'est-à-dire l'élément dissipatif. La Figure 2-3 présente l'évolution du module d'élasticité apparent ($1/Eap = 1/E1+1/E2$) à une vitesse d'approche donnée (ici 1 $\mu m.s^{-1}$) imposée par le quartz piézoélectrique du microscope à force atomique. Elle montre l'effet du dépôt de PSS et de PAH sur la strate $(PLL/HA)_{24}$. Ce module élastique apparent (*Eap*) correspond au module élastique qu'aurait le film de polyélectrolytes dans le cas idéal où il serait strictement élastique. La valeur du *Eap* ne doit donc pas être considérée comme une valeur absolue mais comme une estimation semi-quantitative de la rigidité qui permet de comparer des films entre eux et d'établir des corrélations entre une caractéristique mécanique (*Eap*) et des observations de nature biologique.

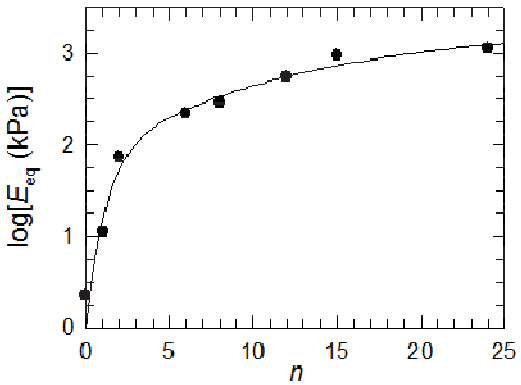


Figure 2-3 : Courbe de l'évolution du module d'élasticité apparent des films $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_n$ (Francius et al. 2007).

2.2 Les méthodes d'observation des échantillons

2.2.1 Le microscope à force atomique par nano-indentation

2.2.1.1 Principe

Le microscope à force atomique (AFM pour « *atomic force microscopy* ») permet d'étudier les propriétés mécaniques et physiques d'un matériau, et de visualiser la topographie de surface d'un échantillon. La résolution latérale est de l'ordre de la dizaine de nanomètres, et la résolution verticale est de l'ordre de l'ångström. La mesure du module de Young E d'une surface est obtenue par la mesure de la rigidité du matériau en utilisant la méthode de nano-indentation. Cette technique est réalisée sur un AFM configurée en mode force.

La technique de nano-indentation applique des cycles de compression localisés à la surface du matériau en utilisant une sonde colloïdale. Cette sonde, fixée à l'extrémité d'un cantilever (levier portant une pointe à son extrémité) de constante de raideur k_c, comprime le matériau en exerçant une force perpendiculaire à sa surface. La déviation du cantilever est mesurée à l'aide d'un faisceau laser réfléchi sur une photodiode à quadrants. C'est grâce au moteur piézoélectrique de l'AFM que les indentations sont possibles. En effet, le cantilever est en résonance et est donc en contact intermittent avec la surface à analyser (Figure 2-4). Ce dispositif génère un mouvement en forme de dent de scie, appelé mode « *tapping* », qui permet un faible endommagement de l'échantillon.

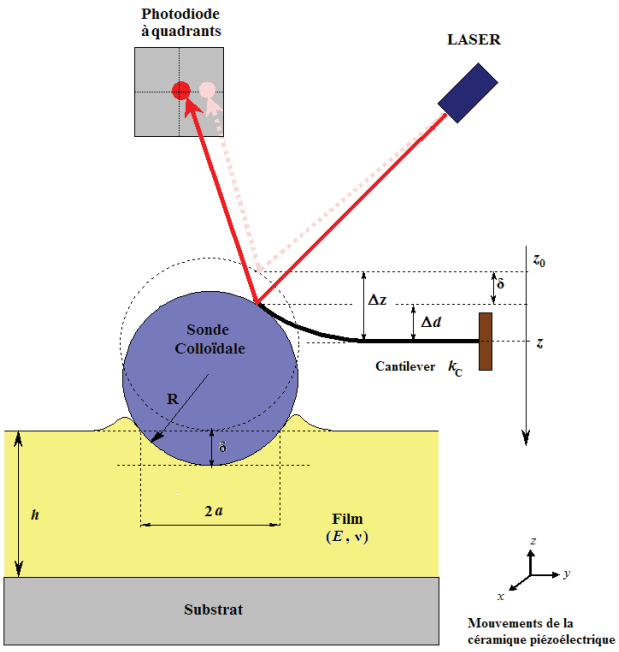


Figure 2-4: Principe de la technique de nano-indentation par AFM.

Les déplacements du moteur piézoélectrique et ceux du cantilever (la déflection d) sont enregistrés et la différence entre les deux permet de calculer l'indentation δ en fonction de la déviation provoquée (Δd). Le module de Young E est calculé en prenant en compte le rayon de la sonde colloïdale (R), la force appliquée par le cantilever (F, liée à la constante k_c) et l'indentation selon la relation :

$$E=(R*\delta)/F \qquad \text{avec} \qquad F=kc*\Delta d$$

2.2.1.2 Matériels

Le microscope utilisé pour cette approche est un AFM conçu au laboratoire (Inserm U977) de type IT-AFM. La sonde colloïdale est en borosilicate d'un diamètre de 5 µm. Le cantilever a une constante de raideur de 0,06, 0,38 ou 0,58 $N.m^{-1}$. Afin de mesurer l'élasticité de la surface, la vitesse d'approche de la sonde varie selon une gamme s'étendant de 10 à 10^4 $nm.s^{-1}$.

2.2.1.3 Utilisation

L'AFM en mode force a permis de déterminer le module de Young des films $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_n$ en utilisant la technique de nano-indentation (Francius *et al.* 2007).

2.2.2 Le microscope optique à épifluorescence

2.2.2.1 Principe

Le microscope optique à épifluorescence permet d'observer des objets de petite taille (résolution microscope : 0,2 µm), de séparer les détails de cette image indiscernable à l'œil nu (résolution de l'œil : 100 µm), et de capter l'émission des photons à l'aide d'une caméra. Par exemple, le microscope à épifluorescence permet de détecter la lumière émise par des échantillons auto-fluorescents, des échantillons marqués par des sondes fluorescentes, ou de suivre l'expression de protéines chimères auto-fluorescentes ou luminescentes. Un tel microscope permet de soustraire la lumière excitatrice émise par la source lumineuse pour ne visualiser que la fluorescence rendue de l'échantillon.

Depuis les années 1980, les sources lumineuses conventionnelles ont le plus souvent été des lampes à arc remplies d'un gaz à haute pression (au xénon ou au mercure : HBO) émettant un spectre caractéristique dans le visible. Mais ces lampes ne rendent pas la même intensité de fluorescence selon les longueurs d'ondes. Ces dernières années, une nouvelle source lumineuse remplace les ampoules à arc: ce sont des diodes dites LED (« *light-emitting diode* ») couplées à une fibre optique. Parmi ses principaux avantages, cette dernière génération d'éclairage est plus stable dans le temps, a une durée de vie plus longue, et surtout possède des bandes spectrales précises et de même intensités. Des cubes de fluorescences sont placés sur le trajet lumineux du microscope afin de sélectionner une bande spectrale permettant d'exciter les molécules fluorescentes de l'échantillon et ainsi laisser uniquement passer les longueurs d'ondes d'émission souhaitées de cet échantillon.

2.2.2.2 Matériels

Le microscope épifluorescent utilisé au laboratoire est un Nikon type Eclipse TE200 (Figure 2-5). La source lumineuse est une lampe à arc HBO. L'objectif utilisé pour les observations des cellules est un objectif x60 à huile d'ouverture numérique 1,40. Les images sont acquises avec une caméra digitale Nikon DS-Q11MC et le logiciel d'acquisition NIS-Elements Br.

Figure 2-5: Le microscope à épifluorescence du laboratoire utilisé lors de ce travail de thèse.

2.2.2.3 Utilisation

Ce microscope a permis l'observation des différents immunomarquages sur les cellules PtK2, SW480, SW640 et HCoEpiC.

2.2.3 Le microscope confocal à balayage laser

2.2.3.1 Principe

Ce type de microscope permet de réaliser des sections optiques sériées d'un échantillon, en vue de réaliser une reconstruction tridimensionnelle. La reconstruction 3-D de l'échantillon permet en plus de localiser *in situ* des structures. L'introduction du pinhole (diaphragme réglable), qui est l'un des éléments clés du microscope confocal, permet l'élimination du signal lumineux provenant des autres plans en les excluant physiquement. Ce système permet d'améliorer considérablement le rapport signal/bruit, et de détecter uniquement les signaux émis depuis le plan d'intérêt, ce qui a pour conséquence d'augmenter la résolution de l'image.

La source d'excitation est le plus souvent un laser. Le faisceau lumineux produit traverse le pinhole d'excitation qui réduit la source à un point, et est ensuite dirigé sur deux miroirs galvanométriques qui permettent de balayer l'échantillon point par point et ligne par ligne en X et en Y. Le déplacement selon l'axe Z peut être réalisé grâce à une sur-platine motorisée ou un dispositif piézo-électrique associé à un objectif. La détection quasi-exclusive des signaux fluorescents de l'échantillon au plan focal est permise grâce au pinhole d'émission. Les détecteurs sont des photomultiplicateurs qui captent les photons reçus et génèrent des signaux électriques amplifiés. Pour reconstruire une image, il faut connaître la position spatiale du faisceau lumineux et l'intensité du signal de cette même position. L'image reconstituée sur l'ordinateur est bien plus nette que l'enregistrement du signal d'un échantillon fluorescent observé au microscope à épifluorescence. Le logiciel d'acquisition permet de régler tous les paramètres d'acquisition et de visualiser directement les images.

2.2.3.2 Matériels

Le microscope confocal utilisé est de type LSM 510 de la compagnie Zeiss, monté sur un microscope inverse AxioVert 100M. Les observations sont effectuées avec un objectif x40 à huile. Les lasers associés sont un laser argon (longueurs d'onde : 459 nm, 488 nm et 514 nm), un laser hélium néon I (543 nm) et un laser hélium néon II (633 nm). Le logiciel de contrôle du microscope et d'acquisition des images est un logiciel Zeiss LSM Image Browser.

2.2.3.3 Utilisation

L'architecture des films PEMs $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_n$ a pu être visualisée par ce système en associant des sondes fluorescentes déposées sur la couche terminale: la FITC pour identifier les couches PLL/HA et de la Rho pour les couches PSS/PAH. Ces travaux ont permis d'évaluer l'épaisseur de l'assemblage des multicouches et de vérifier la non-diffusion de la couche PSS/PAH dans la couche PLL/HA (Figure 2-6).

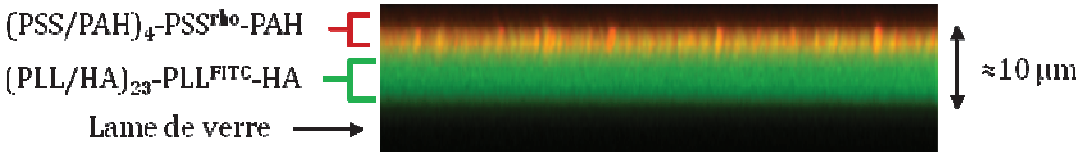


Figure 2-6: Coupe verticale d'un film $(PLL/HA)_{23}$-PLL^{FITC}-HA recouvert par un film $(PSS/PAH)_4$-PSS^{Rho}-PAH construit sur une lamelle de verre. L'ensemble de la construction montre une épaisseur de l'ordre de 5 µm.

2.2.4 La vidéomicroscopie

2.2.4.1 Principe

La vidéomicroscopie, également appelée microscopie du vivant, permet d'étudier la dynamique d'un échantillon au cours du temps dans des conditions *in situ*. Des évènements biologiques peuvent être filmés sur des durées allant de quelques secondes à plusieurs jours. L'observation est le plus souvent effectuée sur des microscopes inversés car le volume libre au niveau de la platine est plus important. Ils permettent d'implémenter des chambres d'acquisition et des contrôleurs environnementaux indispensables au maintien en vie des échantillons. De nombreux équipements sont nécessaires pour reproduire les conditions physiologiques. Le plus souvent, le système comporte un incubateur qui entoure le microscope. Dans cet incubateur la température, le niveau de CO_2, l'humidité et le pH y sont contrôlés et régulés. Un logiciel d'acquisition permet de contrôler le microscope motorisé (cubes filtres, allumage/extinction de la source fluorescente et/ou de la lampe halogène, etc…) et l'enregistrement des images par une caméra aux temps voulus.

En vidéomicroscopie, des séquences multi-dimensionelles peuvent être réalisées lorsque plusieurs dimensions sont couplées sur une même expérience : le plan de l'image X/ Y, la réalisation de coupes dans l'échantillon (la profondeur d'acquisition Z), l'utilisation de plusieurs longueurs d'onde (λ) et/ou couplé à de la lumière transmise, la position du champ (P), le tout associé à différents temps d'acquisition (T) fait qu'il est rapidement possible atteindre de l'imagerie 6-D (Figure 2-7). La résolution des images dépend du système optique et du système de captation du signal (caméra ou PMT).

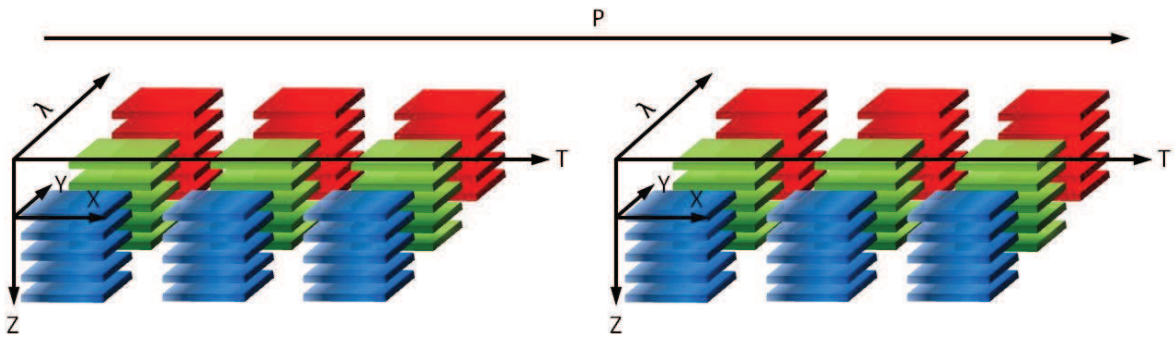


Figure 2-7: Schéma d'une séquence multidimensionnelle 6-D.

2.2.4.2 Matériels

Le microscope est un Leica DMIR2 équipé d'un objectif x40 à huile Plan apo, monté d'un anneau de phase 2 et d'ouverture numérique 0,75. La source lumineuse est une lampe à arc HBO. Un incubateur en plexiglas entoure le microscope dans lequel est maintenu une température à 37°C. Les échantillons sont montés sur un insert « *Ludin Chamber* » de type 1 (de chez Life Imaging Services), dans lequel la teneur en CO_2 et l'humidité sont contrôlées (Figure 2-8). La caméra est une Leica DC350FX CCD. Le système de contrôle du microscope et d'acquisition des images est dirigé par le logiciel Leica FW4000. Le logiciel permet de programmer l'allumage des sources lumineuses (lampe halogène pour obtenir une image à contraste de phase et la source de fluorescence), le temps d'exposition des sources lumineuses, les canaux de fluorescences, les différentes positions de champs, l'indication du nombre de coupes dans l'échantillon, et le temps de l'expérience en indiquant le nombre de prise de vue demandées par champ étudié.

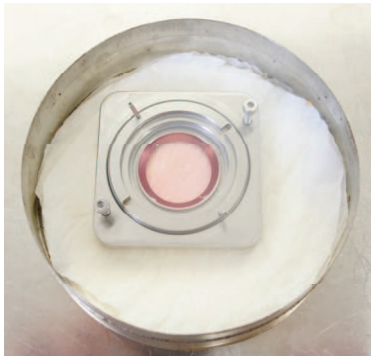


Figure 2-8 : Insert « Ludin Chamber » utilisé pour les expériences de vidéomicroscopie.

2.2.4.3 Utilisation

Ce système d'observation a permis d'étudier le devenir des cellules SW480 en mitose en fonction de l'élasticité du substrat.

2.2.5 Le microscope électronique à transmission

2.2.5.1 Principe

Basée sur le principe de diffusion des électrons, le microscope électronique à transmission (MET) permet l'observation de structures fines des coupes de tissus biologiques. Le grossissement peut atteindre x5 000 000 et la résolution peut aller jusqu'à 0,08 nm.

Le MET utilise des électrons comme rayonnement. Les électrons sont générés par un canon à électron comprenant une source et un champ électrique. Le vide poussé dans le microscope permet d'éviter toute collision entre les électrons. Grâce à un système de lentilles magnétiques, les électrons sont accélérés et focalisés sur l'échantillon dont la coupe peut être comprise entre 50 et 100 nm, et les électrons interagissent avec celui-ci (Figure 2-9). Suivant l'épaisseur, la densité ou la nature chimique de l'échantillon, l'image sera plus ou moins contrastée dans le plan image. L'image obtenue est visualisable à l'œil nu sur un écran de phosphore, ou par l'intermédiaire d'une caméra.

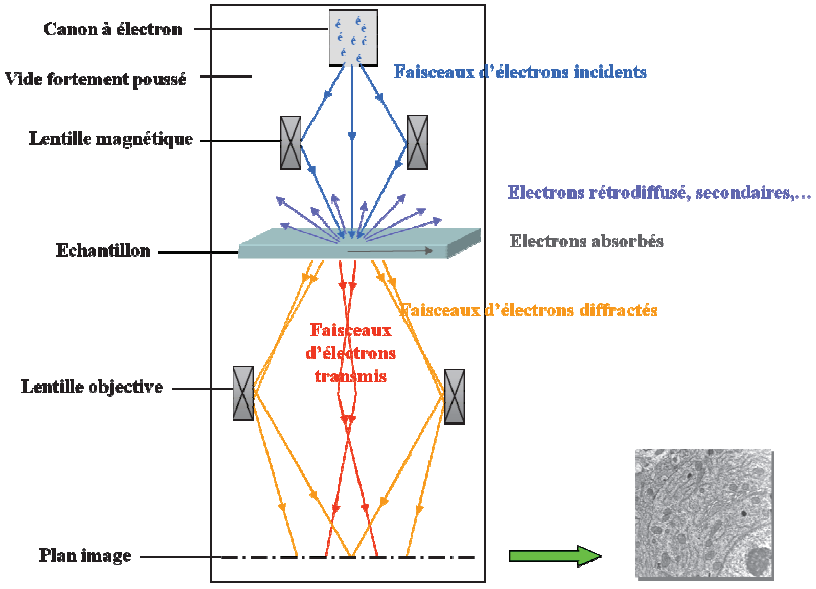


Figure 2-9: Principe du MET: parcours des électrons à l'intérieur du microscope.

2.2.5.2 Matériels

Le microscope électronique utilisé est un Philips modèle EM208 équipé d'une cathode de tungstène. La tension d'accélération est de 70 kV. Les images sont acquises à l'aide de film argentique Kodak SO-163 avec un temps d'exposition de 1 s, et sont révélées à l'aide de révélateur Kodak D19, fixées au Superfix Plus de Tetenal puis numérisées à l'aide d'un scanner à 600 dpi.

2.2.5.3 Utilisation

Cette technique a été employée pour étudier le rôle exercé par l'élasticité du substrat sur la plasticité de la chromatine chez les cellules PtK2 à l'échelle ultra-structurale.

2.3 Etude de la réponse cellulaire sur les films polyélectrolytes

2.3.1 Les modèles cellulaires étudiés

2.3.1.1 Les cellules PtK2

Les cellules épithéliales de rein de kangourou, PtK2 (« *Potorous Tridactylis Kidney* »), sont utilisées comme modèle de cellules adhérentes immortalisées. Elles proviennent de l'*American Type Culture Collection*, ATCC (référence : CCL56). Leur prolifération se réalise dans le milieu de culture « *Eagles Minimum Essential Medium* » (EMEM, de chez ATCC) auquel est ajouté 10% de sérum de veau fœtal (FBS pour « *Fœtal Bovine Serum* », de chez Gibco) et 5% d'antibiotiques pénicilline/streptomycine à 100 $\mu g.mL^{-1}$ (Thermo Scientific). Le laboratoire a choisi ce type car elles sont faciles à cultiver, ont une grande taille d'environ 60 µm et également un noyau volumineux (≈ 18 µm, contre 7 µm en moyenne pour des cellules épithéliales) (Figure 2-10). Bien que l'Homme et le kangourou possèdent à peu près le même nombre de gènes, chez les marsupiaux ils sont répartis dans un nombre plus petit de chromosomes nettement plus volumineux ce qui facilite les observations des mitoses au microscope (46 chromosomes pour l'homme contre 22 chromosomes chez le kangourou).

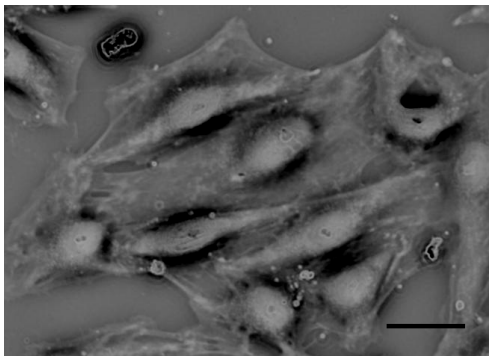


Figure 2-10: Les cellules PtK2 observées au microscope optique. Barre d'échelle: 30 µm.

2.3.1.2 Les cellules SW480

Les cellules épithéliales humaines SW480 sont issues d'une lignée d'adénocarcinome colorectal qui a été isolée d'une tumeur colique primaire prélevée chez un patient de type caucasien. Ces cellules acquièrent les caractéristiques des entérocytes durant la phase de différenciation. Ce sont des cellules polarisées de forme cylindriques sur lesquelles des microvillosités sur la surface apicale apparaissent. Elles se multiplient dans le milieu de culture « *Roswell Park Memorial Institute* » (RPMI-1640, de chez Gibco) complémenté en glutaMAX, et enrichi avec 10% de FBS, 5% de pénicilline/streptomycine à 100 µg.mL^{-1}, 2% d'Hydrocortisone à 50 mg.mL^{-1} (Sigma), 2,5% d'antibiotique G 418 à 1,25 mg.mL^{-1} (PromoCell) et 10% d'insuline à 0,025 U.mL^{-1}.

2.3.1.3 Les cellules SW620

Cette lignée cellulaire SW620 est également issue d'un adénocarcinome colique humain et est utilisée comme modèle de cellules métastatiques. Tout comme les cellules SW480, ces cellules sont issues du même patient et ont été prélevées à partir d'un ganglion lymphatique présentant des métastases. Pour autant leurs phénotypes sont différentes (Leibovitz *et al.* 1976). Le cycle de division des cellules SW620 est plus rapide que celui des SW480, montrant un caractère plus invasif (Venter *et al.*). Elles n'expriment pas de microvillosités à leur surface et se présentent comme des cellules sphériques. Leur culture se réalise dans du milieu « *Dulbecco's Modified Eagle Medium* » (DMEM) complémenté glucose à 4,5 g.L^{-1} et en pyruvate (Gibco) auquel est rajouté du FBS à 10% et une solution de pénicilline/streptomycine à 1%.

2.3.1.4 Les cellules HCoEpiC

Les cellules « *Human Colonic Epithelial Cells* », HCoEpiC, sont utilisées comme modèle de cellules primaires de coliques humaines saines. Elles proviennent de ScienCell Research Laboratories (référence : 2950) et sont cultivées dans un milieu de culture CoEpiCM (« *Colonic Epithelial Cell Medium* »). Dans ce milieu est rajouté un supplément de 5% de CoEpiCGS contenant divers facteurs de croissance, des hormones et des protéines nécessaires à leur prolifération. Les antibiotiques pénicilline/streptomycine sont également ajoutés à hauteur de 5% dans le milieu CoEpiCM. Le milieu de culture et les suppléments proviennent de la société *ScienCell Research Laboratories*.

2.3.2 La culture cellulaire

Les cellules décrites ci-dessus sont entretenues dans des boîtes de culture à fond plat T75 cm^2 provenant de la société Corning et placées dans une étuve thermostatée à 37°C sous une atmosphère humide à 5% de CO_2.

A chaque passage, les cellules sont lavées avec une solution de phosphate salin 1X stérile (PBS pour « *phosphate bufferd saline* »), puis une solution de trypsine (TrypLE Express, Gibco) est déposée pour détacher les cellules de la boîte. La boîte alors est placée dans l'incubateur environ cinq min, le temps nécessaire pour que l'enzyme hydrolyse les protéines membranaires des cellules au niveau des résidus lysine et arginine. Du milieu de culture est ajouté dans la boîte afin de stopper l'activité de l'enzyme par excès de substrat dû à l'apport des protéines du FBS présentes dans le milieu de culture. Les cellules sont ensuite dissociées et homogénéisées, puis une fraction de cette solution est remise dans une nouvelle boîte de culture contenant du milieu de culture frais.

Selon les expériences, les cellules sont soit ensemencées en interphase à une densité de $1{,}10^5$ cellules.cm^{-2}, soit synchronisées mécaniquement afin de récupérer un maximum de cellules en mitose pour être ensemencées à une concentration de $1{,}2.10^4$ cellules.cm^{-2} sur les différents substrats. Les lamelles de verre de 12 mm de Ø sont déposées dans des plaques 24 puits et les lamelles de 18 mm de Ø sont déposées sur l'insert adapté pour la vidéomicroscopie.

2.3.3 La synchronisation mécanique

Afin d'étudier l'influence de l'élasticité du substrat sur la division cellulaire, une synchronisation mécanique est nécessaire pour récupérer un maximum de cellules en mitose. Les cellules sont ensemencées trois jours avant l'expérience dans des boîtes de culture. Pour les expériences demandant une grande quantité de cellules, comme pour la réalisation de Western-blot, plusieurs boîtes T175 cm^2 sont nécessaires par condition. Après trois jours de culture, les cellules sont doucement rincées au PBS 1X stérile, puis remises en présence de milieu de culture. Ensuite chacune des boîtes subit individuellement une série de frappes sèches afin de détacher les cellules en mitose. Le milieu de culture est récupéré et transféré dans un tube de centrifugation. Le tube est centrifugé à 900 rpm pendant 7 min, puis le surnageant y est retiré. Le culot cellulaire est suspendu dans un volume donné. Ce milieu est ensuite distribué à hauteur de 0,5 mL par puits dans les plaques de 24 puits contenant des lamelles de 12 mm de Ø, et à hauteur de 1 mL pour l'ensemencement des lamelles de 18 mm de Ø déposées sur l'insert « *Ludin Chamber* » pour la vidéomicroscopie. La densité cellulaire est de $1{,}2.10^4$ cellules.cm^{-2}. Le temps T 0h des expériences correspond à une attente de 15 min après le dépôt des cellules mitotiques sur les supports, pour que les cellules aient le temps de sédimenter et d'adhérer au substrat.

2.3.4 L'immunomarquage fluorescent

2.3.4.1 Principe

La visualisation d'une protéine d'intérêt dans une cellule au microscope peut être réalisée par un immunomarquage fluorescent à l'aide d'anticorps. Un anticorps spécifique est dirigé vers la protéine d'intérêt (l'anticorps primaire : Ac I) suivi d'un deuxième anticorps dirigé vers le premier anticorps (l'anticorps secondaire : Ac II) couplé à un fluorochrome. Les anticorps sont des glycoprotéines appartenant à la famille des immunoglobulines impliquées dans le système immunitaire. Un anticorps est formé de quatre chaînes polypeptidiques dont deux sont dites lourdes (chaînes H) et deux dites légères (chaînes L), formant une structure en Y. Ces chaines sont reliées entre elles par des ponts disulfures qui assurent une flexibilité à l'anticorps (Figure 2-11). Lors de la détection de molécules étrangères, les anticorps sont sécrétés par des cellules

différenciées de lymphocytes B, les plasmocytes, qui ont comme fonction de reconnaître spécifiquement la molécule étrangère, appelée antigène (Ag) en s'y fixant afin de la neutraliser. Les anticorps peuvent y parvenir grâce à la grande spécificité de leur paratope, qui ne reconnaît qu'une partie très précise de l'Ag, l'épitope.

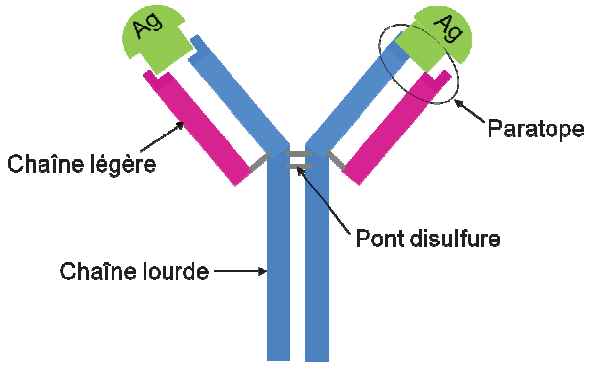


Figure 2-11: Schéma d'un anticorps.

2.3.4.2 Protocole opératoire

Après un temps de culture déterminé sur les différents substrats, les cellules sont lavées 5 min au PBS 1X. Ces temps sont fixés à T 0h, T 30 min, T 1h, T 2h, T 3h, T 4h, T 5h ou T 24h. Puis les cellules sont fixées et perméabilisées en même temps dans une solution de paraformaldéhyde à 3,7% contenant du triton X-100 à 0,1% pendant 15 min à température ambiante. Deux rinçages au PBS 1X de 5 min sont nécessaires pour éliminer au maximum le PFA et le triton. Les lamelles sont ensuite mises en présence d'une solution de saturation riche en protéines (FBS à 10%) pendant une nuit à 4°C afin de masquer d'une manière non spécifique l'ensemble des protéines cellulaires sans empêcher une reconnaissance spécifique d'un anticorps dirigé contre sa protéine. Le lendemain, les lamelles sont rincées au PBS 1X avant l'incubation des anticorps. Les anticorps sont dilués dans une solution de PBS 1X. Les lamelles sont incubées en présence de l'Ac I pendant 1h30 à température ambiante. La liste des Ac I utilisés est indiquée dans le Tableau 2-C. Après deux rinçages au PBS 1X, l'Ac II est ajouté à son tour sur les cellules pendant 30 min à température ambiante. Le deuxième anticorps étant fluorescent, il est nécessaire de protéger les cellules de la lumière ; la plaque de 24 puits est alors recouvert de papier aluminium, et ce jusqu'à la fin de l'expérience. Les lamelles sont lavées au PBS 1X avant d'être montées sur une lame de microscope en déposant une goutte de milieu de montage (solution Vectashied, de chez Vector Laboratories™). La

lamelle est scellée à la lame de microscope par 4 points de vernis. Les échantillons sont ensuite observés au microscope fluorescent, ou stockés à 4°C.

Anticorps primaire	Concentration initiale	Condition d'utilisation	Fournisseur
hnRNP A1, mouse	2,5 mg.mL^{-1}	Dilution: 1/100 1h30 à t°C ambiante	Abcam
hnRNP L, mouse	1 mg.mL^{-1}	Dilution: 1/50 1h30 à t°C ambiante	Abcam
HP1 β, rabbit	1 mg.mL^{-1}	Dilution: 1/50 1h30 à t°C ambiante	Abcam
Integrine β1, goat	200 µg.mL^{-1}	Dilution: 1/20 1h30 à t°C ambiante	Santa Cruz
α-tubuline, mouse	2 mg.mL^{-1}	Dilution: 1/100 1h30 à t°C ambiante	Sigma

Tableau 2-C: Liste des anticorps primaires utilisés pour les immunomarquages.

Des marquages fluorescents, autres que des immunomarquages sont aussi couramment utilisés au laboratoire pour marquer par exemple le noyau des cellules. Le marquage de l'ADN est réalisé par un marquage de la chromatine à l'aide d'une solution colorée Hoechst 33 358 (2 µg.mL^{-1}) qui rentre dans la cellule vivante ou fixée, par libre diffusion. Une façon de marquer les fibres d'actine est d'incuber les cellules en présence de solution phalloïdine couplée à de la Rho, car cette molécule possède une très forte affinité pour les FAs.

La liste des Ac II, ainsi que les marqueurs fluorescents utilisés sont indiqués dans le tableau suivant (Tableau 2-D):

Anticorps secondaire	Concentration initiale	Condition d'utilisation	Fournisseur
goat anti-mouse Alexa Fluor 488	2 mg.mL^{-1}	Dilution: 1/500 30 min à t°C ambiante	Invitrogen
goat anti-rabbit TRITC	200 µg.mL^{-1}	Dilution: 1/500 30 min à t°C ambiante	Santa Cruz
rabbit anti-goat Rho	400 µg.mL^{-1}	Dilution: 1/250 30 min à t°C ambiante	Santa Cruz
Hoechst 33258	1 mg.mL^{-1}	Dilution: 1/50 5 min à t°C ambiante	Sigma
Phalloïdine Rho	100 µg.mL^{-1}	Dilution: 1/50 20 min à t°C ambiante	Sigma

Tableau 2-D: Liste des anticorps secondaires et autre marqueurs fluorescents utilisés pour les immunomarquages.

Il est possible de réaliser des co-marquages sur un même échantillon. Pour cela, les longueurs d'ondes des marqueurs fluorescents ne doivent pas se chevaucher (Tableau 2-E).

Marqueur fluorescent	λ excitation	λ émission	Couleur
Hoechst 33258	352 nm	461 nm	bleu
Alexa Fluor 488	495 nm	519 nm	vert
Rhodamine	570 nm	576 nm	rouge
TRITC	547 nm	572 nm	rouge

Tableau 2-E: Liste des fluorochromes utilisés avec leurs caractéristiques spectrales.

2.3.5 Analyse de l'expression des protéines Rac 1 et integrine-β1 par Western-blot

2.3.5.1 Principe

Le Western-blot est une technique biochimique permettant l'identification et la quantification de protéines à partir d'un échantillon biologique, extrait généralement à partir de cellules ou de tissus. Ici le but est de quantifier des protéines chez les cellules PtK2 et SW480 lorsque celles-ci sont cultivées sur différents substrats d'élasticités variables.

Les protéines étudiées sont la protéine de signalisation Rac 1 et la protéine transmembranaire intégrine-β1. Rac 1 joue un rôle dans le cycle mitotique en fin de télophase, et intégrine-β1 est elle impliquée dans l'adhésion cellulaire.

2.3.5.2 Protocole opératoire

Le Western-blot est composé de cinq étapes : la récupération des extraits protéiques des cellules, l'électrophorèse, le transfert sur une membrane, l'immunomarquage, et une autoradiographie. Cette technique nécessite une très grande quantité de matériel protéique pour chaque condition étudiée. Chaque condition est reproduite sur cinq lamelles de 12 mm de Ø afin d'obtenir un maximum d'extrait protéique pour une même expérience. Les lamelles sont placées dans une plaque de 24

puits dans lesquelles sont cultivées les cellules pendant un temps déterminé dans leur milieu de culture complet. Pour les expériences de Western-blot, le temps de mise en contact des cellules avec le substrat est de 30 min (T 30 min). Les cellules déposées sont issues d'une synchronisation mécanique. Après T 30 min, les cellules sont lysées en présence d'un tampon de lyse contenant 1% de cocktail d'inhibiteur protéasique (Kit G-LISA Small G-Potein Anticorpstivation Assays, de chez Cytoskeleton). Les protéines sont extraites des débris cellulaires par centrifugation des échantillons 3 min à 13 Krpm et à 4°C. Le surnageant récupéré est quantifié au spectrophotomètre par la méthode de Bradford pour connaître la concentration en protéine totale de chaque condition.

Pour l'électrophorèse, les extraits protéiques sont déposés à une concentration de 20 µg de protéines totales par échantillon, dans les puits d'un gel de polyacrylamide en présence d'une solution d'agent réducteur (Kit Novex NuPAGE Bis-Tris Gels System, Invitrogen). La réticulation du gel de migration est choisie en fonction du poids moléculaire de la protéine ciblée : gel 12% Bis-Tris pour quantifier l'intégrine β1 et un gel 10% pour Rac 1. Après migration des échantillons dans le gel, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Iblot Transfer Stack, Invitrogen). Pour cela, un «sandwich» est réalisé (Figure 2-12) dans lequel le gel d'électrophorèse et la membrane sont mis en contact. Le transfert se fait grâce à un courant électrique dans une cuve d'électrophorèse en présence de tampon de transfert.

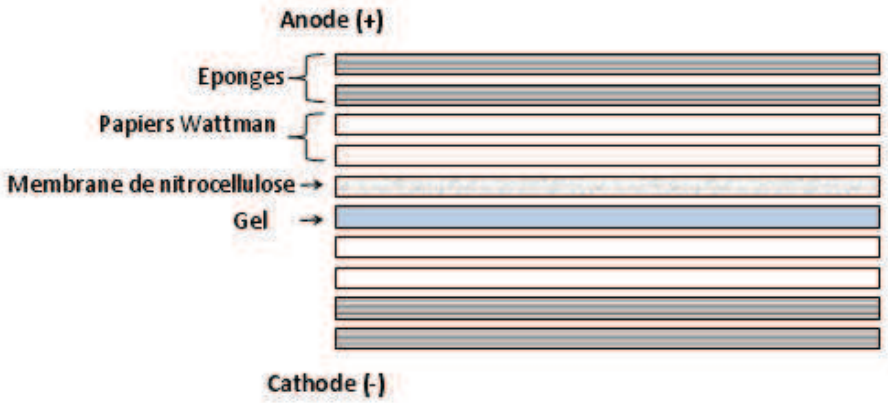


Figure 2-12: Schéma du «sandwich» de transfert d'un Western-blot Les protéines sortent du gel d'électrophorèse pour se déposer sur la membrane de nitrocellulose grâce à un courant électrique.

Après le transfert, la membrane est plongée dans une solution de blocage T-TBS (« *tween-tris buffered salt solution* ») à 0,1% de tween 20 avec un pH de 7,6 contenant

1% de sérum d'albumine bovine (BSA pour « *bovine serum albumine* », de chez Euromedex) pendant une nuit à 4°C. La membrane est ensuite incubée en présence de l'Ac I dans une solution de T-TBS contenant 0,1% de BSA à température ambiante. Après trois rinçages de la membrane au T-TBS pendant 10 min sous une agitation douce, celle-ci est incubée avec l'Ac II couplé à une peroxydase HRP (« *horseradish peroxidase* ») également préparé dans une solution T-TBS à 0,1% de BSA. La membrane est rincée plusieurs fois, puis les bandes protéiques sont détectées par chimioluminescence (révélation *ECL pour « enhanced chemiluminescent »*) grâce à l'activité de l'enzyme HRP. Une solution de réaction contenant le substrat de luminescence, le luminol, est utilisée à partir du kit (kit ECL Plus Western Blotting -RPN 2132, GE Healthcare). La luminescence est détectée par autoradiographie en mettant en contact la membrane sur un film photographique. Le film est plongé dans deux solutions permettant de révéler et de fixer les bandes de nitrates d'argent qui correspondent au marquage de la protéine d'intérêt. Les bandes protéiques peuvent être numérisées, puis analysées à l'aide du logiciel ImageJ.

Les MAP kinases sont analysées parallèlement : ces protéines permettent d'évaluer l'état métabolique des cellules.

Les anticorps utilisés pour les expériences de Western-blot sont répertoriés dans les tableaux suivant (Tableau 2-F ; Tableau 2-G):

Anticorps primaire	Poids moléculaire	Condition d'utilisation	Fournisseur
Rac 1, mouse	21 kDa	Dilution: 1/1000 2h à t°C ambiante	Millipore
Intégrine β1, LIBS, mouse	88 kDa	Dilution: 1/1000 2h à t°C ambiante	Millipore
p44/42 MAPK, rabbit	44 et 42 kDa	Dilution: 1/1000 2h à t°C ambiante	Cell Signaling

Tableau 2-F: Liste des anticorps primaires utilisés pour les expériences de Western-blot.

Anticorps secondaire	Condition d'utilisation	Fournisseur
sheep anti-mouse HRP	Dilution: 1/2000 2h à t°C ambiante	GE Healthcare
donkey anti-rabbit HRP	Dilution: 1/2000 2h à t°C ambiante	GE Healthcare

Tableau 2-G: Liste des anticorps secondaires utilisés pour les expériences de Western-blot.

2.3.6 Expérience de réplication

2.3.6.1 Principe

Lors de la réplication chez les eucaryotes, les cellules dupliquent leur ADN pendant la phase S. Les deux brins d'ADN se séparent et chacun sert de modèle pour la synthèse de nouveau brin complémentaire. La synthèse est réalisée principalement grâce à deux enzymes : l'ADN pol et l'ARN pol. L'ARN pol est chargé d'amorcer la synthèse avec des fragments d'ARN, et l'ADN pol continue l'élongation de la synthèse. Les polymérases ajoutent des nucléotides pour la création du nouveau brin. Ainsi l'ADN poly ajoute des nucléotides de bases azotées adénine (A), thymine, cytosine (C) et guanine (G), et l'ARN polymérase additionne les nucléotides de base azotées A, uracile, C et G. Ces nucléotides sont complémentaires et se fixent par des liaisons hydrogènes pour former la structure en double hélice de l'ADN décrit par Watson et Crick en 1953 (Watson et Crick 1953).

La réplication *in situ* permet de marquer spécifiquement les cellules en cours de réplication par l'ajout d'uracile dans le milieu de culture.

2.3.6.2 Protocole opératoire

Les cellules récoltées sont issues d'une synchronisation mécanique. Elles sont ensemencées sur les différents substrats à une densité de $1{,}2.10^4$ cellules.cm^{-2}, et laissées en culture le temps souhaité. Dans le milieu de culture est ajouté du bromodéoxyuridine (BrdU) dilué au 1/500ème (RPN 201, GE Healthcare). Le BrdU est recruté par l'ARN pol pour être incorporé dans la synthèse de l'ADN. Les cellules sont ensuite fixées et perméabilisées avec une solution de PFA 3,7% + triton X-100 à 0,05% pendant 15 min à température ambiante, puis incubées en présence d'une solution de

FBS à 10% pendant une nuit à 4°C, afin de bloquer les sites aspécifiques. Après rinçage au PBS 1X, les cellules sont incubées en présence de l'Ac I anti-BdrU dilué dans une solution de DNase (kit RPN 202, GE Healthcare) pendant 1h à 37°C. Les cellules sont ensuite rincées avant l'incubation de l'Ac II, cette fois-ci à température ambiante (Tableau 2-H). Les lamelles sont montées sur une lame de microscope pour les observations microscopiques.

Anticorps	Concentration initiale	Condition d'utilisation	Fournisseur
anti-BrdU, sheep	0.85 mg.mL^{-1}	Dilution: 1/50 1h à 37°C	GE Healthcare
donkey anti-sheep TRITC	1 mg.mL^{-1}	Dilution: 1/500 30 min à t°C ambiante	US Biological

Tableau 2-H: Liste des anticorps utilisés pour les expériences de réplication.

2.3.7 Marquage des cellules pour la vidéomicroscopie

Trois jours avant l'expérience, les cellules SW480 sont ensemencées dans une boîte de culture T75 cm^2. Le jour de l'expérience, les cellules sont lavées avec une solution de PBS 1X stérile. Puis du milieu de culture contenant du Hoechst 33242 à une concentration finale de 100 ng.mL^{-1} est ajouté pour marquer l'ADN. La boîte est replacée dans l'incubateur pendant 20 min. Une synchronisation mécanique est réalisée, puis le milieu de culture contenant les cellules mitotiques est collecté dans un tube. Ce tube est centrifugé 7 min à 900 rpm. Après avoir enlevé le surnageant, les cellules sont resuspendues dans du milieu de culture sans Hoechst, puis déposées sur les substrats. De l'huile végétale est ajoutée sur le milieu de culture afin qu'il ne sèche pas dans l'incubateur. La lamelle est insérée dans l'insert « *Ludin Chamber* ».

2.3.8 Pré-conditionnement des cellules PtK2 avec la trichostatine A

Les cellules PtK2 sont repiquées 4 jours avant le début de l'expérience dans une boîte de culture cellulaire. Vingt-quatre heures avant l'expérience, le milieu de culture est remplacé par du milieu frais contenant de la TSA (Sigma) à une concentration finale de 50 nM. Le jour de l'expérience, les cellules sont récupérées par trypsinisation, comptées et ensemencées à 1,10^5 cellules.cm^{-2} en présence de TSA à 50 nM sur les

différents substrats. Les cellules sont cultivées un temps donné avant la réalisation d'un immunomarquage ou avant d'être fixées pour des observations au MET.

2.3.9 Pré-conditionnement des cellules PtK2 avec les drogues TSA et α-amanitine

Les cellules PtK2 sont repiquées 4 jours avant le début de l'expérience dans une boîte de culture cellulaire. Vingt-quatre heures avant l'expérience, le milieu de culture est remplacé dans la boîte par du milieu frais contenant de la TSA à 50 nM et de l'AMA à une concentration finale de 1 $mg.mL^{-1}$ (Sigma). Le jour de l'expérience, les cellules sont récupérées par trypsinisation et ensemencées à $1,10^5$ $cellules.cm^{-2}$ en présence de TSA à 50 nM finale et d'AMA à 1 $mg.mL^{-1}$ sur les substrats E_0 et verre. Après T 4h, les lamelles sont récupérées : elles sont exploitées pour des observations au MET, ou subissent un immunomarquage pour localiser la protéine A1.

2.3.10 Fixation des cellules PtK2 pour une observation au microscope électronique à transmission

Les cellules sont cultivées 4 h sur les différents substrats. Les cellules sont ensuite rincées dans un tampon 125 mM de cacodylate de pH 7,4, puis fixées deux heures à température ambiante dans une solution de PFA 2%-glutaraldehyde 2% réalisée dans un tampon cacodylate à 50 nM de pH 7,4. Après la fixation, les lamelles sont rincées deux fois dans du tampon cacodylate 125 mM pendant 10 min et peuvent être conservées dans la solution tampon à 4°C. Les cellules sont fixées une deuxième fois par une solution de tétroxude d'osmium à 1% final dans du tampon cacodylate à 125 mM pendant 30 min à température ambiante. Après deux lavages de 10 min dans une solution tampon de cacodylate 125 mM, les échantillons sont déshydratés par des bains successifs d'alcool croissants : éthanol 50%, éthanol 70% et éthanol 95 %, chacun pendant 15 min. La dernière étape de déshydratation est un bain d'éthanol à 100% renouvelé trois fois pendant 20 min. Ensuite a lieu l'étape d'inclusion des cellules dans la résine époxy (composition : Epon 812 à 48,2%, Methyl Nadic Anhydride à 34%, (2-Dodecenyl)succinic anhydride à 16,4% et 2,4,6-tris(dimethylaminoethyl)phenol à 1,5%). Une étape d'imprégnation est réalisée en trempant l'échantillon dans une solution d'éthanol pendant 30 min à température ambiante. Puis l'échantillon est déposé

dans de la résine pure pendant 30 min. Cette opération est répétée deux fois. Les échantillons sont ensuite transférés dans de la résine pure deux heures à température ambiante. L'étape de polymérisation de la résine dure 48 heures, dans un four à 60°C. La lamelle est ensuite décollée de l'échantillon en effectuant un choc thermique par trempage dans de l'azote liquide. La surface de la résine est coupée en petit bloc à l'aide d'une scie circulaire (de chez *Bronwill Scientific*). Puis des coupes transversales semi-fines (d'environ 0,5 à 1 µm) sont réalisées avec un ultramicrotome. Les plans de coupes sont sélectionnés au microscope optique en procédant à une coloration des coupes au bleu de toluidine. Si le plan de coupe est bon, des coupes transversales ultra-fines sont réalisées de suite sur le bloc à l'ultramicrotome (épaisseur ≈ 100 nm). Les coupes sont déposées sur des grilles en cuivres recouvertes d'un film de Formwar (Euromedex). Afin d'obtenir du contraste, les coupes sont colorées par un dépôt d'une solution d'acétate d'uranyle à une concentration de 5% pendant 20 min (manipulation à réaliser à l'abri de la lumière), puis pendant 10 min dans une solution de citrate de plomb à 4%. Afin d'éviter la précipitation du plomb avec le CO_2 de l'air, cette dernière manipulation s'effectue en présence de pastille de soude. Les coupes sont ensuite observées au MET (Figure 2-13).

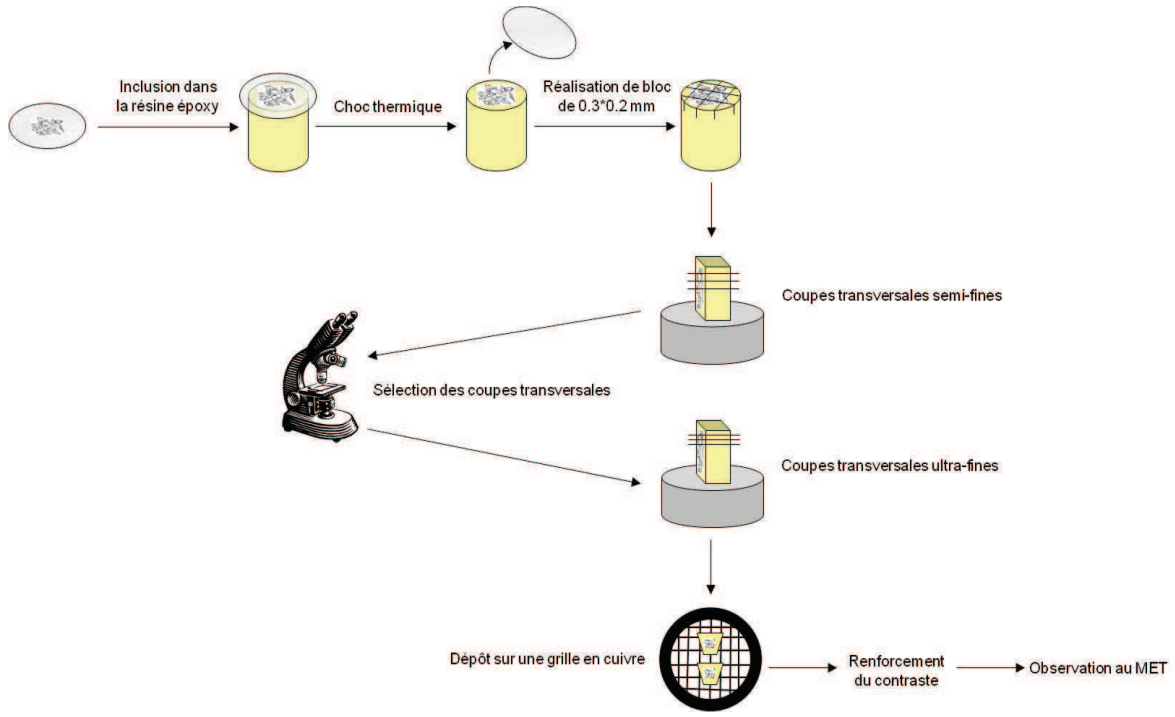


Figure 2-13: Préparation des échantillons à partir de l'étape d'inclusion dans la résine jusqu'à l'observation au MET.

2.3.11 Transfert des cellules PtK2 de E_0 + TSA sur verre

Vingt-quatre heures avant l'expérience, de la TSA à 50 nM est ajoutée au milieu de culture des cellules PtK2. Le jour de l'expérience, les cellules sont récupérées par trypsinisation, comptées et ensemencées à $2{,}10^5$ cellules.cm^{-2} en présence de TSA à 50 nM finale sur le substrat E_0 + TSA, déposé dans une plaque de 24 puits. Les cellules sont cultivées 5 h dans cette condition. Après 5 heures de culture, la lamelle subit un lavage au PBS 1X stérile avant d'être transférée dans un nouveau puits. Deux lavages successifs au PBS 1 X stérile sont à nouveau réalisés afin de supprimer au maximum les cellules mortes. Puis les cellules sont récupérées par trypsinisation, et ensemencées sur une lamelle de verre de 12 mm de Ø. Les cellules sont incubées 24 h sur le support verre (Figure 2-14). Pour terminer, un immunomarquage de A1 est réalisé sur les cellules.

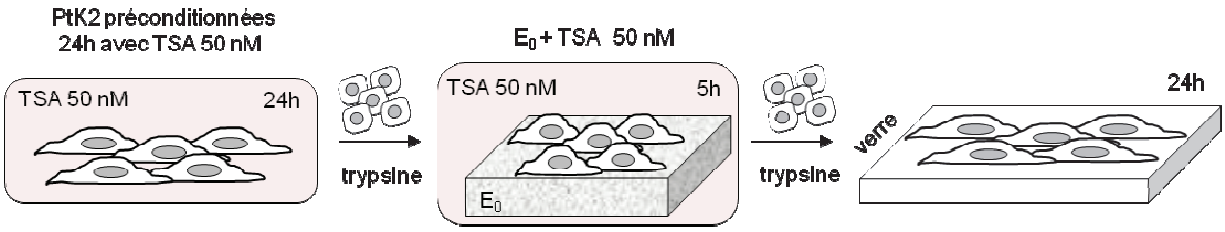


Figure 2-14: Schéma de l'expérience : transfert des cellules PtK2 sur verre après culture sur le substrat E_0 en présence de TSA 50 nM.

2.4 Quantification des évènements biologiques

2.4.1 Quantification d'un évènement mitotique en vidéomicroscopie

A partir des vidéos obtenues des cellules SW480 en mitose, plusieurs évènements ont été analysés :

- Le nombre de cellules en mitose à T 0h ;
- Le nombre de cellules en mitose finissant le cycle mitotique après 2h30 de suivi ;
- Les cellules en mitose montrant des fautes chromosomiques.

Les vidéos sont analysées avec le plugin « *Cell counter* » d'imageJ. Ce plugin permet d'identifier et de localiser les cellules directement sur la vidéo et ainsi de pouvoir répertorier les différents évènements. Les mesures ont été réalisées pour les

conditions verre, E_{50}, E_{20}, et E_0. Pour toutes ces conditions, deux expériences indépendantes ont été réalisées.

2.4.2 Quantification de l'hétérochromatine à partir des images de MET

Les images obtenues au MET sont ouvertes avec imageJ. Le contour du noyau est délimité et enregistré dans le « *ROI Manager* ». Un filtre gaussien de radius 2 est ajouté dans la région « Noyau ». La surface totale de l'hétérochromatine est délimitée en ajustant le seuil. La surface du noyau et l'hétérochromatine ainsi délimitées, ils sont considérés comme des objets. La surface de l'hétérochromatine est rapportée à la surface totale du noyau. Si le nucléole est présent sur la coupe, il est alors délimité et soustrait à la surface du noyau (Figure 2-15). Les mesures ont été réalisées pour les conditions verre, E_{200}, E_{50}, E_{20}, E_0, E_0 + TSA, et E_0 + TSA + AMA. Pour chaque condition, deux expériences indépendantes ont été réalisées.

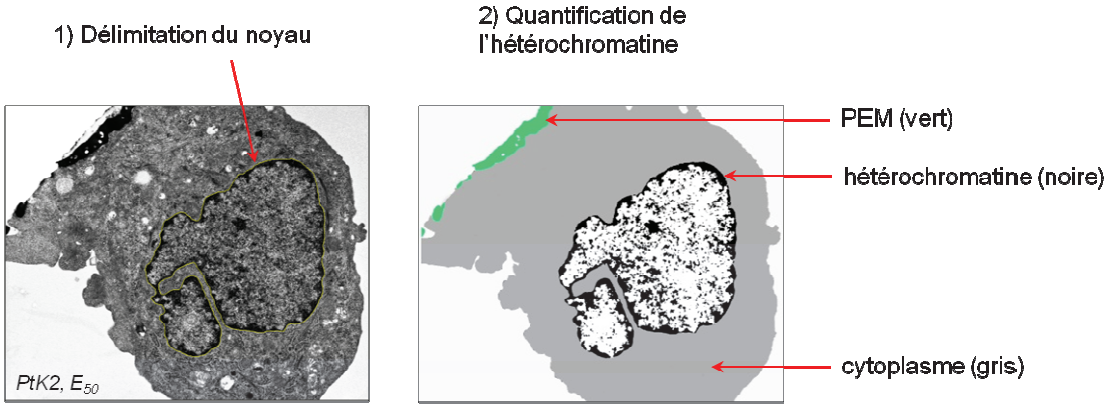


Figure 2-15: Quantification de la proportion d'hétérochromatine dans le noyau cellulaire.

2.4.3 Quantification du signal nucléaire fluorescent correspondant au marquage de hnRNP A1, de hNRP L, de HP1β et du BrdU

La quantification de l'intensité du signal fluorescent correspondant au signal des protéines A1, L, HP1β ou BrdU est réalisée avec le logiciel imageJ. Le résultat est donné en pourcentage d'unité arbitraire (U.A.), pour lequel le signal protéique sur la lame de verre vaut 1 U.A.. Pour les analyses, il est nécessaire d'avoir une image montrant l'ADN cellulaire (marquage Hoescht 33258) et une image du même plan montrant le signal protéique de A1, de L, de HP1β ou du BrdU. La surface du noyau est délimitée et

enregistrée dan le « *ROI Manager* » à partir de l'image montrant le marquage de l'ADN. Cette délimitation est calquée sur l'image montrant le signal protéique dans le noyau. L'intensité du signal est mesurée dans cette zone délimitée.

Les mesures ont été réalisées pour les conditions verre, verre + AMA, E_{200}, E_{50}, E_{20}, E_0, E_0 + TSA ou E_0 + TSA + AMA. La quantification est réalisée à partir de trois expériences indépendantes.

2.4.4 Quantification des bandes protéiques sur Western-blot

La quantification des bandes protéiques du Western-blot est réalisée à partir du logiciel Kodak digital Science 10. La quantification est réalisée à partir de deux expériences indépendantes. Les mesures sont réalisées pour la quantification des protéines Rac 1 et intégrine-β1 chez les cellules SW480 lors des conditions verre, E_{50} et E_{20}.

Chapitre 3 :

The control of chromosome segregation during mitosis in epithelial cells by substrate elasticity

3 The control of chromosome segregation during mitosis in epithelial cells by substrate elasticity

3.1 Introduction

L'élaboration de matériaux de rigidité contrôlée pour mimer l'élasticité des tissus biologiques a permis de mieux comprendre comment des signaux physiques régulent de nombreux comportements cellulaires tels que l'adhésion, la migration, la prolifération, la survie, la différenciation cellulaire et des activités nucléaires (Pelham et Wang 1997; Engler *et al.* 2004; Paszek *et al.* 2005; Engler *et al.* 2006; Levental *et al.* 2007). Ces réponses ont été très largement étudiées sur des cellules en interphase. Cependant, nos connaissances sont encore très limitées sur l'influence qu'exerce l'élasticité de la MEC sur des cellules en mitose. Un intérêt croissant s'est donc porté sur le rôle que jouent la MEC et les intégrines pour guider la division cellulaire (Reverte *et al.* 2006). Une cellule en interphase répond à la rigidité et à la tension de son substrat. En particulier, *via* les intégrines, la cellule est capable d'adhérer à son substrat en exerçant sur celui-ci des forces d'intensité variable. Les forces générées par le cytosquelette d'actine dans des directions définies peuvent assurer par exemple des processus d'adhésion cellulaire, de migration et de prolifération.

En mitose, tout en s'arrondissant, la cellule maintien sa polarité et transfert sa tension à des sites corticaux spécifiques jusqu'aux MTs d'aster chargés de guider l'orientation du fuseau, *via* des fibres de rétraction d'actine (Thery *et al.* 2005). Le fuseau mitotique permet ainsi la ségrégation correcte des chromosomes dans les deux cellules filles. La première partie de ma thèse porte sur le rôle qu'exerce l'élasticité du substrat sur la ségrégation des chromosomes. Ce paramètre peut s'avérer d'une grande importance lors de la conception de matrices utilisées comme plateforme de régénération tissulaire. Par exemple, une matrice synthétique, d'élasticité donnée, peut être conçue pour maintenir l'auto-renouvellement de cellules souches par division asymétrique (Knoblich 2010) ou, au contraire, pour induire une différenciation spécifique de cellules souches. La réponse d'une cellule en mitose à l'élasticité du substrat peut également avoir un impact considérable dans la transformation cellulaire maligne. Par exemple, des erreurs modérées de ségrégation des chromosomes peuvent

conduire à une transformation tumorale alors que des erreurs massives de ségrégation des chromosomes provoquent la mort des cellules et, par conséquent, inhibent le processus de transformation tumorale (Miura *et al.* 2006; Weaver et Cleveland 2007).

Un premier aspect a été d'étudier pour des cellules PtK2 en mitose, l'influence de l'élasticité du substrat sur l'engagement des intégrines αv/β1. Ces intégrines ont un rôle essentielles dans l'assemblage et l'orientation du fuseau mitotique pendant la métaphase (Streuli 2009). Un deuxième aspect a consisté à analyser l'organisation du fuseau mitotique, en relation avec l'activité de la protéine Rac 1 de cellules au contact de substrats d'élasticité décroissante. Rac 1 est une protéine de la famille des petites protéines Ras GTPase impliquée dans le positionnement des chromosomes lors de la mitose et dans l'orientation du fuseau mitotique. Cette protéine se concentre dans la membrane plasmique de cellules mitotiques en télophase et contribue au processus de cytokinèse (Yoshizaki *et al.* 2003).

L'influence de l'élasticité du substrat sur des cellules en cours de division est étudiée en utilisant des films multicouches de polyélectrolytes. Ils se composent de deux strates construites à partir de deux paires de polyélectrolytes différents : une strate épaisse et molle constituée de 24 bicouches de poly-L-lysine et d'acide hyaluronique $(PLL/HA)_{24}$ et une strate mince et rigide constituée n bicouches de poly(4-styrène sulfonate) de sodium et de poly(hydrochlorure d'allylamine) $(PSS/PAH)_n$. La rigidité du film $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_n$, mesurée par son module de Young E, augmente avec le nombre n (Francius *et al.* 2007). Elle passe ainsi de $E \approx 0$ pour $n = 0$ kPa à $E \approx 500$ kPa pour $n = 12$, couvrant ainsi la gamme d'élasticité des tissus biologiques. Le modèle cellulaire utilisé est une cellule épithéliale PtK2 de rein de kangourou. Les deux aspects de la mitose (exposé ci-dessus) ont été suivis à différents temps après synchronisation mécanique des cellules en phase mitotique.

3.2 Article

Biomaterials 33 (2012) 798–809

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biomaterials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biomaterials

The control of chromosome segregation during mitosis in epithelial cells by substrate elasticity

Leyla Kocgozlu [a,b,1], Morgane Rabineau [a,b], Géraldine Koenig [a,b], Youssef Haikel [a,b], Pierre Schaaf [c], Jean-Noel Freund [d,e], Jean-Claude Voegel [a,b], Philippe Lavalle [a,b,f], Dominique Vautier [a,b,*]

[a] Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM Unité 977, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, France
[b] Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, 1 Place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France
[c] Centre National de la Recherche Scientifique, UPR 22, Institut Charles Sadron, 23 rue du Loess, BP 84047, 67034 Strasbourg Cedex 2, France
[d] INSERM Unité 682, 3 avenue Molière, 67200 Strasbourg, France
[e] Université de Strasbourg, Faculté de Médecine, 67000 Strasbourg, France
[f] Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 1 Place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 September 2011
Accepted 10 October 2011
Available online 29 October 2011

Keywords:
Polyelectrolyte multilayer films
Biomaterials
Substrate elasticity
Integrin
Chromosome missegregation
Apoptosis

ABSTRACT

Materials of defined elasticity, including synthetic material scaffolds and tissue-derived matrices, can regulate biological responses of cells and in particular adhesion, migration, growth and differentiation which are essential parameters for tissue integration. These responses have been extensively investigated in interphase cells, but little is known whether and how material elasticity affects mitotic cells. We used polyelectrolyte multilayer films as model substrates with elastic modulus ranging from Eap = 0 up to Eap = 500 kPa and mitotic PtK2 epithelial cells to address these important questions. Soft substrates (Eap < 50 kPa) led to abnormal morphology in chromosome segregation, materialized by chromatin bridges and chromosome lagging. Frequency of these damages increased with decreasing substrate stiffness and was correlated with a pro-apoptotic phenotype. Mitotic spindle was not observed on soft substrates where formation of chromatin damages is due to low β1-integrin engagement and decrease of Rac1 activities. This work constitutes the first evidence that soft substrates hinder epithelial cell division. In perspective, our findings emphasize the prime incidence of the material elasticity on the fate of the phenotype, especially of stem cells in the mitotic phase.

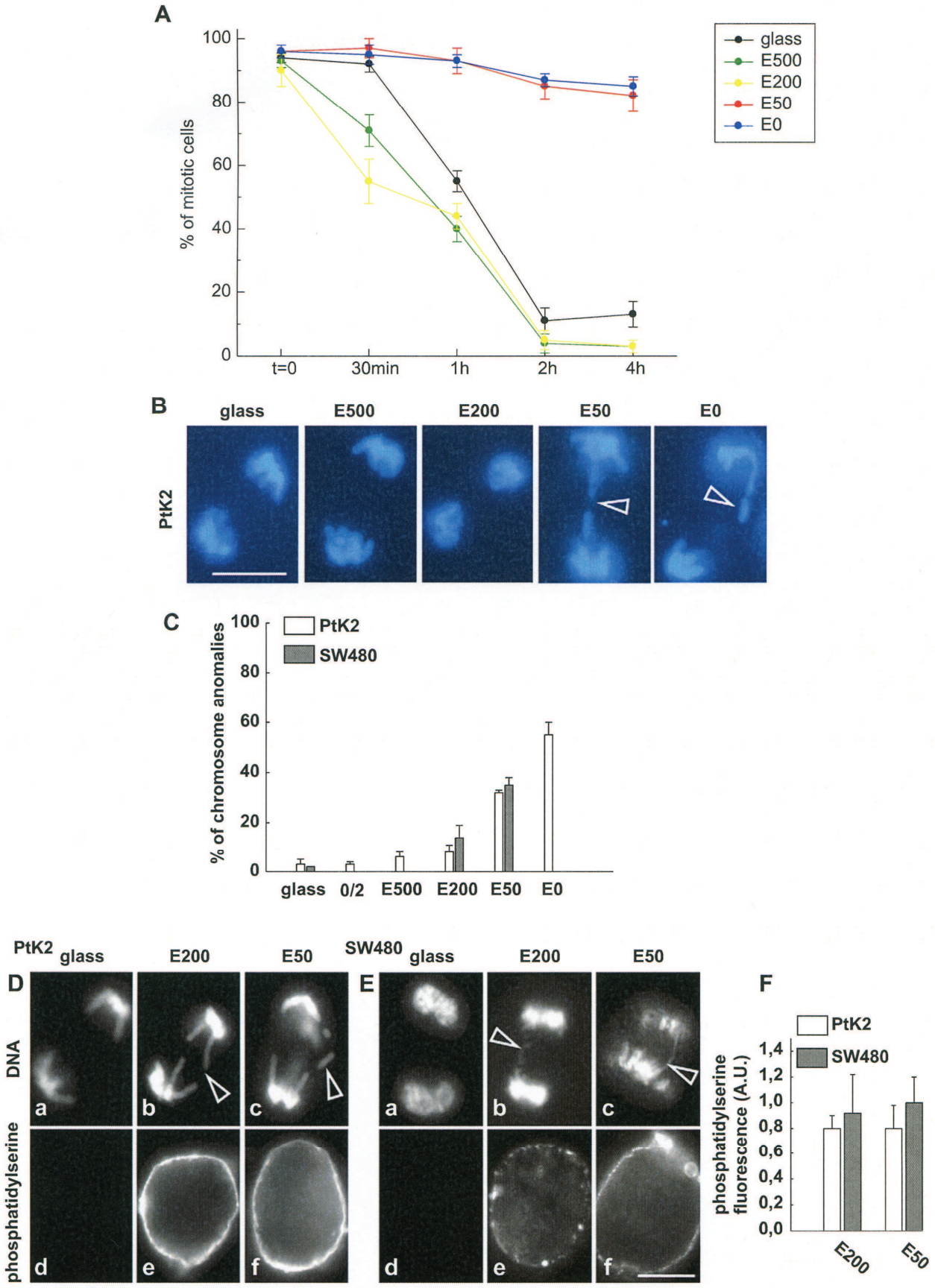
© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Synthetic scaffolds and tissue-derived matrices are potentially useful platforms for tissue regeneration and cell-based therapeutics [1–6]. Because of their ease of synthesis and similarity to biological soft matrices, hydrogels have become biomaterials of choice as vehicles for cell transplantation or cell attraction [7,8]. Stable integration of these synthetic materials within a complex anatomic site is extremely challenging for host tissue homeostasis. Physical stability of these materials is highly dependent on their mechanical properties [9]. Thus, only a decade ago, researchers indubitably evidenced that physical properties, for instance material elasticity, intervened in the regulation of biological responses [10,11]. Matrix elasticity can activate the integrin engagement at focal adhesions (FAs) [12]. Actin filaments (F-actin) terminated at FAs further propagate mechanical signals over long distances, eventually activating various effector molecules [13,14]. Cells integrate these multiple biochemical signals [15] by an adapted response including adhesion, survival, proliferation and differentiation [16–20]. These responses have been extensively investigated in interphase cells. However, little is known on the cell response to matrix elasticity during mitosis. This question constitutes the central issue of this work and is highly relevant for the design of new materials on which cells feel controlled elasticity. For instance, do synthetic material niches maintain asymmetric stem cell division [21]? This aspect is determinant for the self-renewal of the stem cells and the lineage-specific differentiation of their progeny. Response of mitotic cells to physical properties of the material could have also considerable impact in the cell malignant transformation. For instance, moderate chromosome missegregation can drive tumorigenesis whereas massive chromosome missegregation can inhibit tumor [22,23].

* Corresponding author. INSERM Unité 977, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, 1 Place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France. Tel.: +33 3 68 85 30 61; fax: +33 3 68 85 33 79.
E-mail address: Dominique.Vautier@medecine.u-strasbg.fr (D. Vautier).
[1] Present address: Mechanobiology Institute, National University of Singapore, Singapore 117411, Singapore.

0142-9612/$ – see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.biomaterials.2011.10.024


A
% of mitotic cells
100
80
60
40
20
0
t=0
30min
1h
2h
4h
glass
E500
E200
E50
E0
B
glass
E500
E200
E50
E0
PtK2
C
% of chromosome anomalies
PtK2
SW480
glass
0/2
E500
E200
E50
E0
PtK2
glass
E200
E50
SW480
glass
E200
E50
D
E
F
DNA
phosphatidylserine
a
b
c
d
e
f
phosphatidylserine fluorescence (A.U.)
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
E200
E50

As mitosis proceeds, cells reduce contacts with the extracellular matrix (ECM), dissociate FAs and disassemble F-actin, while the mitotic spindles reassemble to direct accurate segregation of chromosomes in daughter cells. Ultimately during cytokinesis, F-actin forms the contractile ring which allows daughter cells to separate. Increased interest was focused on the ECM to guide cellular division [24,25]. The ECM controls the location of cortical components at the membrane in interphase, which are maintained on the cortex of mitotic cells and used for spindle orientation [26]. Integrins are strongly involved in these mechanisms, in particular for the assembly and positioning of the mitotic spindle, as well as the cytokinesis [27–29]. This issue has up to now been mostly addressed experimentally on plastic or glass dishes, which constitute surfaces stiffer than soft synthetic matrices or hydrogels and most living tissues.

The layer-by-layer deposition of polyelectrolytes has opened a valuable route for the design of microenvironments with tunable stiffness used to modulate cell mechanosensing and mechanoresponses [30–32]. This method consists in the alternate deposition of positively and negatively charged polyelectrolytes onto solid substrates leading to the formation of films called "polyelectrolyte multilayers" (PEM) [33–36]. Different methods have been proposed to stiffen a soft PEM film. One way consists in varying the degree of ionic bonds between the polyanion and the polycation, by varying the pH of the polyelectrolyte solutions when at least one of them is a weak polyelectrolyte [37]. Another strategy consists in cross-linking poly(L-lysine)/hyaluronan (hereafter abbreviated PLL/HA) films using carbodiimide chemistry (1-ethyl-3(3-dimethyllaminopropyl)carbodiimide and N-hydrosulfosuccinimide) [38]. By adjusting the cross-linking degree of such PEM film, skeletal muscle cell differentiation was controlled [39]. Non-crosslinked soft PLL/HA films can also be stiffened by deposition of poly(sodium 4-styrene sulfonate)/poly(-allylamine hydrochloride) (PSS/PAH) capping films [40]. These multilayered polyelectrolytes allow designing a range of films with various elasticities. The viscoelasticity of these films was explored by Francius et al. [41] using atomic force microscopy. The films were characterized by their apparent elastic modulus (Eap), which would correspond to the real elastic modulus of the layer if it behaved strictly elastically.

Recently, using these films, our group evidenced on the one hand that at a Young's modulus of about 50 kPa, the absence of focal contacts and actin stress fibers prevented the activation of DNA replication but not the genes transcription. On the other hand, a Young's modulus of 200 kPa allows the formation of focal contacts and stress fibers necessary for DNA replication while the transcription activity is maintained. Together, these results revealed a selective and uncoupled contribution of the substrate elasticity to the regulation of replication and transcription activities [42].

Here, we investigate the influence of the substrate elasticity on dividing cells using (PLL/HA) films capped by a (PSS/PAH) stratum as model substrates. For this purpose, mitotic epithelial cells (marsupial kidney epithelial PtK2 cells and the human epithelial colon cancer cell line SW480) were seeded on different films with decreasing stiffness (Eap: apparent Young modulus ranging from 500 down to 0 kPa, Table S1 and Fig. S1A and B) and their behavior was investigated over different times following their synchronization in mitotic phase.

Table 1
Annexin V positive mitosis without or with chromosome abnormality (n = number of cell tested).

	Mitosis			Mitosis with abnormality		
	% of mitosis annexin V+			% of mitosis annexin V+		
	n	PtK2	SW480	n	PtK2	SW480
E50	20	0	0	20	100	100
E200	20	0	0	20	100	100
Glass	20	0	0	20	100	100

2. Experimental

2.1. Materials and fabrication of PEM

PLL (MW = 5.7×10^4 Da, Sigma, St. Quentin Fallavier, France), fluorescein isothiocyanate labelled PLL (PLL^{FITC}, MW = 5.0×10^4 Da, Sigma, St. Quentin Fallavier) and HA (MW = 4.0×10^5 Da, Biolberica, Barcelona) were used for the buildup of $(PLL/HA)_{24}$ films. PSS (MW = 7.0×10^4 Da, Sigma, St. Quentin Fallavier), rhodamine labelled PSS (PSS^{rho}, MW = 5.0×10^4 Da) and PAH (MW = 7.0×10^4 Da, Sigma) were used for the buildup of $(PSS/PAH)_n$ capping films (were n corresponds to the number of layer pairs), which were deposited on top of the $(PLL/HA)_{24}$ strata. PLL (PLL^{FITC}), HA, PSS, PSS^{rho}, and PAH were dissolved at 1 mg/mL in a buffer solution containing 150 mM NaCl and 20 mM of tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS, Merck) at pH 7.4. During film construction, all rinsing steps were performed with 150 mM NaCl 20 mM TRIS aqueous solution at pH 7.4. $(PLL/HA)_{24}$ strata were prepared using a dipping machine (Dipping Robot DR3, Riegler & Kirstein GmbH, Berlin, Germany), on glass slides (VWR Scientific, Fontenay sous Bois, France). $(PSS/PAH)_n$ capping films were prepared manually. An example of confocal z-section observation is displayed in Fig. s1A. The rigidity of the $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_n$ film increases with the number of deposited PSS/PAH layer pairs (Fig. s1B), as described previously (Francius et al., 2007). We shall use the short hand notations E0, E20, E50, E200 and E500 for the $(PLL/HA)_{24}$, $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_n$ films with n = 0, 1, 2, 5, 12, respectively, and 0/2 for $(PSS/PAH)_2$ (Table S1).

2.2. PEM characterization

CLSM observations were performed with a Zeiss LSM 510 microscope using a 40 × 1.4 oil immersion lens. FITC-fluorescence was detected after excitation at 488 nm with cut-off dichroic mirror 488 nm and emission band-pass filter 505–530 nm. Rho-fluorescence was detected after excitation at 543 nm, dichroic mirror 543 nm, and emission long pass filter 585 nm.

2.3. Cells and synchronization

PtK2 cells (CCL-56, LGC Standards, UK) were grown in RPMI-1640 medium (Invitrogen) supplemented with 100 μg/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin (Invitrogen,), and 10% FBS (Invitrogen), and maintained at 37 °C with 5% CO_2. Colorectal adenocarcinoma epithelial SW480 cells were grown in RPMI-1640 medium (Invitrogen) supplemented with glutamax, 10% FBS (Invitrogen), 5% penicillin/streptomycin, 0.025 U/mL insulin, 50 mg/mL hydrocortisone and 1.25 mg/mL G418 maintained at 37 °C with 5% CO_2. Cells were synchronized by mechanical shakeoff. Three days prior to synchronization, cells were replated at 1.2×10^4 per cm^2. Mitotic cells were centrifuged (700 g, 5 min), resuspended in culture medium, and replated at 1.2×10^4 per cm^2 from surfaces. (M-phase = prometaphase, metaphase, anaphase and telophase; G1 cells = cells with nucleus-containing nucleolus: Fig. S1C). For β1-integrin and Rac1 inhibitor treatments, cells were cultured respectively with 50 μg/mL TASC (blocking-β1 antibody, Millipore) and with 100 μM NSC 23766 (Calbiochem) from synchronization until their fixation.

2.4. Immunolabeling

Cells were seeded on surfaces at 1×10^5 (asynchronized) or 1.2×10^4 per cm^2 (synchronized) and fixed in 3.7% (w/v) paraformaldehyde (PFA) in PBS for 15 min, and fixed/permeabilized in 3.7% (w/v) PFA in PBS plus 0.1% Triton X-100 for 10 min. Cells were blocked with 10% decomplemented FBS (invitrogen) and incubated with αv-integrin (1:100; Santa Cruz, USA). Cells were then incubated with FITC-

Fig. 1. Cell cycle progression and mitotic abnormalities with respect to elastic moduli. A) Cells in mitosis (prometaphase – telophase) after release on glass, E500, E200, E50 and E0. 300 fixed cells were used for each condition for 5 time periods. Results are presented as s.e.m for 3 independent experiments. B). Synchronized population seeded on glass, E500, E200, E50 and E0 (scale bar = 20 μm). C) Percentage of cells presenting abnormal chromosome morphologies. 200 fixed cells were analysed for each condition. The percentage was obtained by pooling over the 5 times periods (0/2: short-hand notation for $(PSS/PAH)_2$). D) and E) respectively PtK2 and SW480 cells 1 h post-synchronization analysed with the apoptosis kit (a, b and c: counterstained with Hoechst; d, e and f, fluorescence image for phosphatidylserine). (a, d) glass, (b, e) E200 and (c, f) E50 (D and E: bar = 10 μm). F) phosphatidylserine fluorescence (arbitrary units, A.U) using Image J; 20 mitotic cells exhibiting damage in chromosome segregation were analysed in D and E. (C and F results are given as s.e.m for three independent experiments) (open arrowhead: chromatide bridge and lagging chromosome, Hoechst 33258 labelling).

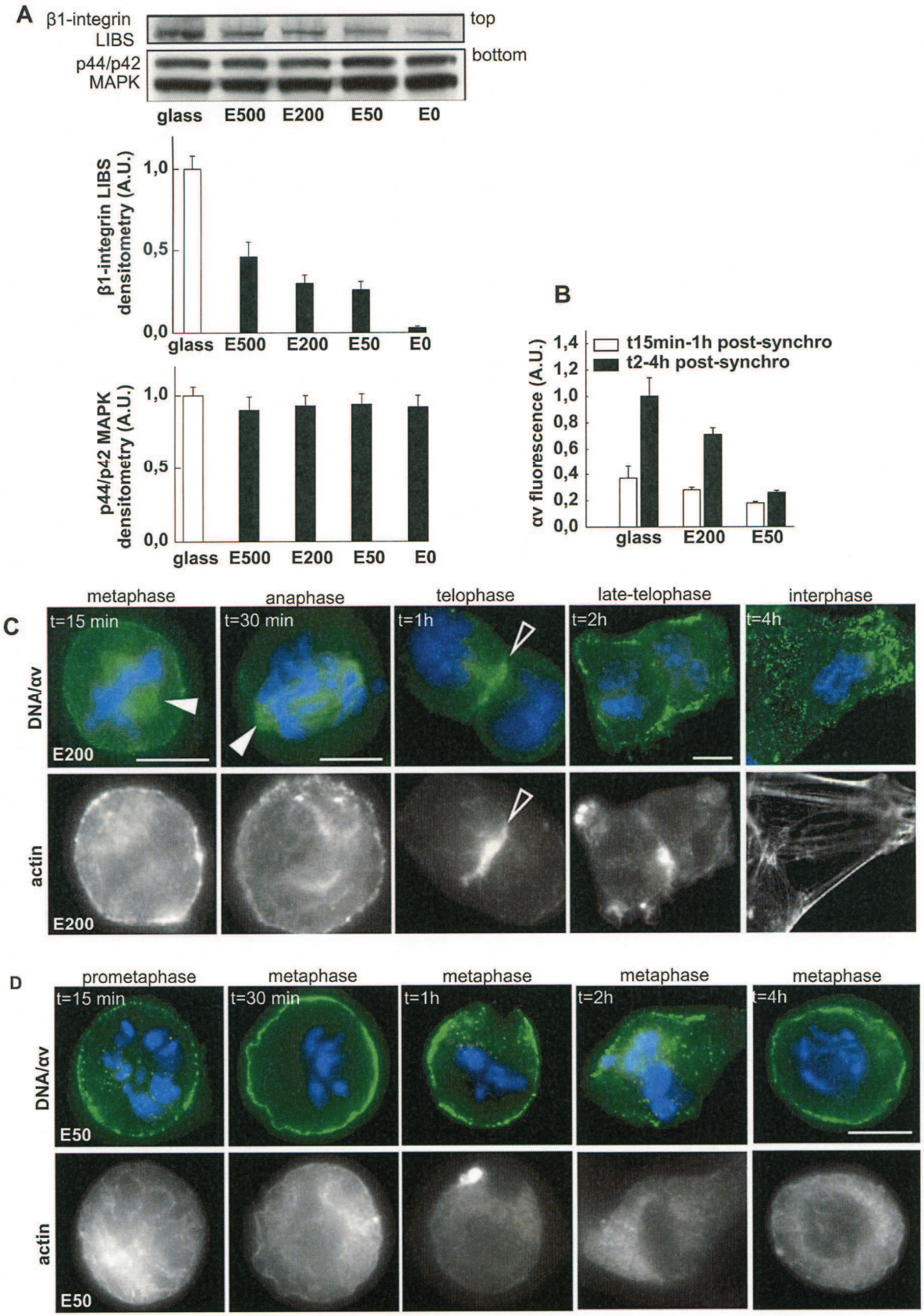


Fig. 2. αv engagement and actin organization of mitotic synchronized PtK2 cells with respect to different substrate elasticity. A) Western blots of top: β1-integrin LIBS, botto MAPK protein for PtK2 cells seeded 4 h on glass, E500, E200, E50 and E0. Histogram shows the corresponding scans for β1-integrin LIBS and p44/p42 MAPK. Representive resu from at least 2 independent experiments (the error bars represent the s.e.m). B) Fluorescence for αv integrin using Image J. 30 cells were used for each condition. (B results a

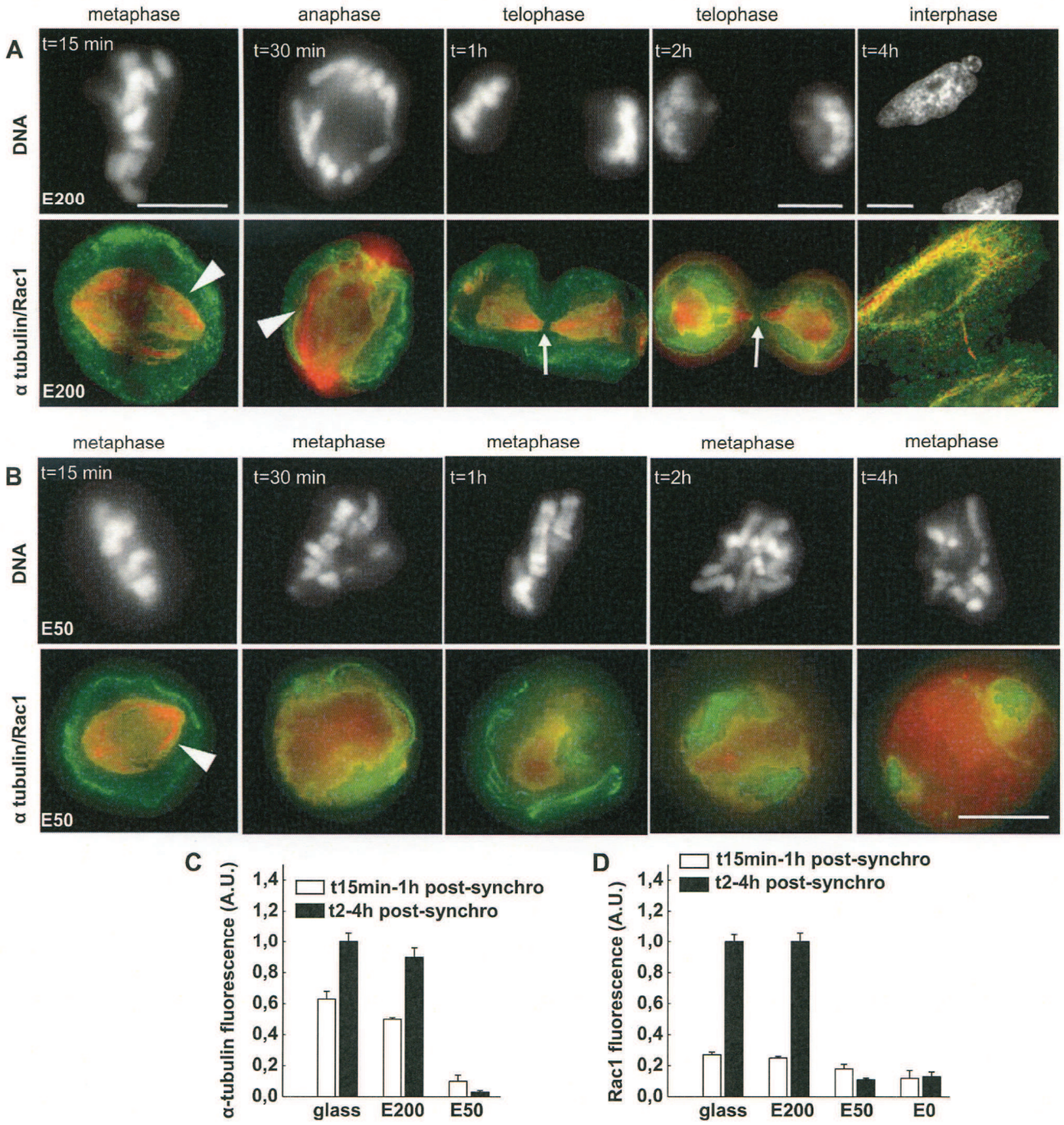


Fig. 3. α tubulin and Rac1 distribution of mitotic synchronizated PtK2 cells with respect to different substrate elasticities. PtK2 cells seeded on E200 (A) $t = 15$ min (metaphase), $t = 30$ min (anaphase), $t = 1$ h and 2 h (telophase) and $t = 4$ h (interphase). PtK2 cells seeded on E50 (B) For all the indicated times $t = 15$ min, 30 min, 1 h, 2 h and 4 h (metaphase). A and B counterstained with Hoechst (DNA); superposition of cells with α tubulin (red) and Rac1 (green) (α tubulin/Rac1). C) Fluorescence for α tubulin using Image J. 30 cells were used for each condition for the 5 time periods. D) Fluorescence for Rac1 using Image J. 30 cells were used for each condition for the 5 time periods (C and D: results are presented as s.e.m for 2 independent experiments, an arbitrary value of 1 was attributed to cells on glass). (A: metaphase-telophase; interphase: scale bar = 10 μm), (B: bar = 10 μm) (full arrowhead: mitotic spindle, arrow: central spindle at the cell mid-zone). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

presented as s.e.m for 2 independent experiments; an arbitrary value of 1 was attributed to cell on glass). PtK2 cells seeded on E200 (C) at $t = 15$ min (metaphase), $t = 30$ min (anaphase), $t = 1$ h (telophase), $t = 2$ h (late-telophase), $t = 4$ h (interphase). PtK2 cells seeded on E50 (D) at $t = 15$ min (prometaphase), $t = 30$ min (metaphase), $t = 1$ h (metaphase), $t = 2$ h and 4 h (metaphase). C and D superposition of cells with anti-αv integrin (green) and Hoechst (blue) (DNA/αv), counterstained with actin (black and white). (C: metaphase; anaphase-telophase; late-telophase-interphase : scale bar = 10 μm), (D: bar = 10 μm). (full arrowhead: αv-integrin in fiber spindle-like structures; open arrowhead: αv in cell mid-zone). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

conjugated secondary antibody (1:500; AnaSpec, Fremont, CA). For Rac1, cells were incubated with anti-Rac1 (1:100, Millipore) and for actin with TRITC-phalloidin (1 μg/mL; Sigma) and DNA with Hoechst 33258 (20 μg/mL, Sigma). For α-tubulin, cells were incubated with anti-α-tubulin (1:100, Santa Cruz). For vinculin, cells were incubated with anti-vinculin (1:100; clone hVin-1, Sigma) and then with TRITC or FITC-conjugated secondary antibody (1:200; Santa Cruz). Representative cells of the cell population observed at different times after the synchronisation (t = 15 min, 30 min, 1 h, 2 h and 4 h) and for the different substrates (glass, E200, E50 and E20) are shown in the figures.

2.5. Replication

1.2×10^4 cells were seeded per cm^2 and incubated with BrdU for 15 min (37 °C) (1:500; RPN 201, GE Healthcare Europe). Cells were fixed/permeabilized in 3.7% PFA in PBS plus 0.5% Triton X-100 for 15 min. After washing with PBS, cells were incubated with anti-BrdU and DNase for 1 h at 37 °C (1:100; RNP 202, GE Healthcare Europe). After washings with PBS, cells were incubated with FITC-conjugated secondary antibody (1:500; AnaSpec).

2.6. Microscopy

Samples were mounted in VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Fluorescence or phase images were visualized with Nikon Elipse TE200 (objective lenses 63 × 1.4 NA). Images were acquired with Nikon Digital Camera (DXM 1200 or DS-Q11MC with ATC-1 or NIS-Elements softwares). Pictures were processed with Image J (http://rsb.info.nih.gov/ij/).

2.7. Apoptosis

Cells were seeded at 1.2×10^4 per cm^2. Annexin V binding was carried out using the Vybrant Apoptosis Assay Kit (Molecular Probes) according to the manufacturer's instructions. Cells were analyzed by fluorescence microscopy.

2.8. Western blot

Cells were seeded on surfaces (Nunc) at 2×10^5 per cm^2 and incubated for 4 h or 30 min post-synchronization in culture medium at 37 °C and at end of incubation treated with 1% of 0.2 M sodium orthovanadate (Sigma). Cells were lysed in 20 mM Tris-base, pH 8, (0.15 M NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 10% glycerol, 1 mM sodium orthovanadate containing 1% of protease inhibitor cocktail; Sigma). Extraction mixtures are rocked at 4 °C for 1 h and centrifuged (5 min, 7000 g at 4 °C). Protein concentration was determined using DC protein assay (Bio Rad, USA). Equal amounts of total protein extracts were subjected to SDS PAGE (NuPAGE, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and transferred onto nitrocellulose membranes (Iblot Transfer Stack, Invitrogen, USA) blocked in T - TBS (0.1% Tween 20, 50 mM Tris-base, pH 7.6, 0.15 M NaCl) containing 1% BSA (Euromedex, France) and probed overnight at 4 °C

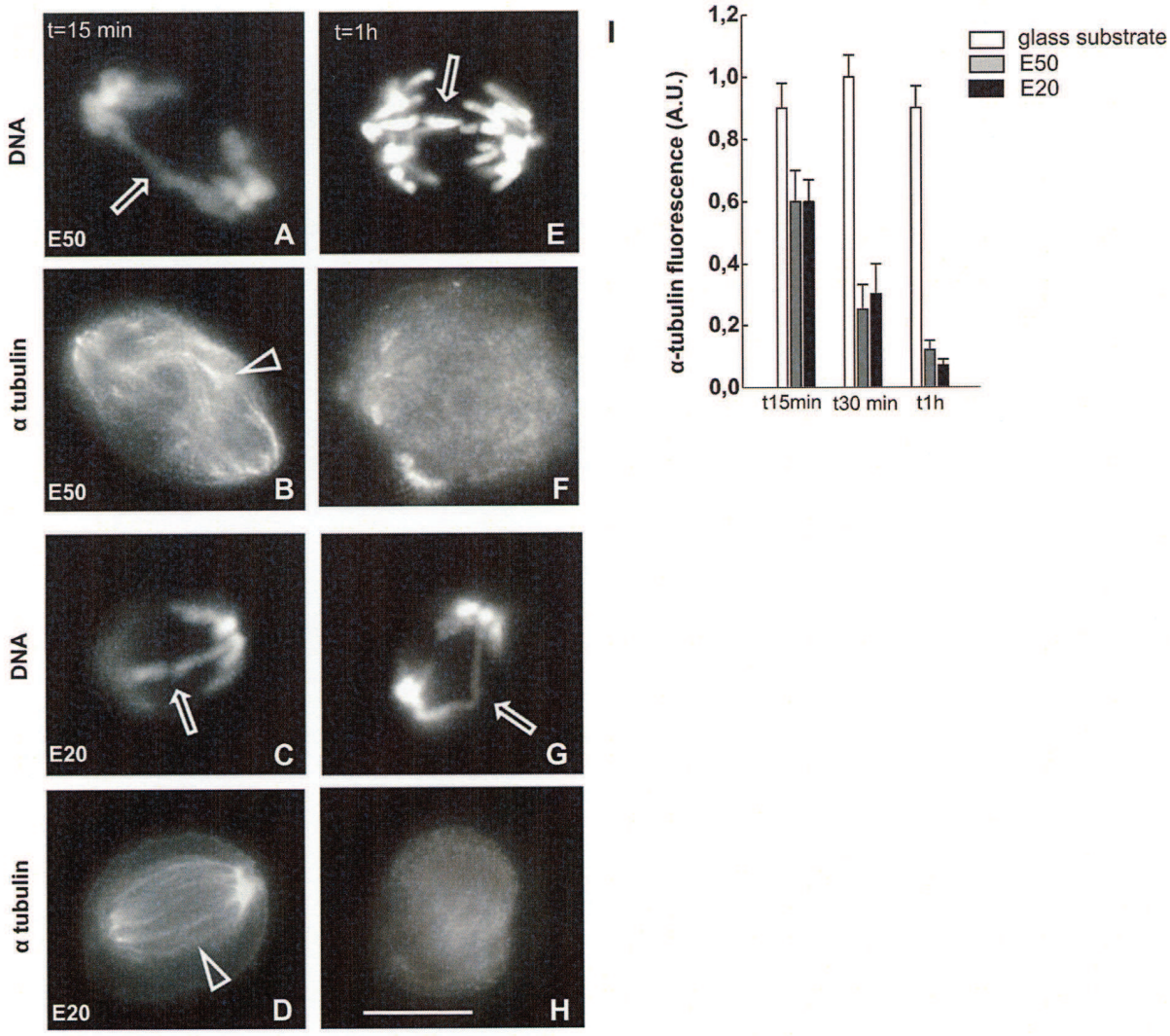


Fig. 4. Relationship between mitotic spindle and chromatin bridge with respect to soft substrates. PtK2 cells seeded on E50 (A, B and E, F) and on E20 (C, D and G, H) were fixed t = 15 min (A–D) and t = 1 h (E–H) after synchronization. Images show cells with anti-α tubulin (B, F, D and H) respectively counterstained with Hoechst (DNA) (A, E, C and G) (open arrow: chromatide bridge, open arrowhead: mitotic spindle). Scale bar: 10 μm. I) Fluorescence intensity for α-tubulin signal (an arbitrary value of 1 was attributed to cells on glass) using Image J, based on B, F, D and H. 20 cells were analyzed per condition (for three time periods). Results are presented as s.e.m. for two independent experiments.

with primary antibody. β-integrin activated LIBS, (clone B44) (1:1000, Chemicon), anti-Rac1 (1:1000, Millipore) FAK-Y397-P (1:1000, BD Transduction Laboratories, Lexington, KY), FAK (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) and p44/p42 MAPK (1:1000, Cell Signaling, USA) were used. Blots were incubated for 2 h with HRP-conjugated anti-rabbit, anti-mouse antibodies (1:5000; GE Healthcare). Bands were detected using an enhanced chemiluminescence (ECL) kit (GE Healthcare). Autoradiographs were quantified with Kodak Digital Science 10 Software. Representative mean values of at least three independent experiments with standard errors (four time-points per band) are presented.

2.9. Rac1 activation assay

Rac1 activation assay was assessed following the manufacturer's recommendation using the Rac G-Lisa activation assays from Cytoskeleton (Denver, CO).

3. Results and discussion

3.1. Influence of substrate elasticity on chromosome segregation

PEM films were used to investigate how the mechanical properties of the substrate might play a role in mitosis. We first investigated the influence of PEM film elasticity on the progression from mitosis to interphase entry (Fig. S1C) in PtK2 cells using the mitotic shake-off method (Fig. S1D). The results obtained for the culture on soft substrates were compared to those for cells seeded on glass slides. Fig. 1A shows that after synchronization, the percentage of mitotic cells decreases with time, with a similar time-course for the glass surface and for the high stiffness substrates E500 and E200 (surface with apparent Young modulus of 500 and 200 kPa, respectively). Interphase entry occurred after 1 h post-synchronization on E500 and E200 substrates (data not shown). However, by decreasing the surface stiffness (E50 and E0), the progression into the cell cycle was strongly compromised so that the percentage of mitotic cells remained high over the whole time period lasting from 1 to 4 h post-synchronization (Fig. 1A). In addition, DNA fluorescence microscopy analyses of cell-cycle classification revealed that substrate elasticity induced abnormal morphologies in chromosome segregation materialized in anaphase and in telophase by chromatin bridges and chromosome lagging (Fig. 1B E50 and E0: open arrowhead). The quantification indicated that, even if damages of chromosome segregation were found for all stiffnesses (E500, E200, E50 and E0), their percentage increased largely with the decrease of substrate stiffness (Fig. 1C). In accordance with the data obtained with the transformed PtK2 cell line, the human epithelial colon cancer cell line SW480 (other epithelial cell type with high cancer phenotype) also showed a progressively increased rate of chromosome segregation abnormalities when seeded on glass compared to E200, E50 and E0 (Fig. 1C). These results suggest that a decrease of substrate stiffness induces a delay in mitotic progression and affects chromosomal segregation in transformed and cancer cells.

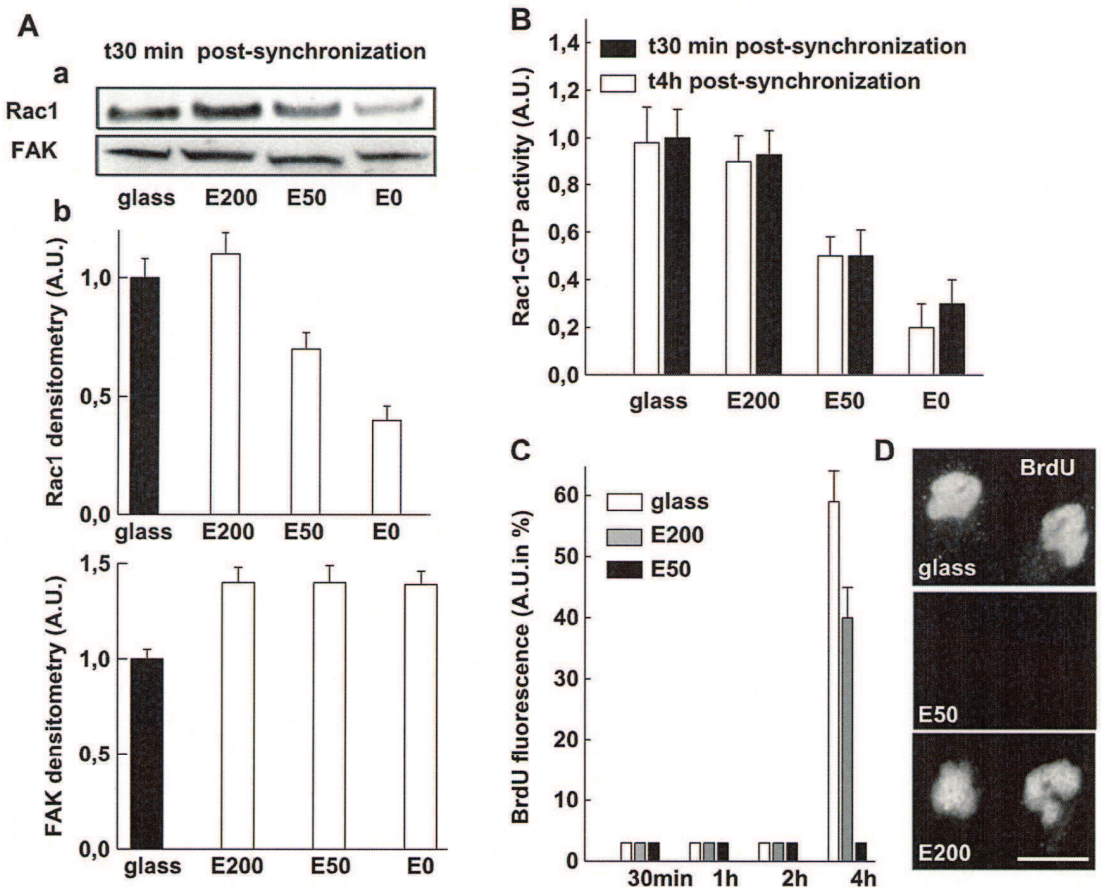
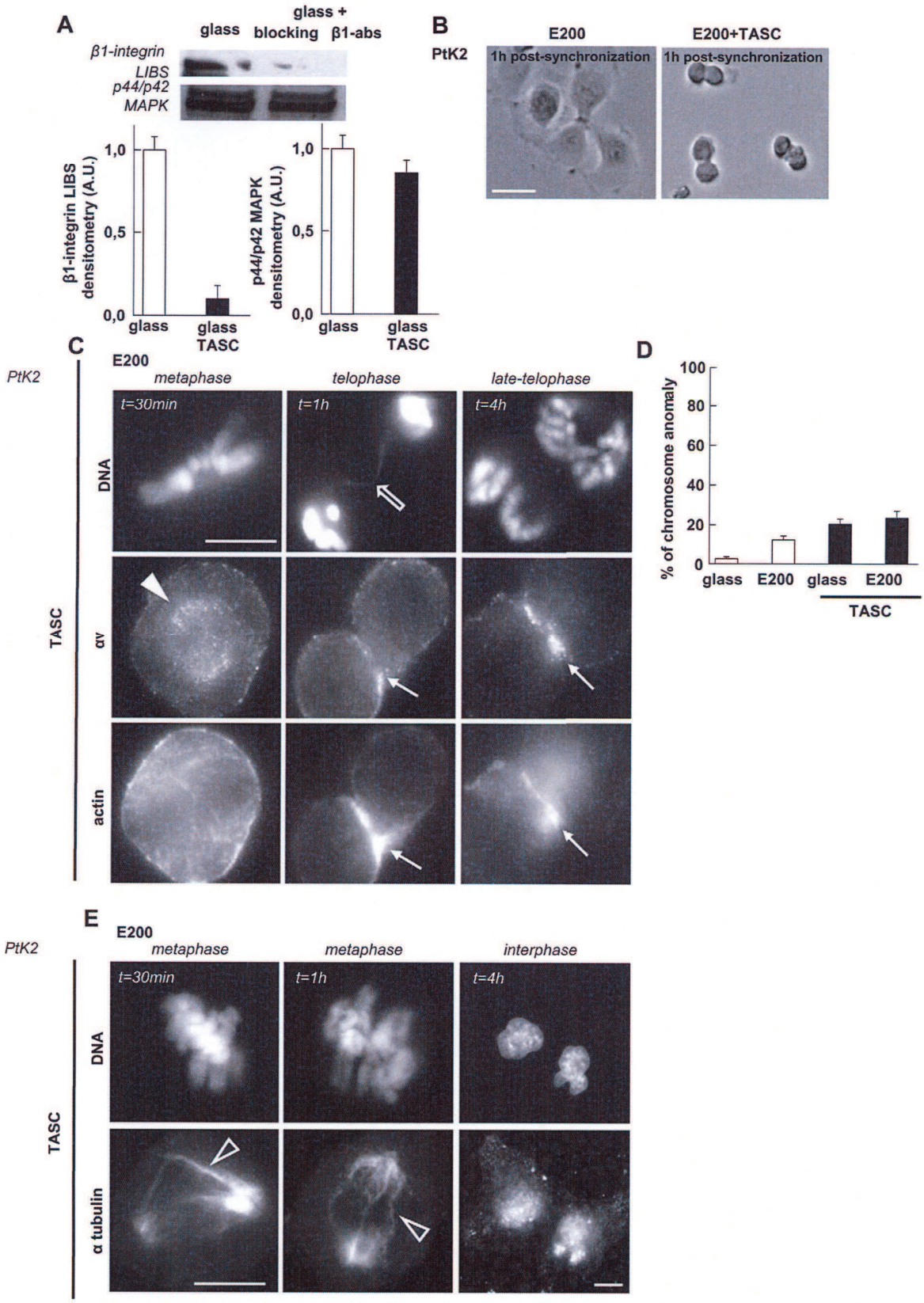


Fig. 5. Rac1 expression of mitotic synchronized PtK2 cells with respect to different substrate elasticities. A) a) Western blot of Rac1 and FAK proteins for PtK2 cells seeded after 30 min post-synchronization on glass, E200, E50 and E0, b) corresponding scans for Rac1 and FAK. Representative results from at least 2 independent experiments (the error bars represent the s.e.m), B) Cells were seeded respectively after 30 min (black bar) and 4 h (white bar) post-synchronization on glass, E200, E50 and E0. Each cell lysate was incubated in duplicate wells coated with the Rac-GTP binding protein; data are mean ± SD of the duplicates (an arbitrary value of 1 was attributed to cells on glass). C) Fluorescence intensity for nuclear BrdU signal using image J, determined on 40 cells (for 4 time periods). D) BrdU visualized by indirect immunofluorescence 4 h post-synchronization on glass, E50 and E200 (scale bar = 10 μm).


A
glass
glass + blocking β1-abs
β1-integrin LIBS
p44/p42 MAPK
β1-integrin LIBS densitometry (A.U.)
p44/p42 MAPK densitometry (A.U.)
1,0
0,5
0,0
glass
glass TASC
B
PtK2
E200
E200+TASC
1h post-synchronization
1h post-synchronization
C
PtK2
E200
metaphase
telophase
late-telophase
t=30min
t=1h
t=4h
DNA
αv
actin
TASC
D
% of chromosome anomaly
100
80
60
40
20
0
glass
E200
glass
E200
TASC
E
PtK2
E200
metaphase
metaphase
interphase
t=30min
t=1h
t=4h
DNA
α tubulin
TASC

3.2. Physiological significance of chromosome missegregation

Spindle assembly and replication checkpoints induce delays in cell cycle progression which offers time for completion of DNA synthesis or repair [43]. Reversely, apoptosis eliminates cells carrying irreparable damages [44]. Fluorescent phosphatidylserine assays (annexin V labeling) to directly count apoptotic cells showed that only PtK2 and SW480 cells bearing chromatin bridges and chromosome lagging were annexin V positive (Fig. 1D–F and Table 1). Cells with damages of chromosome segregation depicted a higher signal intensity of phosphatidylserine suggesting a pro-apoptotic behavior.

3.3. Integrins engagement with respect to soft substrate

We addressed then the influence of substrate elasticity on integrins because, beyond their role as sensors of extracellular microenvironment, they are also essential for correct assembly and orientation of the mitotic spindle during metaphase [45]. We observed activation of β1-integrin on the stiff substrates which progressively decreased becoming close to zero for E0 (Fig. 2A top). Mitotic PtK2 cells cultured on glass, E200 and E50 were then immunolabelled (Fig. 2B) using antibodies specific for αv-integrins, (αv-integrins are highly expressed in epithelial cells [46]). The mitosis response was investigated on E200 (comparable results were obtained on glass substrate, supplementary material: Fig. S3) and on E50, the soft substrate for which the entry in the cell cycle was severely compromised. On E200 substrate, in metaphase and anaphase cells, actin was diffusely localized at the cell cortex (Fig. 2C, respectively $t = 15$ and $t = 30$ min post-synchronization). αv-integrin was localized at the cell periphery and interestingly also detected in fiber spindle-like structures (Fig. 2C, $t = 15$ min and $t = 30$ min post-synchronisation, full arrowhead; see also supplementary material Fig. S2A for SW480 cells). A double immunolabelling of PtK2 cells with anti-αv-integrin and anti-α-tubulin antibodies revealed that αv-integrin colocalizes partially with α-tubulin in mitotic spindle (supplementary material Fig. S2B, 30 min post-synchronization). These data are in accordance with other investigations showing that integrin α subunits are concentrated in the mitotic spindle [47]. In telophase, αv accumulated in the cell mid-zone in the region of the actin ring (Fig. 2C and 1 h post-synchronization open arrowhead). During interphase (4 h post-synchronization), αv was localized in the plasma membrane and was uniformly distributed in the cytoplasm and actin was organized in cytoplasmic microfilaments (Fig. 2C). Thus, the elasticity of 200 kPa and above allowed αv integrin engagement, probably necessary to induce mitotic cell adhesion to the substrate particularly in the cell mid zone. Indeed, Pellinen et al. [48] recently suggested that integrin accumulation in the furrow engages the matrix to support cytokinesis by providing mechanical anchoring for the contractile actomyosin ring. When the substrate was softened at 50 kPa (E50), in metaphase cells, αv localized either diffusely at the membrane or in a few intracellular spots (Fig. 2D). However, αv was not organized in fiber spindle-like structures (Fig. 2D, $t = 15$ min post-synchronization). Counterstaining with phalloidin showed actin diffusely localized at the cell cortex (Fig. 2D). Our results clearly indicate that a stiff substrate induces β1-integrin activation whereas this activity progressively decreases for softer substrate (E50 and E0). Our data are in accordance with other studies demonstrating that MDCK cells sense the substratum rigidity via activated β1-integrin, allowing downstream activation events to occur [49]. The localization of αv in fiber spindle-like structures requires also a substrate with Eap values exceeding 50 kPa.

3.4. Mitotic spindle with respect to soft substrates (Eap < 50 kPa)

A major question concerns whether the mitotic spindle organization is affected by the stiffness of the substrate and whether this correlates with Rac1 activity during mitosis. Rac1, proteins of small GTPase Ras family, are involved in the correct positioning of chromosome during mitosis and in mitotic spindle orientation [50]. Their activity increase at the plasma membrane of the polar side after telophase [51]. For this purpose, PtK2 cells seeded on substrates of decreasing stiffness were double immunolabelled with anti-α-tubulin and anti-Rac1 antibodies to compare the localization of these proteins in different stages of the mitosis. On E200 substrates, in metaphase and anaphase the mitotic spindle was present (similarly to that found in cell seeded on glass substrates, Fig. S4), while Rac1 spread throughout the cytoplasm (Fig. 3A). The pattern of Rac1 was also comparable to those observed on glass substrates (Fig. S4), including the exclusion from the mitotic spindle mid-zone at telophase (Fig. 3A) and the uniform distribution in the cytoplasmin interphase cells (Fig. 3A). Early after release on E50 substrates, metaphase cells exhibited a mitotic spindle (Fig. 3B, $t = 15$ min post-synchronization). Rac1 was preferentially localized at the cell periphery, excluded from the region rich in α-tubulin (Fig. 3B, $t = 15$ min post-synchronization). For metaphase still observed at the different post-synchronization times, the mitotic spindle of microtubule was not observed (Fig. 3B and C, $t = 3$ min, 1, 2 and 4 h post-synchronization). We note that early after the synchronization ($t = 15$min), mitotic cells bearing chromatin bridges (Fig. 4A and C for E50 and E20, respectively) displayed a mitotic spindle (Fig. 4B and D for E50 and E20, respectively), whereas 1 h after synchronization, the mitotic spindle was not observed for mitotic cells bearing chromatin damage (Fig. 4E and G for E50 and E20, respectively), (Fig. 4F and H for E50 and E20, respectively and Fig. 4I). Mechanisms by which the elasticity of the substrate leads to the destructuring of the spindle and the relationship with the chromatin bridge remains an issue not yet resolved.

3.5. Rac1 activities with respect to soft substrates

We further quantified Rac1 expression through Western blot analyses of cells cultured on substrates of decreasing stiffness. Expression of Rac1 was respectively reduced 2.8–2.5 fold on E0 and 1.5 and 1.4 fold on E50 in comparison to E200 and glass substrates (Fig. 5A). Measurement of Rac1 activity by the "Rac G-Lisa activation assays" corroborated these results with maximal activities on substrates with high stiffness (Fig. 5B, glass and E200) while progressively decreasing for softer substrates (Fig. 5B, E50 and E0).

Fig. 6. αv, actin and α tubulin organization with respect to the blocking β1-antibody TASC on E200. A) Western blot of β1-integrin LIBS and MAPK with or without 50 μg/mL TASC for asynchronized PtK2 cells seeded 4 h on glass substrates and corresponding scans for β1-integrin LIBS and MAPK. B) Phase images of PtK2 cells after 1 h post-synchronization seeded on E200 substrate (left panel), on E200 substrate cultured with 50 μg/mL TASC until their fixation (right panel) (bar = 10 μm). C) PtK2 cells seeded on E200 cultured with 50 μg/mL TASC until their fixation at $t = 30$ min (metaphase), $t = 1$ h (telophase) and $t = 4$ h (late-telophase), counterstained with Hoechst (DNA) cells with anti-αv integrin (αv) counterstained with phalloidin (actin), D) Percentage of cells presenting damage in chromosome segregation. 50 fixed cells were analysed for each condition. The percentage was obtained by pooling over the 3 time periods. (black bar with 50 μg/mL TASC until their fixation, results are given as s.e.m for two independent experiments). E) PtK2 cells seeded on E200 with 50 μg/mL TASC until their fixation at $t = 30$ min (metaphase), $t = 1$ h (metaphase) and $t = 4$ h (interphase), counterstained with Hoechst (DNA), cells with anti-α tubulin (α tubulin). (C: metaphase-late-telophase: scale bar = 10 μm), (E: metaphase; interphase: scale bar = 10 μm) (open arrow: chromatide bridge; full arrowhead: αv and actin in cell mid-zone; open arrowhead: disorganized mitotic spindle).

A similar evolution was described previously in which Rac GTP was inhibited at 2 kPa and activated at around 24 kPa [52]. The disappearance of the mitotic spindle at 50 kPa and beyond suggests that the progression through the cell cycle and the interphase entry on low stiffness substrates is strongly impaired. Thus, we next synchronized a collection of cells to follow the onset of replication. 4 h after release of synchronized cells onto E50, DNA replication was inhibited as assessed by the absence of BrdU incorporation (Fig. 5C and D). In contrast, activation of Rac1 becomes efficient onto E200 and glass substrates, leading to vinculin assembly (Fig. S5A), actin fiber formation (data not shown) and, subsequently, to initiation of DNA replication, consistent with our previous results [42]. These observations suggest that soft substrates with a modulus below 50 kPa generate two essential damages i) spindle destructuring, and ii) inhibition of onset of DNA replication.

3.6. β1-integrin inhibition

In an effort to identify whether chromatin bridges and lagging chromosome formation can be attributed to decrease in β1-integrin engagement, we tested the influence of the blocking β1-antibody TASC [53]. To address this point, PtK2 cells were cultured with the blocking β1-antibody TASC at $t = 0$ post-synchronization and the cells were examined 30 min, 1 h and 4 h later. Western blot analysis of total proteins from PtK2 cells confirmed that the TASC specifically inhibits β1-integrin (Fig. 6A, 30 min post-synchronization). In the presence of the blocking β1-antibody, 1 h after culture on the high stiffness substrate E200, PtK2 cells adopted a round shaped morphology compared to the spread cells observed in the absence of the inhibitor (Fig. 6B). When synchronized PtK2 cells are cultured with the blocking β1-antibody and examined 1 h later, the inhibitor induced abnormal morphologies in chromosome segregation materialized in telophase by chromatin bridges (Fig. 6C, telophase). The bloking β1-antibody TASC increased the rate of chromosome segregation anomaly as compared to untreated cells (Fig. 6C and D on E200, and Fig. S5B and S5C on glass), and it destabilised the mitotic spindle (Fig. 6E on E200 and Fig. S5C on glass, open arrowhead). TASC does neither alter αv localization in spindle-like structure in metaphase (Fig. 6C, full arrowhead) nor αv integrin engagement at the cell mid-zone in late-telophase (Fig. 6C, full arrow), nor αv integrin engagement at the cell mid-zone in late-telophase (Fig. 6C, full arrow). These results show that the blocking antibody reducing β1-integrin engagement leads to damage in chromosome segregation as induced by the soft substrate.

3.7. Rac1 inhibition

In an attempt to detect whether inhibition of Rac1 generates also abnormal morphology in the chromosome segregation, PtK2 cells were cultured with the anti-Rac1 inhibitor NSC23766 at $t = 0$

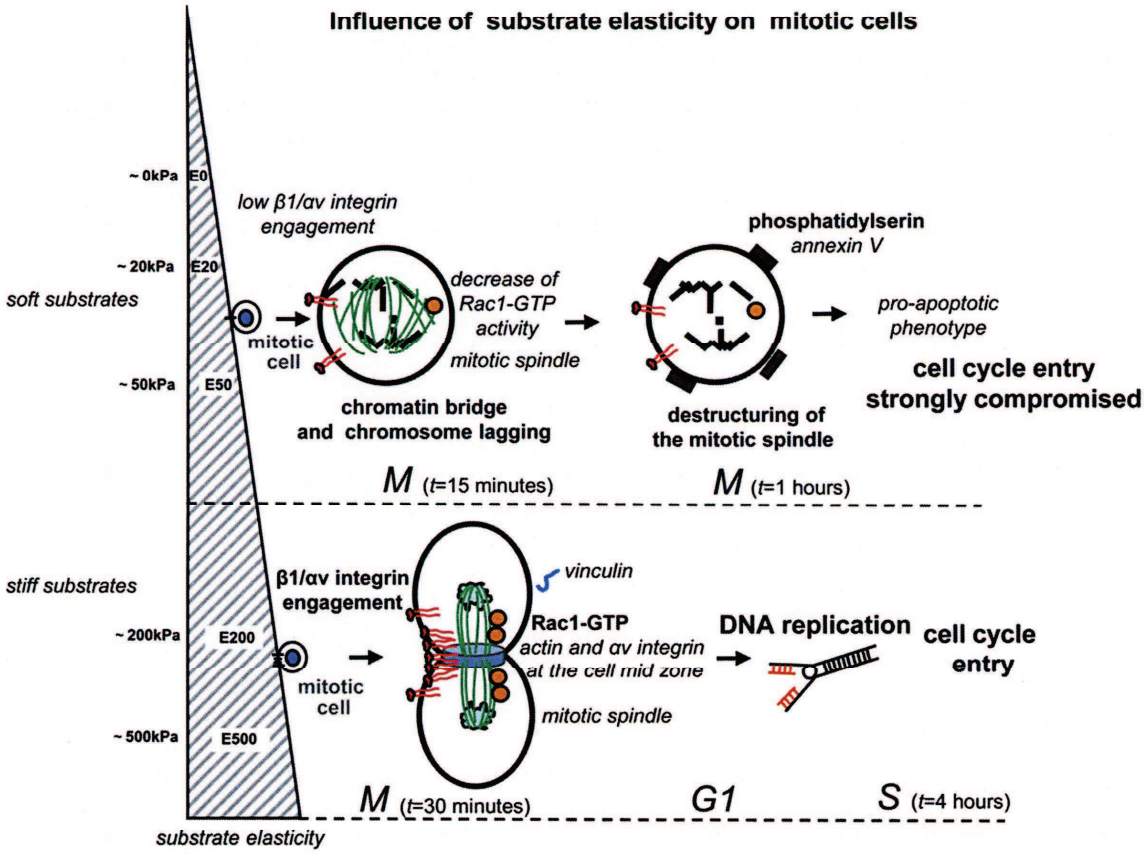


Fig. 7. Cartoon summarizing the influence of the soft substrate during mitosis. Soft substrate below 50 kPa (E50) induces low β1 and αv integrin engagement and the Rac1 activity decrease. Early after the synchronization ($t = 15$ min) chromatin bridges and chromosome lagging are detected. 1 h after the synchronization, the chromatin bridge and chromosome lagging are still visible whereas the mitotic spindle disappeared. The chromosome segregation damages were correlated with pro-apoptotic phenotype. The cell cycle entry was strongly compromised. When the substrate was stiffened at 200 kPa (E200 an above), β1, αv engagement and Rac1 activity are increased. A sequential relationship between Rac1, vinculin adhesion assembly and DNA replication becomes efficient. Concentration of αv integrin and actin at the cell mid-zone becomes efficient above 200 kPa.

post-synchronization and the cells were observed after different time post-synchronization. Interestingly, the anti-Rac1 inhibitor NSC23766 induced abnormal morphology in chromosome segregation (Fig. S6B and S6C on E200 and Fig. S7A on glass, open arrow). The effect of anti-Rac1 inhibitor (NSC23766) strongly suggests that inhibition of Rac1 in mitosis (as for the soft elasticity effect) contributes also to the abnormal morphologies in chromosome segregation. In accordance with our results, abnormal morphologies in chromosome segregation were observed in Drosophila S2 cells when the Gie (a subfamily of the small GTPases) was depleted using RNAi methods. The treated cells frequently failed to separate all their chromatids and remained connected by a thin thread of chromatin [54]. The authors postulated that Gie might serve as a molecular switch to regulate chromosome segregation through the association with microtubules. However, both inhibition either by the integrin β cytoplasmic mutant [27] or by Gie RNAi allowing the entry into S phase do not generate the same drastic effect as those induced by E50. In addition, on E50, αv was not detected in fiber spindle-like structures and the mitotic spindle disappeared. Although TASC or NSC23766 destabilized the mitotic spindle, αv was still detected in the fiber spindle-like structures. The absence of αv in the fiber spindle-like structures could originate from mitotic spindle disappearance due to the E50 soft substrate.

4. Conclusion

The results reported in the previous section are summarized schematically in Fig. 7. Relevant modifications in substrate elasticity were obtained using architectures made of soft $(PLL/HA)_{24}$ strata capped by stiffer $(PSS/PAH)_n$ layers to build matrices with stiffnesses (apparent Young moduli, Eap) in the domain of 0–500 kPa. Until now, the response of cells to mechanical properties of materials has been extensively investigated in interphase cells. For the first time, we demonstrate that substrate elasticity can have a considerable impact on the cell fate particularly when they are in the mitotic phase. Low substrate elasticity (below 50 kPa) induces for PtK2 cells chromosome segregation damages materialized by chromatin bridges and chromosome lagging. These damages were correlated with a pro-apoptotic phenotype. On these substrates formation of chromatin instabilities are due to low integrin engagement and decrease of Rac1 activities. Here, soft substrate hinders epithelial cell-division. A variety of synthetic material niches and tissue-derived matrices are currently in development as vehicles for cell transplantation or cell attraction to a desired anatomic site. Our findings provide new perspectives to identify responses for cells in the mitotic phase and engaged in these different materials, especially for differentiation of stem cells and for cell malignant transformations.

Acknowledgements

We are indebted to Prof. Henri Tenenbaum and Dr Bernard Senger (INSERM U977) for stimulating discussions. The study was supported by Grants from Agence Nationale pour la Recherche (Projet: SUBVACEL ANR-07-TECSAN-022-01) and from Région Alsace (AFM force equipment). L. K. and M. R. are indebted to Faculté de Chirurgie Dentaire of Strasbourg, for financial support. P.L. is indebted to Hôpitaux Universitaires de Strasbourg for financial support.

Appendix. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found online at doi:10.1016/j.biomaterials.2011.10.024.

References

[1] Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K, et al. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. Circ Res 2002;90:40–8.
[2] Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, Cogan TA, et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. Lancet 2008;372: 2023–30.
[3] Hakala H, Rajala K, Ojala M, Panula S, Areva S, Kellomaki M, et al. Comparison of biomaterials and extracellular matrices as a culture platform for multiple, independently derived human embryonic stem cell lines. Tissue Eng Part A 2009;15:1775–85.
[4] Nguyen LH, Kudva AK, Saxena NS, Roy K. Engineering articular cartilage with spatially-varying matrix composition and mechanical properties from a single stem cell population using a multi-layered hydrogel. Biomaterials 2011;32: 6946–52.
[5] Engelhardt EM, Micol LA, Houis S, Wurm FM, Hilborn J, Hubbell JA, et al. A collagen-poly(lactic acid-co-ε-caprolactone) hybrid scaffold for bladder tissue regeneration. Biomaterials 2011;32:3969–76.
[6] Nöth U, Rackwitz L, Steinert AF, Tuan RS. Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration. Adv Drug Deliv Rev 2010;62:765–83.
[7] Slaughter BV, Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas NA. Hydrogels in regenerative medicine. Adv Mater 2009;21:3307–33029.
[8] Fisher OZ, Khademhosseini A, Langer R, Peppas NA. Bioinspired materials for controlling stem cell fate. Acc Chem Res 2010;43:419–28.
[9] Owen SC, Shoichet MS. Design of three-dimensional biomimetic scaffolds. J Biomed Mater Res A 2010;94:1321–31.
[10] Discher DE, Janmey P, Wang YL. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. Science 2005;310:1139–43.
[11] Mitragotri S, Lahann J. Physical approaches to biomaterial design. Nat Mater 2009;8:15–23.
[12] Wang N, Tytell JD, Ingber DE. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. Nat Rev Mol Cell Biol 2009;10:75–82.
[13] Wang P, Bitar KN. Rho A regulates sustained smooth muscle contraction through cytoskeletal reorganization of HSP27. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 1998;275:1454–62.
[14] Wozniak MA, Desai R, Solski PA, Der CJ, Keely PJ. ROCK-generated contractility regulates breast epithelial cell differentiation in response to the physical properties of a three-dimensional collagen matrix. J Cell Biol 2003;163: 583–95.
[15] Vogel V, Sheetz M. Local force and geometry sensing regulate cell functions. Nat Rev Mol Cell Biol 2006;7:265–75.
[16] Engler AJ, Griffin MA, Sen S, Bonnemann CG, Sweeney HL, Discher DE. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. J Cell Biol 2004;166: 877–87.
[17] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. Cell 2006;126:677–89.
[18] Pelham Jr RJ, Wang YL. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:13661–5.
[19] Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. Cancer Cell 2005;8:241–54.
[20] Levental I, Georges PC, Janmey PA. Soft biological materials and their impact on cell function. Soft Matter 2007;3:299–306.
[21] Knoblich JA. Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology. Nat Rev Mol Cell Biol 2010;11:849–60.
[22] Weaver BAA, Cleveland DW. Aneuploidy; inestgator and inhibitor of tumorigenesis. Cancer Res 2007;67:1010310105.
[23] Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA, Fu B, Patel V, et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. Stem Cells 2006;24:1095–103.
[24] Théry M, Racine V, Pépin A, Piel M, Chen Y, Sibarita JB, et al. The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. Nat Cell Biol 2005;10: 947–53.
[25] Fink J, Carpi N, Betz T, Bétard A, Chebah M, Azioune A, et al. External forces control mitotic spindle positioning. Nat Cell Biol 2011;13:771–8.
[26] Théry M, Bornens M. Cell shape and cell division. Curr Opin Cell Biol 2006;18: 648–57.
[27] Reverte CG, Benware A, Jones CW, LaFlamme SE. Perturbing integrin function inhibits microtubule growth from centrosomes, spindle assembly, and cytokinesis. J Cell Biol 2006;174:491–7.
[28] LaFlamme SE, Nieves B, Colello D, Reverte CG. Integrins as regulators of the mitotic machinery. Curr Opin Cell Biol 2008;20:576–82.
[29] Toyoshima F, Nishida E. Integrin-mediated adhesion orients the spindle parallel to the substratum in an EB1- and myosin X-dependent manner. EMBO J 2007;26:1487–98.
[30] Boudou T, Crouzier T, Nicolas C, Ren K, Picart C. Polyelectrolyte multilayer nanofilms used as thin materials for cell mechano-sensitivity studies. Macromol Biosci 2011;11:77–89.
[31] Mertz D, Vogt C, Hemmerlé J, Mutterer J, Ball V, Voegel JC, et al. Mechanostransductive surfaces for reversible biocatalysis activation. Nat Mater 2009;8: 731–5.

[32] Lavalle P, Voegel JC, Vautier D, Senger B, Schaaf P, Ball V. Dynamic aspects of films prepared by a sequential deposition of species: perspectives for smart and responsive materials. Adv Mater 2011;23:1191–221.
[33] Decher G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. Science 1997;277:1232–7.
[34] Hammond PT. Form and function in multilayer assembly: new applications at the nanoscale. Adv Mater 2004;16:1271–93.
[35] Tang ZH, Wang Y, Podsiadlo P, Kotov NA. Biomedical applications of layer-by-layer assembly: from biomimetics to tissue engineering. Adv Mater 2006;18: 3203–24.
[36] Müller S, Koenig G, Charpiot A, Debry C, Voegel JC, Lavalle P, et al. VEGF-functionalized polyelectrolyte multilayers as proangiogenic prosthetic coatings. Adv Funct Mater 2008;18:1767–75.
[37] Thompson MT, Berg MC, Tobias IS, Rubner MF, Van Vliet KJ. Tuning compliance of nanoscale polyelectrolyte multilayers to modulate cell adhesion. Biomaterials 2005;26:6836–45.
[38] Richert L, Boulmedais F, Lavalle P, Mutterer J, Ferreux E, Decher G, et al. Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross linking. Biomacromolecules 2004;5:284–94.
[39] Ren KF, Crouzier T, Roy C, Picart C. Polyelectrolyte multilayer films of controlled stiffness modulate myoblast cell differentiation. Adv Funct Mater 2008;18:1378–89.
[40] Garza JM, Schaaf P, Muller S, Ball V, Stoltz JF, Voegel JC, et al. Multicompartment films made of alternate polyelectrolyte multilayers of exponential and linear growth. Langmuir 2004;20:7298–302.
[41] Francius G, Hemmerle J, Ball V, Lavalle P, Picart C, Voegel JC, et al. Stiffening of soft polyelectrolyte architectures by multilayer capping evidenced by visco-elastic analysis of AFM indentation measurements. J Phys Chem C 2007;111: 8299–306.
[42] Kocgozlu L, Lavalle P, Koenig G, Senger B, Haikel Y, Schaaf P, et al. Selective and uncoupled role of substrate elasticity in the regulation of replication and transcription in epithelial cells. J Cell Sci 2010;123:29–39.
[43] Varmark H, Sparks CA, Nordberg JJ, Koppetsch BS, Theurkauf WE. DNA damage-induced cell death is enhanced by progression through mitosis. Cell Cycle 2009;8:2951–63.
[44] Norbury CJ, Zhivotovsky B. DNA damage-induced apoptosis. Oncogene 2004; 23:2797–808.
[45] Streuli CH. Integrins and cell-fate determination. J Cell Sci 2009;122: 171–7.
[46] Danen EH, Rheenen JV, Franken W, Huveneers S, Sonneveld P, Jalink K, et al. Integrins control motile strategy through a Rho-cofilin pathway. J Cell Biol 2005;169:515–26.
[47] Albertson R, Cao J, Hsieh TS, Sullivan W. Vesicles and actin are targeted to the cleavage furrow via furrow microtubules and the central spindle. J Cell Biol 2008;181:777–90.
[48] Pellinen T, Tuomi S, Arjonen A, Wolf M, Edgren H, Meyer H, et al. Integrin trafficking regulated by Rab21 is necessary for cytokinesis. Dev Cell 2008;15: 371–85.
[49] Wei WC, Lin HH, Shen MR, Tang MJ. Mechanosensing machinery for cells under low substratum rigidity. Am J Physiol Cell Physiol 2008;295: 1579–89.
[50] Mitsushima M, Toyoshima F, Nishida E. Dual role of cdc42 in spindle orientation control of adherent cells. Mol Cell Biol 2009;29:2816–27.
[51] Yoshizaki H, Ohba Y, Kurokawa K, Itoh RE, Nakamura T, Mochizuki N, et al. Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. J Cell Biol 2003;162:223–32.
[52] Klein EA, Yin L, Kothapalli D, Castagnino P, Byfield FJ, Xu T, et al. Cell-cycle control by physiological matrix elasticity and in vivo tissue stiffening. Curr Biol 2009;19:1511–8.
[53] Neugebauer KM, Reichardt LF. Cell-surface regulation of β_1-intergin activity on developing retinal neurons. Nature 1991;350:68–71.
[54] Okai T, Araki Y, Tada M, Tateno T, Kontani K, Katada T. Novel small GTPase subfamily capable of associating with tubulin is required for chromosome segregation. J Cell Sci 2004;117:4705–15.

3.3 Résumé

Les résultats montrent que les substrats mous (modules inférieurs à 50 kPa) génèrent des anomalies de ségrégation des chromosomes matérialisées par des ponts de chromatine et par la perte de chromosomes. La fréquence de ces anomalies augmente avec la diminution de la rigidité du substrat et est corrélée avec un phénotype pro-apoptotique (phosphatidylsérine exposée à l'extérieur de la membrane plasmique, cellules positives à l'annexine V). Le fuseau mitotique n'est pas observé sur les substrats mous. Nos résultats révèlent que les substrats rigides induisent une activation des intégrines-β1 alors que cette activité diminue progressivement sur les substrats mous. La localisation de l'intégrine-αv dans le fuseau mitotique nécessite un substrat de module *E* supérieur à 50 kPa. Le transport de l'intégrine-αv du fuseau mitotique au site de cytokinèse est un mécanisme probablement impliqué dans l'adhésion de la cellule en mitose dans la région qui sépare les deux cellules filles. En effet, Pellinen et al. ont récemment montré que l'accumulation des intégrines dans cette région permet un ancrage mécanique de l'anneau contractile d'actomyosine à la MEC, indispensable pour le processus de cytokinesis (Pellinen *et al.* 2008). L'expression de la protéine Rac 1 a été ensuite mesurée par Western-blot sur des cellules mitotiques en contact avec des substrats de rigidité décroissante. L'expression de Rac 1 ainsi que la forme Rac 1-GTP diminuent significativement sur les substrats mous (diminution de 50% sur substrats mous comparés aux substrats rigides). Une diminution similaire de Rac GTP sur substrats mous a été également décrite par Klein et al. (Klein *et al.* 2009). Finalement, des expériences d'inhibition de l'intégrine-β1 et de la protéine Rac 1 suggèrent que la formation des anomalies est liée au faible engagement des intégrines-β1 ainsi qu'à une diminution de l'activité Rac 1. En conclusion, ce travail montre que les substrats mous constituent une barrière physique qui empêche la progression en mitose des cellules épithéliales PtK2. Sur ces substrats, les cellules portant des fautes de ségrégation chromosomique, incapables de progresser en mitose, ne présentent donc pas un risque de transformation tumorale. Ces résultats amènent les perspectives suivantes : 1) Quantifier les forces qu'une cellule en mitose doit fournir pour effectuer correctement sa cytokinèse sur des substrats d'élasticité décroissantes. Ces analyses pourraient être réalisées sur nos substrats par microscopie à force de traction (Munevar *et al.* 2001). 2) Identifier les réponses de cellules tumorales en cours de division et engagées dans la

séquence maligne. Ce nouvel aspect constitue la deuxième partie de ma thèse (cf. chapitre 4).

Chapitre 4 :

Contribution of soft substrates to malignancy and tumor suppression during colon cancer cell division

4 Contribution of soft substrates to malignancy and tumor suppression during cancer cell division

4.1 Introduction

Une littérature abondante relate l'importance de l'élasticité des tissus biologiques dans la transformation maligne des cellules tumorales. A titre d'exemple, les travaux de l'équipe de Valerie Weaver, directrice du Centre de bio-ingénierie et de régénération tissulaire à l'université de Philadelphie, ont clairement montré le rôle de la rigidité des tissus dans la progression tumorale et la malignité des tumeurs (Paszek *et al.* 2005). Son équipe a observé que les tissus tumoraux et leur stroma adjacent sont nettement plus rigides que les tissus sains. Après avoir cultivé des cellules mammaires sur des gels de polyacrylamide de différentes élasticités, ces auteurs ont constaté que sur des substrats rigides les cellules adoptent des propriétés malignes et leur prolifération augmente. Ce phénomène s'explique par la rigidification de la MEC qui s'étend au cytosquelette et induit un « *clustering* » des intégrines. Des forces de tension sont capables de se propager dans la cellule et d'activer des protéines RhoGTPases et protéines ERK permettant l'augmentation de la contractilité cellulaire. Parallèlement, les tissus mous favorisent également le phénotype tumoral. En effet, Liu et al. ont montré que des cellules cancéreuses cultivées *in vitro,* dans des matrices de fibrine tridimensionnelle de faible élasticité, génèrent des colonies cellulaires sphériques. Après la réalisation d'une xénogreffe de ces colonies dans des souris immunodéficientes, leur agressivité a été fortement augmentée comparée à des cellules cancéreuses directement implantées dans les souris (Liu *et al.* 2012). Très récemment, Tang et al. ont révélé que des cellules tumorales sont moins « mécano-sensibles » au contact de substrats mous, contrairement au contact des substrats rigides (Tang *et al.* 2012).

Au cours du processus de transformation maligne des cellules épithéliales du côlon humain, des cellules cancéreuses quittent la membrane basale pour entrer dans la circulation sanguine. Lorsque les cellules métastatiques quittent leur milieu d'origine, la grande majorité d'entre elles est éliminée au contact d'environnements physiques beaucoup plus mous. Par exemple, au cours de leur dissémination, ces cellules rencontrent la membrane basale de 175 Pa, le stroma de 918 Pa, la lymphe de 320 Pa,

les ganglions lymphatiques de 120 Pa et le foie de 640 Pa (Paszek *et al.* 2005; Levental *et al.* 2007). Pendant cette dissémination, une très faible proportion de cellules tumorales s'échappe de ces barrières mécaniques en générant des métastases. Dans la première partie de ma thèse, j'ai montré que des substrats mous constituent une barrière physique qui empêche la progression en mitose des cellules épithéliales PtK2. Le nouvel aspect que j'aborde dans cette deuxième partie est de déterminer si ces mêmes substrats mous sont capables de bloquer la progression en mitose de cellules tumorales du cancer du côlon SW480. La division cellulaire est ici suivie par vidéomicroscopie à partir de populations de cellules SW480 synchronisées mécaniquement en mitose. Quelques évènements clefs de la mitose sont analysés par immunocytochimie tels que l'engagement des intégrines-β1 (fortement exprimé dans les cellules épithéliales du côlon (Stallmach *et al.* 1992), la présence du fuseau mitotique de microtubules, et l'activité de réplication de l'ADN montrant l'entrée des cellules en interphase.

4.2 Article

Contribution of Soft Substrates to Malignancy and Tumor Suppression during Colon Cancer Cell Division

Morgane Rabineau[1,2,7], Leyla Kocgozlu[1,2¤], Denis Dujardin[3], Bernard Senger[1,2,7], Youssef Haikel[1,2,7], Jean-Claude Voegel[1,2,7], Jean-Noel Freund[5,6,7], Pierre Schaaf[1,2,4,7], Philippe Lavalle[1,2,7], Dominique Vautier[1,2,7*]

1 Inserm UMR 1121, Strasbourg, France, **2** Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, Strasbourg, France, **3** CNRS, UMR 7213, Illkirch, France, **4** CNRS, UPR 22, Institut Charles Sadron, Strasbourg, France, **5** Inserm UMR S1113, Université de Strasbourg, Strasbourg, France, **6** Université de Strasbourg, Faculté de Médecine, Strasbourg, France, **7** Fédération de Médecine Translationnelle, Strasbourg, France

Abstract

In colon cancer, a highly aggressive disease, progression through the malignant sequence is accompanied by increasingly numerous chromosomal rearrangements. To colonize target organs, invasive cells cross several tissues of various elastic moduli. Whether soft tissue increases malignancy or in contrast limits invasive colon cell spreading remains an open question. Using polyelectrolyte multilayer films mimicking microenvironments of various elastic moduli, we revealed that human SW480 colon cancer cells displayed increasing frequency in chromosomal segregation abnormalities when cultured on substrates with decreasing stiffness. Our results show that, although decreasing stiffness correlates with increased cell lethality, a significant proportion of SW480 cancer cells did escape from the very soft substrates, even when bearing abnormal chromosome segregation, achieve mitosis and undergo a new cycle of replication in contrast to human colonic HCoEpiC cells which died on soft substrates. This observation opens the possibility that the ability of cancer cells to overcome defects in chromosome segregation on very soft substrates could contribute to increasing chromosomal rearrangements and tumor cell aggressiveness.

Citation: Rabineau M, Kocgozlu L, Dujardin D, Senger B, Haikel Y, et al. (2013) Contribution of Soft Substrates to Malignancy and Tumor Suppression during Colon Cancer Cell Division. PLoS ONE 8(10): e78468. doi:10.1371/journal.pone.0078468

Editor: Thomas Claudepierre, Faculty of Medicine University of Leipzig, Germany

Received April 15, 2013; **Accepted** September 13, 2013; **Published** October 22, 2013

Copyright: © 2013 Rabineau et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The study was supported by a grant from Alsace Contre le Cancer. M.R. is indebted to the Faculté de Chirurgie Dentaire of Strasbourg for financial support. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: vautier@unistra.fr

¤ Current address: Mechanobiology Institute, National University of Singapore, Singapore, Singapore

Introduction

Over the last 10 years, it has become evident that cell behaviour not only depends on chemical cues but that mechanical properties of cellular environment play an as important role. This was spectacularly demonstrated by the landmark experiments of Discher's group who showed that mesenchymal stem cells can either differentiate into osteoblasts, fibroblasts or neurons depending upon the Young modulus of the adhesion substrate [1]. It is also well accepted that different cell types need substrates of different Young moduli to properly adhere and proliferate. Osteoblasts require Young moduli in the range of MPa to adhere whereas fibroblasts adhere on softer substrates whose moduli of about 10 kPa [2] and neurons grow on extremely soft substrates of about 1 kPa [1]. These distinctive values are in accordance to the Young moduli that characterize the tissues surrounding these different cell types. These results are of paramount importance for example in tissue engineering to design scaffolds allowing an appropriate growth of cells or in implant integration. Yet adhesion is not the only aspect that characterizes the cell behaviour: cell division is also a crucial aspect for cell fate. Our group started recently to examine the influence of the mechanical properties of the substrate on cell division [3]. These data highlighted that the mechanical properties of the substrate play a critical role in chromosome segregation during mitosis of epithelial cells. Indeed, we observed a progressive increase in chromosomal segregation abnormalities with decreasing substrate stiffness in non-cancerous rat kangaroo kidney cells PtK2 [3]. Moreover, soft substrates (below 50 kPa) were described as a physical microenvironment barrier almost completely inhibiting the PtK2 cells [3].

Over the last years, it has been established that tissue stiffness influences tumor progression and can promote the malignant behaviour [4-6]. By introducing cancer cells into 3-dimensional fibrin matrices, Liu et al. showed that soft matrices of Young modulus about 100 Pa promoted the growth of round colonies with increasing aggressiveness when xenografted in immunodeficient mice [7]. Very recently, Tang et al. revealed

the attenuation of cell mechanosensitivity of tumor cells when cultured on soft substrates [8]. In colon cancer, a highly aggressive disease, progression through the malignant sequence is accompanied by increasing chromosomal rearrangements [9-12]. To colonize target organs, invasive cells cross several tissues of various elastic moduli (as example, 175, 918, 320, 120 and 640 Pa for basement membrane, stroma, lymph, lymph node and liver, respectively) [2,4] and, while most of these cells die during their journey, few resist and can generate metastases [13]. Whether soft tissue increases malignancy or in contrast limits invasive cell spreading remains an open question. Using polyelectrolyte multilayers films (PEM) [14-18], we revealed that human SW480 colon cancer cells displayed increasing frequency in chromosomal segregation abnormalities when cultured on substrates with decreasing stiffness (Figure 1) and [3]. In the present paper, we report that substrates with stiffness of 50 kPa and lower cause massive death of mitotic cells but that few cells resist and achieve mitosis by overcoming abnormal chromosomal segregation. For this purpose, synchronized SW480 cells were seeded on a series of films made of a poly-L-lysine/hyaluronic acid $(PLL/HA)_{24}$ stratum capped by poly(styrene) sulfonate/polyallylamine $(PSS/PAH)_n$ strata (n = 0, 1 and 2; increasing n increases substrate stiffness [19]) and followed by live-cell imaging.

Results and Discussion

1. Influence of soft substrate on the tumor mitotic progression

To determine whether tumor cells are able to progress through mitosis on very soft substrates, SW480 cells, synchronized using the mitotic shake-off method, were seeded on PEM films with decreasing stiffness (Young moduli decreasing from 50 down to 0 kPa, Table 1) and followed by live-cell imaging during 2h30. The films were composed of a $(PLL/HA)_{24}$ stratum capped by a second $(PSS/PAH)_n$ stratum (n = 0, 1 and 2). A typical example of confocal z-section observation of a film composed of PLL/HA stratum and PSS/PAH capping is displayed in Figure 2. Even though the surface chemistry of glass and of the polyelectrolyte multilayers is different, we demonstrated in a previous work that the amount of FBS proteins deposited on the surface does depend neither on the surface chemistry nor on the number of layers constituting the polyelectrolyte multilayers film [16]. Moreover, cells feel essentially the proteins from the serum that adsorb on the surface prior to cell deposition. Thus the main parameter that changes between glass, E0 and E50 / E20 is rigidity and it should be at the origin of the differences in cell behaviour observed in our system. On E_0, cells rapidly went through a lytic process, as indicated by the release of cytoplasm in the culture medium observed in 100% of the cases (Figure 3A, arrowhead in row E_0, Movie S1). However, on E_{50} and E_{20} substrates, the follow up of chromosome segregation, DNA decondensation and cytokinesis (Figure 3A and Movie S2-S4) revealed that respectively 60% and 10% of cells were able to achieve mitosis in 2h30 (Figure 3C). The remaining cells either lyse (18% on E_{50} and 88% on E_{20}) or kept blocked in mitosis

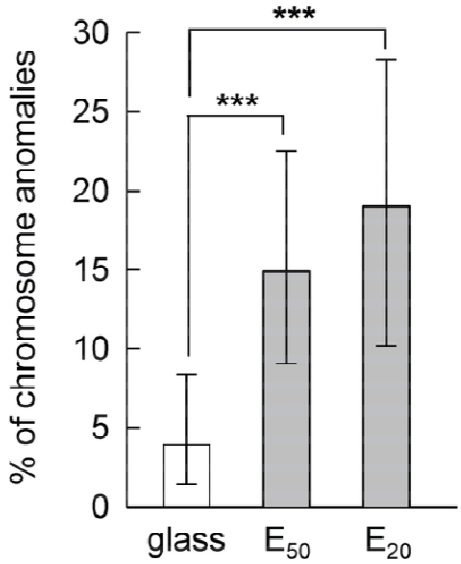


Figure 1. Percentage of SW480 cells 30 min-2h post-synchronization from fixed cells presenting abnormal chromosome morphologies on glass, E_{50} and E_{20}, determined on 2 pooled independent experiments. Fisher Exact Test shows the proportion on E_{50} (18 cells with chromosome anomalies on 121 cells analyzed) is significantly different than that on glass (6/153, $p < 0.003$), and the proportion on E_{20} (14/78) is significantly different than that on glass ($p < 0.001$). The errors bars represent 95% confidence intervals.

doi: 10.1371/journal.pone.0078468.g001

(22% on E_{50}, and 2% on E_{20}). Tilghman et al. showed that cancer cells cultured on soft polyacrylamide gel substrates exhibited a longer cell cycle, due to an extension of the G1 phase of the cell cycle, compared to cancer cells growing on more stiff substrates [20]. In order to demonstrate that the significant proportion of SW480 cells able to progress in mitosis on E_{50} was related to the cancerous nature of these cells, their behavior were compared to those of the non-cancerous human colonic epithelial cells HCoEpiC. Production of mitotic HCoEpiC cells by mechanical shakeoff was greatly reduced. Thus, standard asynchronous HCoEpiC cell cultures were used to investigate the influence of E_{50} on human colonic epithelial cells. The results show that after 6h of culture on E_{50}, asynchronized HCoEpiC cells adopted a round shaped morphology (Figure 4A) unlike the spread shape of these cells observed on glass (Figure 4A). On E_{50}, HCoEpiC cells went through a lytic process, as indicated by the release of cytoplasm in the culture medium in 100% of the cases (Figure 4A). Some of these cells showed fragmentation of their nucleus suggesting death by apoptosis (Figure 4C). Consistent with

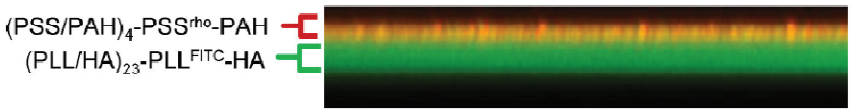


Figure 2. PEM characterization. Vertical section image of a $(PLL/HA)_{23}$-PLL^{FITC}-HA-$(PSS/PAH)_2$-PSS^{Rho}-PAH multilayered film observed by CLSM.
doi: 10.1371/journal.pone.0078468.g002

these observations, no assembly of microtubules and actin filaments could be observed by immunofluorescence experiments using antibody specific for α-tubulin and phalloidin (Figure 4C). All interphase HCoEpicC cells died on E_{50} (Figure 4B) revealing that these cells are obviously unable to progress in the cell cycle and to re-enter in mitosis. We can point out that our studies were performed on substrates with Young moduli in the range of 1-50 kPa and we observed that non-cancerous cells could not survive on such soft substrates. This result seems at first sight contradictory with the observation of cell division in colon whose Young modulus is 2 - 25 kPa [21]. Yet, in colon cells are in a specialized 3D tissue with cell/cell contacts which strongly influence cell behaviour. Such an effect is not reproduced in our 2D in vitro experiments. Nevertheless, our in vitro model is more appropriate for single tumour cells or small groups of cells that escape the tumour mass to invade the stroma and engage in the process leading to metastasis formation after a long journey through tissues of very different Young moduli. Altogether, our results show that the decrease of the stiffness correlates with an increase in cell lethality in vitro for healthy as well as cancerous cells. Nonetheless, very importantly, we observed that some cancer cells can escape from very soft substrates and can achieve mitosis. These findings are highly relevant for both normal homeostasis of solid tissues and for pathological settings.

2. Behavior of tumor cells bearing chromosome segregation abnormalities

Time-lapse monitoring chromosome segregation showed that SW480 cells seeded on E_{50} and on E_{20} displayed lagging chromosomes (Figure 3B, arrows) indicating defects in chromosomal segregation mechanisms. In late telophase, the nuclei reformed and cytokinesis completed (Figure 3B, 3D and Movie S5 and S6). Among the SW480 cells progressing through mitosis 4.8%, 11% and 13% showed chromosome segregation abnormalities on glass, E_{50} and E_{20}, respectively. These results showed that despite increasing frequency of abnormalities induced by soft substrates, some SW480 cancer cells are able to progress through mitosis. Which is consistent with observation made on rigid substrates that cells having deficient spindle checkpoint mechanisms may proceed through mitosis even in the presence of chromosomes misconnected to the spindle [22].

Table 1. Apparent elastic modulus of $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_n$ with n = 1 and 2.

Architecture	E_{ap} (kPa)[a]	Notation
$(PLL/HA)_{24}$	~0	E_0
$(PLL/HA)_{24}$ – $(PSS/PAH)_1$	~20	E_{20}
$(PLL/HA)_{24}$ – $(PSS/PAH)_2$	~50	E_{50}

The films were composed of a hyaluronic acid/poly-L-lysine $(HA/PLL)_{24}$ stratum capped by a second poly(styrene) sulfonate/polyallylamine hydrochloride $(PSS/PAH)_n$ stratum. The films were characterized by their Young's modulus (E_{ap}: apparent elastic modulus), determined by atomic force microscopy nano indentation experiments, which would correspond to the real elastic modulus of the layer if it behaved strictly elastically. The elastic modulus of the native $(PLL/HA)_{24}$ architecture is about 0 kPa. [a] Values taken from [19].
doi: 10.1371/journal.pone.0078468.t001

3. The β1-integrin engagement by mitotic tumor cells in response to soft substrates

Interactions with the extracellular matrix through integrins have been shown to influence different aspects of mitotic spindle organization [23,24]. In particular, it is well known that mitotic cells become rounded in preparation for cytokinesis and remain attached to the substrate through retraction fibres via integrin engagement [25]. The retraction fibres provide resistive force that propagates within microtubules to orient the mitotic spindle [23-26]. We thus investigated the effects the different substrate stiffness on β1-integrin in SW480 cells. In response to soft substrates (E_{50} and E_{20}), β1-integrin engagement measured by ligand-induced binding sites (activated β1-integrin LIBS) using conformational-specific antibodies was unchanged compared to glass substrate (Figure 5A-C, the MAPK lane correspond to control loading). Interestingly, these data are in contrast with a previous study using non-tumor PtK2 cells showing progressively decreases of β1-integrin engagement on soft substrates [3]. These observations are in accordance with other studies demonstrating that murine breast cancer cells retain high levels of active β1-integrin after 24h of culture on a soft substrate [27]. Integrin accumulation in the cell mid-zone is also necessary to induce mitotic cell adhesion and to support cytokinesis by providing mechanical anchoring for the contractile actomyosin ring [28]. To examine the localization of β1-integrin, immunofluorescence performed in cells in telophase revealed β1-integrin accumulation in the mid-body, on E_{50} and on E_{20}, like on glass (Figure 5D). On glass, E_{50} and

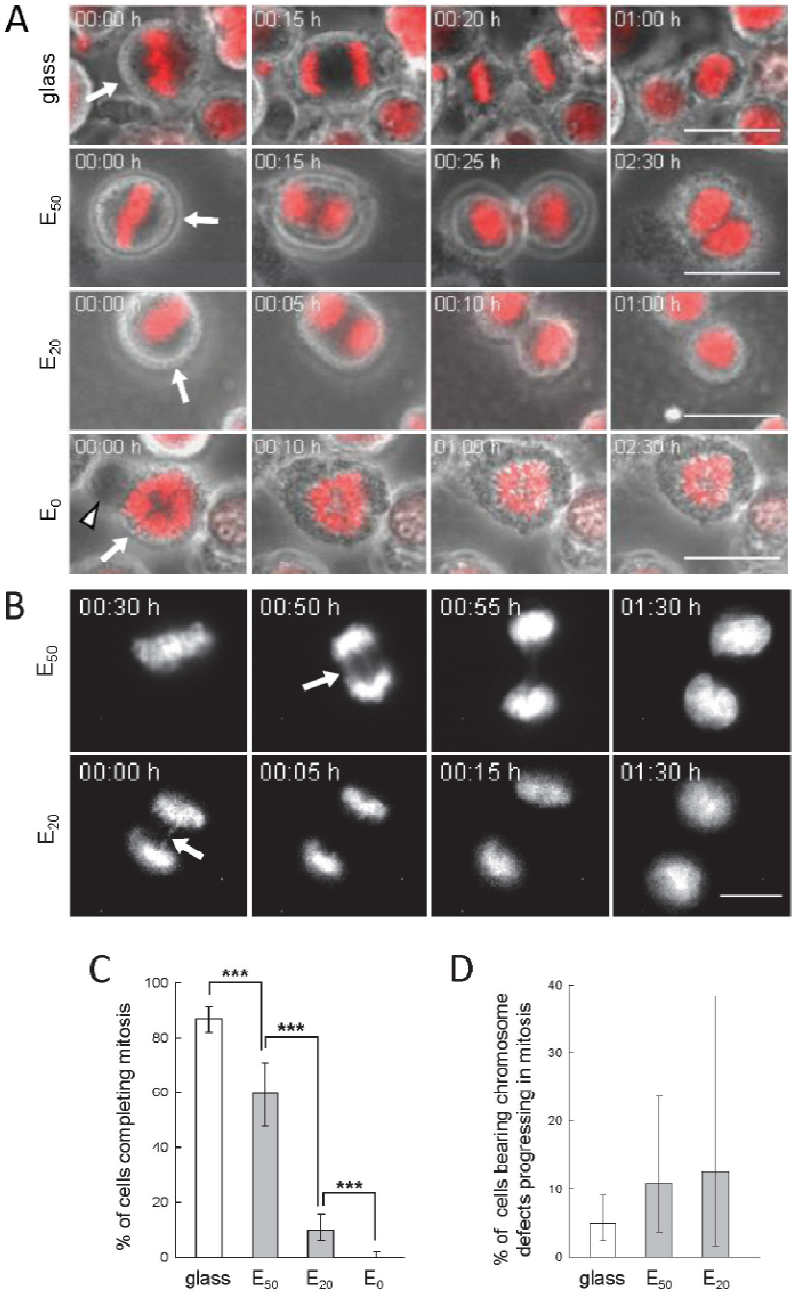


Figure 3. SW480 cells progression through mitosis with respect to elastic moduli of the substrate. A) After seeding of synchronized SW480 cells on glass, E_{50}, E_{20} and E_0, time-lapse image were taken every 5 min for 2h30; representative images are shown. Arrow indicates the initial position of the mitotic cell. Merged images of fluorescence (DNA in red) and phase contrast (in gray); scale bar: 20 µm. B) Time-lapse monitoring chromosome segregation in SW480 cells performed as described in A. Representative images of chromosome segregation abnormalities are displayed for E_{50} and E_{20}; scale bar : 10 µm. C) Percentage of SW480 cells completing mitosis considered in A, determined on 2 pooled independent experiments. Fisher Exact Test shows that the proportion of cells completing mitosis on E_{50} (46 cells on 77 cells in mitosis) is significantly smaller from the proportion on glass (185/212, $p < 0.001$). The proportion on E_{20} (16/161) is significantly smaller than that on E_{50} ($p < 0.001$) and the proportion on E_0 (0/146) is significantly smaller than that on E_{20} ($p < 0.001$). D) Percentage of cells with lagging chromosomes. In C, D, the error bars represent 95% confidence intervals.

doi: 10.1371/journal.pone.0078468.g003

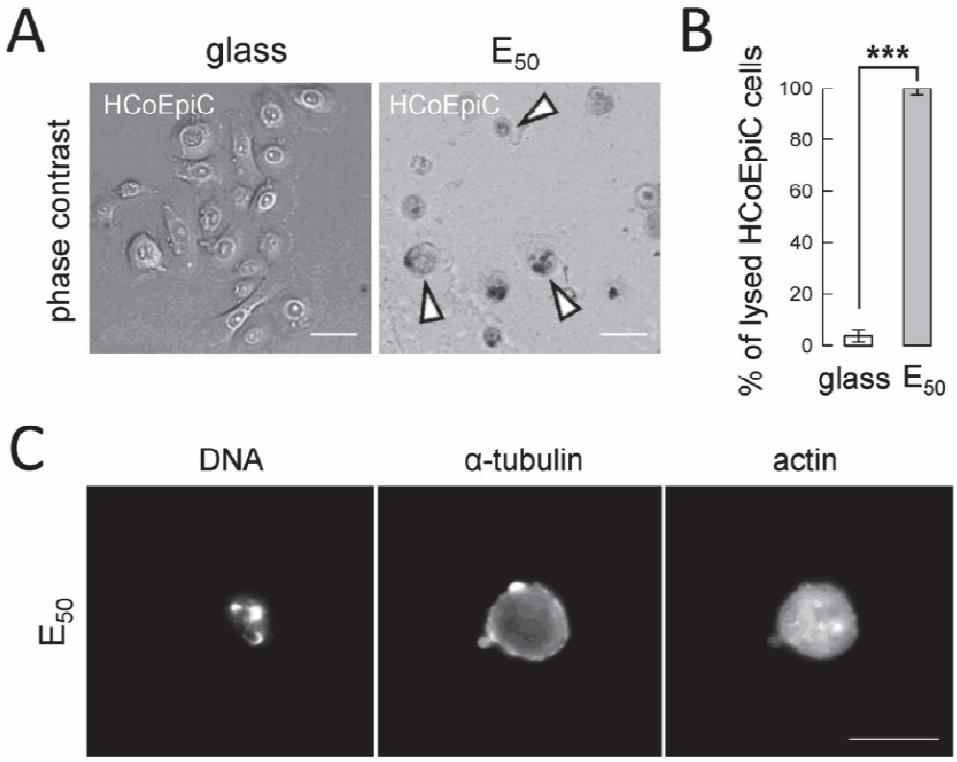


Figure 4. Behavior of asynchronous HCoEpiC cells on E_{50}. A) Representative images of HCoEpiC cells after 6h of culture on glass and on E_{50}, arrowhead indicates a lysed cell; scale bar: 50 µm. B) Percentage of lysed HCoEpiC cells considered in A, determined on 2 pooled independent experiments. Fisher Exact Test shows proportion of lysed cells on glass (5/142) is significantly smaller than that on E_{50} (112/112, $p < 0.001$). The error bars represent 95% confidence intervals. C) Fluorescence images of DNA, α-tubulin and actin after 6h of culture on E_{50} from fixed HCoEpiC cells; scale bar: 20 µm.
doi: 10.1371/journal.pone.0078468.g004

E_{20} actin accumulated also in this cell mid-zone (Figure 5D). These results suggest continuous β1-integrin engagement during mitosis despite the soft substrates, compatible with the involvement to support cytokinesis.

4. Mitotic spindle organization of tumor cells in response to soft substrates

We next checked mitotic spindle assembly on soft matrices by immunofluorescence with anti-α-tubulin and DNA staining with Hoechst. The mitotic spindles of SW480 cells, visible on stiff substrates (glass), were preserved on E_{50} and even on E_{20} (Figure 6A and B). This result contrasts with that observed for non-cancerous mitotic PtK2 cells seeded on soft matrix since for Young modulus ≤ 50 kPa, the mitotic spindle could not be observed [3]. Consistent with our living cell analysis (Figure 3B and D), abnormal chromosome segregation events could be observed (Figure 6B and D), however, without evidence for multipolar or monopolar spindles on the different substrates probably due to β1-integrin engagement maintained on the very soft substrate. Indeed, multipolar spindles were observed for cells bearing mutated β1-integrin [23].

5. Rac1 expression of tumor cells in response to soft substrates

Rac1, proteins of the small GTPase Ras family, are involved in the orientation of the mitotic spindle and its activity increases at the plasma membrane of polar sides during cytokinesis [29]. We further synchronized a collection of SW480 cells and analyzed Rac1 expression through Western blot experiments [29]. There were no differences in Rac1 expression for mitotic SW480 cells seeded either on soft substrates (E_{50} and E_{20}) or on stiff substrate (glass) (Figure 7A-C). Our results showed that mitotic tumor SW480 cells maintain Rac1 expression on soft substrates. On the contrary, we previously observed that non-cancerous PtK2 cells progressively decreases this expression on soft substrates [3]. Importantly, β1-integrin engagement and Rac1 expression maintained on soft substrates (E_{50}, E_{20}) were not sufficient to allow massive division of tumor SW480 cells.

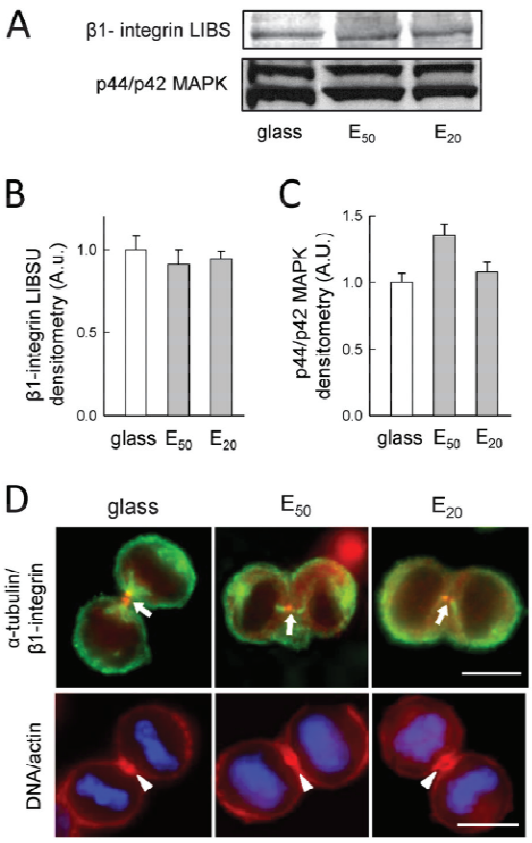


Figure 5. β1-integrin engagement of mitotic SW480 cells with respect to soft substrates. A) Western blots of β1-integrin LIBS and MAPK protein for SW480 cells seeded 30 min post-synchronization on glass, E_{50} and E_{20}. Histogram shows the corresponding scans from B) β1-integrin LIBS and C) p44/p42 MAPK control loading. Representive results from 2 independent experiments (the error bars represent the s.e.m.; an arbitrary value of 1 was attributed to the mean value corresponding to cells on glass). D) α-tubulin and β1-integrin distribution 30 min post-synchronization on glass, E_{50} and E_{20} from fixed SW480 cells, superposition of cells with anti-α-tubulin (green) and anti-β1-integrin (red) (α-tubulin/ β1-integrin). Arrow indicates a fine point of β1-integrin concentrated on the mid-body. Representative images are shown for 2 independent experiments for a total of 10 cells for each condition; scale bar : 10 µm. On glass, E_{50} and E_{20} from fixed SW480 cells, superposition of cells with DNA (blue) and actin (red) (DNA/actin). Arrowhead indicates actin accumulation in the cell mid-zone. Representative images are shown for 2 independent experiments for a total of 10 cells for each condition; scale bar: 10 µm.

doi: 10.1371/journal.pone.0078468.g005

Indeed, on these substrates only 60% (E_{50}) and 10% (E_{20}) of cells are able to progress in mitosis

6. DNA replication activity of tumor cells in response to soft substrates

To determine whether SW480 cells that were able to progress through mitosis were capable of reenter cell cycle, we investigated their capability to undergo DNA replication 4h after being seeded on different substrates. SW480 cells seeded on E_{50} and E_{20} show site of replication uniformly distributed in the nucleus (Figure 8A) with respectively 60% and 23% of cells with nuclear BrdU signal (Figure 8B). It is noteworthy that the percentages of SW480 cells incorporating BrdU correlated with the percentage of cells achieving mitosis on E_{50} and E_{20} (Figures 3C and 8B), suggesting that SW480 cells able to complete chromosome segregation on soft substrates are further able to undergo a new cycle of DNA replication.

Conclusion

In conclusion, we report that despite massive cell death on extremely soft substrates (E_0), tumor cells like the SW480 colon cancer cells, even when bearing abnormal chromosome segregation, resist to the very soft substrates (E_{20} and E_{50}) and achieve mitosis. These findings might be highly relevant for the pathophysiology of cancer and the dissemination of colon tumor cells. Indeed, their cancerous nature at least some of the tumor cells might help them to overcome chromosomal segregation abnormalities linked to the change in substrate stiffness and therefore escape the soft substrates to pursue their journey up to the site of metastasis formation. Moreover, this ability to overcome segregation abnormalities could result in more chromosomal rearrangements, which may contribute to increasing tumor cell aggressiveness. Further investigating the response of tumor cells to physical environmental changes may help to identify new potential targets for anticancer therapy.

Materials and Methods

1. Materials and fabrication of PEM

PLL (MW = 5.7 x 10^4 Da, Sigma, St. Quentin Fallavier, France) and HA (MW = 4.0 x 10^5 Da, Biolberica, Barcelona) were used for buildup $(PLL/HA)_{24}$ films, and PSS (MW = 7.0 x 10^4 Da, Sigma, St. Quentin Fallavier) and PAH (MW = 7.0 x 10^4 Da, Sigma) for $(PSS/PAH)_n$ capping films (*n* corresponds to the number of layer pairs), which were deposited on top of $(PLL/HA)_{24}$ strata. PLL, HA, PSS, and PAH were dissolved at 1 mg/mL in a buffer solution containing 150 mM NaCl and 20 mM of tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS, Merck) at pH 7.4, and all rinsing steps were performed in the same buffer. $(PLL/HA)_{24}$ strata and $(PSS/PAH)_n$ capping films were prepared using a dipping machine (Dipping Robot DR3, Riegler & Kirstein GmbH, Berlin, Germany), on glass slides (VWR Scientific, Fontenay sous Bois, France). The rigidity of the $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_n$ film increases with the number of deposited PSS/PAH layer pairs (Table 1) [19]. The short hand

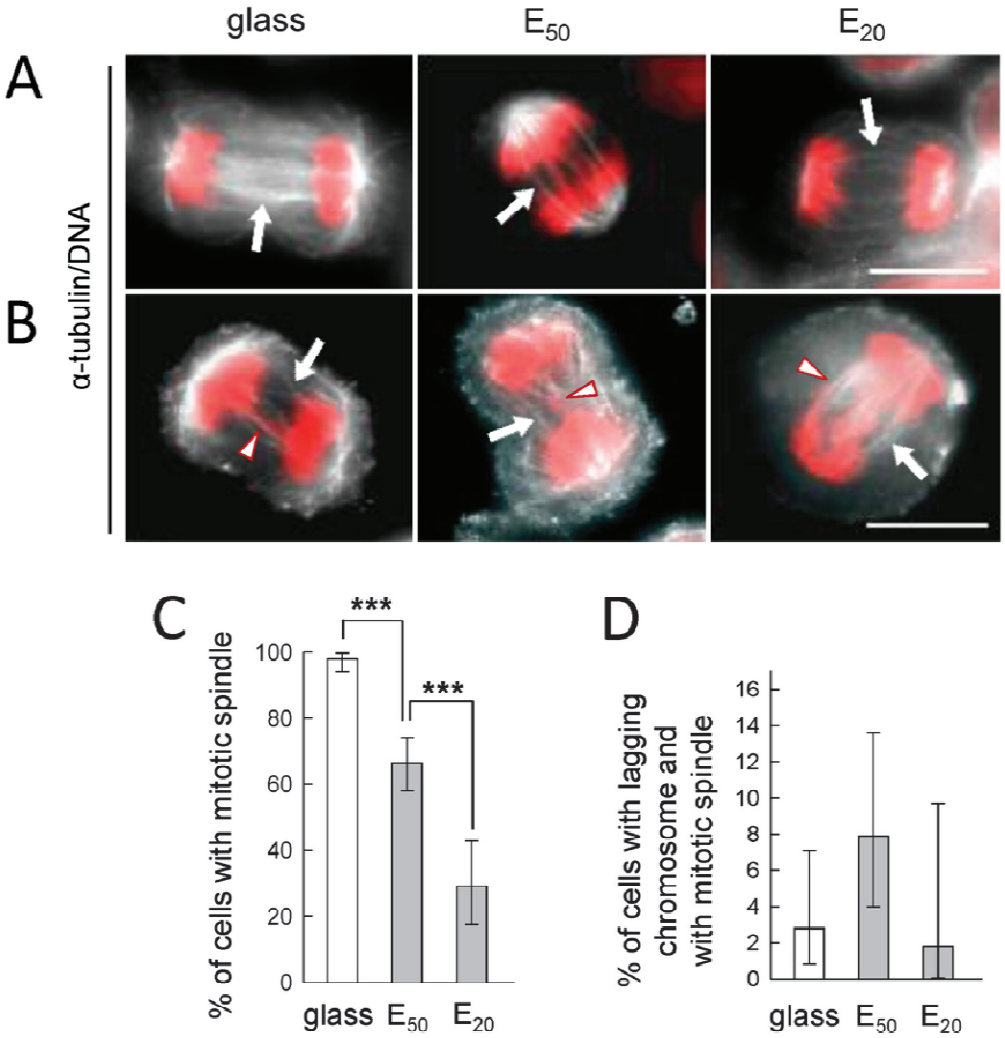


Figure 6. Mitotic spindle organization with respect to soft substrates. SW480 cells 30 min-2h post-synchronization on glass, E_{50} and E_{20} from fixed cells. Images are superimposed with anti-α-tubulin (white) and Hoechst for DNA (red) (α-tubulin/DNA). Arrow indicates the mitotic spindle, without anomaly (A), with anomaly (B), arrowhead indicates the anomaly; scale bar : 10 µm. C) Percentage of SW480 cells with mitotic spindle from A, determined on 3 pooled independent experiments. Fisher Exact Test shows that the proportion of cells with a mitotic spindle on E_{50} (93/140) is significantly different from the proportion on glass (139/142, $p < 0.001$). The proportion on E_{20} (16/50) is significantly smaller than that on E_{50} (93/140, $p < 0.001$). D) Percentage of cells bearing chromosome segregation abnormalities, among the cells with mitotic spindle considered in C. In C and D, the error bars represent 95% confidence intervals.

doi: 10.1371/journal.pone.0078468.g006

notations E_0, E_{20} and E_{50} are for $(PLL/HA)_{24}$, $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_n$ films with n = 0, 1 and 2, respectively.

2. PEM characterization

CLSM observations were performed with Zeiss LSM 510 microscope using x40/1.4 oil immersion objectif. FITC-fluorescence detected after excitation at 488 nm with cutoff dichroic mirror 488 nm and emission band-pass filter 505-530 nm. Rho-fluorescence detected after excitation at 543 nm, dichroic mirror 543 nm, and emission long pass filter 585 nm.

3. Cells and synchronization

Colorectal adenocarcinoma epithelial SW480 cells (ATCC, CCL-228) were grown in RPMI-1640 medium (Invitrogen) supplemented with glutamax, 10% FBS (Invitrogen), 100 µg/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Invitrogen), 0.025 U/mL

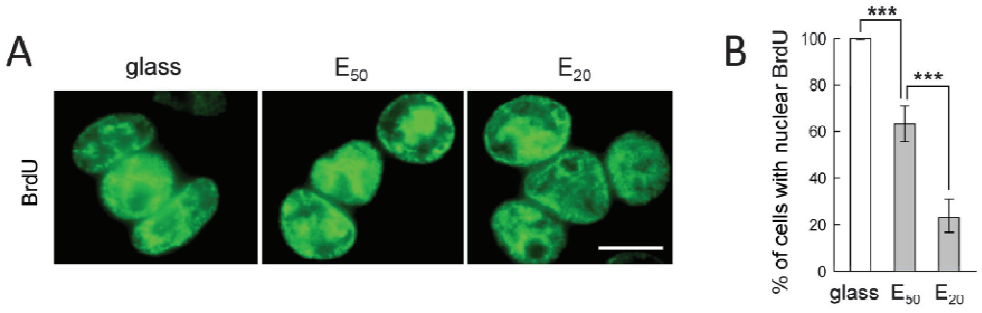


Figure 8. DNA Replication with respect to soft substrates. A) BrdU visualized by indirect immunofluorescence of SW480 cells 4h post-synchronization on glass, E_{50} and E_{20}; scale bar: 10 µm. B) Percentage of cells with nuclear BrdU determined on 3 pooled independent experiments. Fisher Exact Test shows that the proportion of cells with nuclear BrdU E_{50} (108/170) is significantly smaller than that on glass (400/400, $p < 0.001$) and the proportion on E_{20} (35/150) is significantly smaller than that on E_{50} ($p < 0.001$). The error bars represent 95% confidence intervals.
doi: 10.1371/journal.pone.0078468.g008

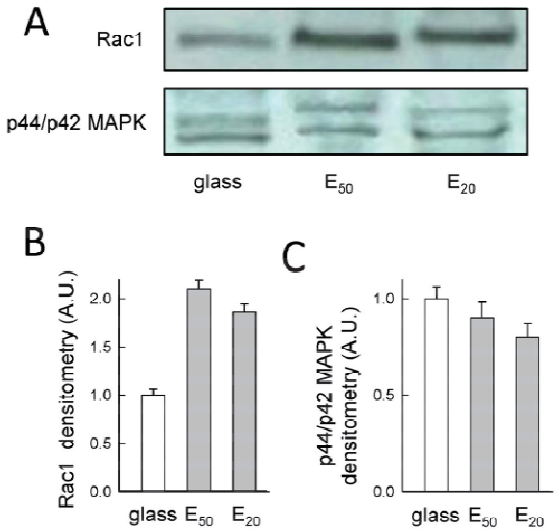


Figure 7. Rac1 expression of mitotic SW480 cells with respect to soft substrates. A) Western blots of Rac1 and MAPK protein for SW480 cells on glass, E_{50} and E_{20}, 30 min post-synchronization. Histogram shows the corresponding scans for Rac1 (B) and for p44/p42 MAPK (C). Representive results from 2 independent experiments (the error bars represent the s.e.m.; an arbitrary value of 1 was attributed to the mean corresponding to cells on glass).
doi: 10.1371/journal.pone.0078468.g007

insulin, 50 mg/mL hydrocortisone and 1.25 mg/mL G418 maintained at 37°C with 5% CO_2. Three days prior to synchronization, cells were replated at $1.2x10^4$ per cm^2. Cells were synchronized by mechanical shakeoff. Mitotic cells were centrifuged (800 *g*, 7 min), resuspended in culture medium, and replated at $1.2x10^4$ per cm^2 on film-coated coverslips for further analyses. Human Colonic Epithelial Cells (HCoEpiC, ScienCell Research Laboratories) were grown on Colonic Epithelial Cell Medium (CoEpiCM, ScienCell Reserach Laboratories) supplemented with colonic epithelial cell growth supplement (CoEpiCGS, ScienCell Research Laboratories) and with penicillin/streptomycin solution (P/S, ScienCell, Research Laboratories) maintained at 37°C with 5% CO_2. 2 population doublings were plated at $5x10^5$ per cm^2 on substrates for further analyses.

4. Immunolabeling

Cells were fixed/permeabilized in 3.7% (w/v) PFA in PBS plus 0.1% Triton X-100 for 15 min and blocked with 10% decomplemented FBS (Invitrogen). Cells were incubated with β1-integrin (dilution 1:20, Santa Cruz followed by rhodamin-conjugated secondary antibody (dilution 1:250, Santa Cruz), or with anti-α-tubulin (dilution 1:100, Santa Cruz) followed by FITC-conjugated secondary antibody (dilution 1:500, AnaSpec, CA) and DNA was revealed with Hoechst 33258 (20 µg/mL, Sigma). For DNA replication studies, cells previously grown with BrdU (37°C) (1:50, RPN 201, GE Healthcare) were fixed/ permeabilized, incubated with anti-BrdU and DNase for 1 h at 37°C (dilution 1:100, RNP 202, GE Healthcare), followed by TRITC-conjugated secondary antibody (1:500, AnaSpec).

5. DNA Replication

1.2×10^4 synchronized cells were seeded per cm^2 and incubated with BrdU (37°C) (1:50; RPN 201, GE Healthcare). Cells were fixed/permeabilized in 3.7% PFA in PBS plus 0.5% Triton X-100 for 15 min. After washing with PBS, cells were incubated with anti-BrdU and DNase for 1 h at 37°C (diluted 1:100; RNP 202, GE Healthcare). After washings with PBS, cells were incubated with TRITC-conjugated secondary antibody (1:500; AnaSpec).

6. Fluorescence microscopy

Samples were mounted in VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). fluorescence images were captured using Nikon Elipse TE200 with 63× PL APO (1.4 NA) objectif equipped with Nikon Digital Camera (DS-Q11MC with NIS-Elements softwares), and processed with ImageJ (http://rsb.info.nih.gov/ij/).

7. Live-cell imaging

For dividing assays, cells were incubated 20 min with Hoechst 33242 (0.1 µg/mL, Sigma) prior to mechanical shakeoff, replated at $1.2x10^4$ per cm^2 on film-coated coverslips and mounted in a Ludin Chamber (Life Imaging Services, Basel Switzerland) at 37°C, 5% CO_2, on a Leica DMIRE2 microscope equipped with a 40× HCX PL APO PH2 (0.75 NA) objective and a Leica DC350FX CCD (Leica FW4000 software). Images were acquired every 5 min for 2h30, by fluorescence and phase contrast.

8. Western Blot

Cells were seeded on surfaces (Nunc) at 2×10^5 per cm^2 and incubated for 30 min post-synchronization in culture medium at 37°C. Cells were lysed in 20 mM Tris-base, pH 8, (0.15 M NaCl, 2 mM EDTA, 1 % NP-40, 10% glycerol, 1 mM sodium orthovanadate containing 1% of protease inhibitor cocktail; Sigma). Extraction mixtures are rocked at 4°C and centrifuged (3 min, 13k rpm at 4°C). Protein concentration was determined using DC protein assay (Bio Rad, USA). Equal amounts of total protein extracts were subjected to SDS PAGE (NuPAGE, Invitrogen, France) and transferred onto nitrocellulose membranes (Iblot Transfer Stack, Invitrogen, USA) blocked in T- TBS (0.1% Tween 20, 50 mM Tris-base, pH 7.6, 0.15 M NaCl) containing 1% BSA (Euromedex, France) and probed overnight at 4°C. Blots were incubated 2h with primary antibody: β-integrin activated LIBS, (clone B44) (diluted 1:1000, Millipore), anti-Rac1 (diluted 1:1000, Millipore) and p44/p42 MAPK (diluted at 1:1000, Cell Signaling, USA) were used. Blots were incubated for 2 h with HRP-conjugated anti-rabbit, anti-mouse antibodies (diluted 1:2000; GE Healthcare). Bands were detected using ECL Western Blotting Analysing System kit (RNP2109, GE Healthcare). Autoradiographs were quantified with Kodak Digital Science 10 Software. Representative mean values of at least two independent experiments with standard errors (four time-points per band) are presented.

Supporting Information

Movie S1. Movie corresponding to Figure 3A for SW480 cells on E_0.
(AVI)

Movie S2. Movie corresponding to Figure 3A for SW480 cells on E_{50}.
(AVI)

Movie S3. Movie corresponding to Figure 3A for SW480 cells on E_{20}.
(AVI)

Movie S4. Movie corresponding to Figure 3A for SW480 cells on glass.
(AVI)

Movie S5. Movie corresponding to Figure 3B for SW480 cells on E_{50}.
(AVI)

Movie S6. Movie corresponding to Figure 3B for SW480 cells on E_{20}.
(AVI)

Acknowledgements

We are grateful to Géraldine Koenig (Inserm U1121, Strasbourg) for her advice in some experiments and Romain Vauchelles (CNRS, UMR 7213) for the help with live-cell imaging. Live-cell imaging was performed at the PIQ imaging platform (CNRS, UMR 7213) of the Faculté de Pharmacie, Illkirch, France.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DV MR LK DD JNF. Performed the experiments: MR LK DV DD. Analyzed the data: MR DV BS JCV PS PL. Contributed reagents/materials/analysis tools: MR DV. Wrote the manuscript: DV DD BD YH JCV JNF PS PL.

References

1. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE (2006) Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. Cell 126: 677-689. doi:10.1016/j.cell.2006.06.044. PubMed: 16923388.
2. Levental I, Georges PC, Janmey PA (2007) Soft biological materials and their impact on cell function. Soft Matter 3: 299-306. doi:10.1039/b610522j.
3. Kocgozlu L, Rabineau M, Koenig G, Haikel Y, Schaaf P et al. (2012). Biomaterials 33: 798-809. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.10.024. PubMed: 22041225.
4. Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI et al. (2005) Tensional homeostasis and the malignant phenotype. Cancer Cell 8: 241-254. doi:10.1016/j.ccr.2005.08.010. PubMed: 16169468.
5. Levental RK, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M et al. (2009) Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. Cell 139: 891-906. doi:10.1016/j.cell.2009.10.027. PubMed: 19931152.
6. Pathak A, Kumar S (2011) Biophysical regulation of tumor cell invasion: moving beyond matrix stiffness. Integr Biol 3: 267-278. doi:10.1039/c0ib00095g. PubMed: 21210057.
7. Liu J, Tan Y, Zhang H, Zhang Y, Xu P et al. (2012) Soft fibrin gels promote selection and growth of tumorigenic cells. Nat Mater 11: 734-741. doi:10.1038/nmat3361. PubMed: 22751180.
8. Tang X, Wen Q, Kuhlenschmidt TB, Kuhlenschmidt MS, Janmey PA et al. (2012) Attenuation of cell mechanosensitivity in colon cancer cells during in vitro metastasis. PLOS ONE 7: e50443. doi:10.1371/journal.pone.0050443. PubMed: 23226284.

9. Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, Lengauer C (2003) The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. Nat Rev Cancer 3: 695-701. doi:10.1038/nrc1165. PubMed: 12951588.
10. Stewénius Y, Gorunova L, Jonson T, Larsson N, Höglund M et al. (2005) Structural and numerical chromosome changes in colon cancer develop through telomere-mediated anaphase bridges, not through mitotic multipolarity. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 5541-5546. doi: 10.1073/pnas.0408454102. PubMed: 15809428.
11. Bellis J, Duluc I, Romagnolo B, Perret C, Faux MC et al. (2012) The tumor suppressor Apc controls planar cell polarities central to gut homeostasis. J Cell Biol 198: 331-341. doi:10.1083/jcb.201204086. PubMed: 22851318.
12. Gisselsson D (2008) Classification of chromosome segregation errors in cancer. Chromosoma 117: 511-519. doi:10.1007/s00412-008-0169-1. PubMed: 18528701.
13. Malanchi I, Santamaria-Martínez A, Susanto E, Peng H, Lehr HA et al. (2011) Interaction between cancer stem cells and their nich govern metastatic colonization. Nature 7: 85-89.
14. Decher G (1997) Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. Science 227: 1232-1237.
15. Zelikin AN (2010) Drug releasing polymer thin films: new era of surface-mediated drug delivery. ACS Nano 4: 2494-2509. doi:10.1021/nn100634r. PubMed: 20423067.
16. Kocgozlu L, Lavalle P, Koenig G, Senger B, Haikel Y et al. (2010) Selective and uncoupled role of substrate elasticity in the regulation of replication and transcription in epithelial cells. J Cell Sci 123: 29-39. doi:10.1242/jcs.053520. PubMed: 20016064.
17. Boudou T, Crouzier T, Ren K, Blin G, Picart C (2010) Multiple functionalities of polyelectrolyte multilayer films : new biomedical application. Adv Mater 22: 441-467. doi:10.1002/adma.200901327. PubMed: 20217734.
18. Lavalle P, Voegel JC, Vautier D, Senger B, Schaaf P et al. (2011) Dynamic aspects of films prepared by a sequential deposition of species : perspectives for smart and responsive materials. Adv. Mater 23: 1191-1221. doi:10.1002/adma.201003309. PubMed: 21264957.
19. Francius G, Hemmerle J, Ball V, Lavalle P, Picart C et al. (2007) Stiffening of soft polyelectrolyte architecture by multilayer capping evidence by viscoelastic analysis of AFM indentation measurements. J Phys Chem C 111: 8299-8306. doi:10.1021/jp070435+
20. Tilghman RW, Blais EM, Cowan CR, Sherman NE, Grigera PR et al. (2012) Matrix rigidity regulates cancer cell growth by modulating cellular metabolism and protein synthesis. PLOS ONE 7: e37231. doi: 10.1371/journal.pone.0037231. PubMed: 22623999.
21. Zhai L, Palmeri ML, Bouchard RR, Nightingale RW, Nightingale KR (2008) An integrated indenter-ARFI imaging system for tissue stiffness quantification. Ultrason Imaging 30: 95-111. doi: 10.1177/016173460803000203. PubMed: 18939611.
22. Zhang J, Neisa R, Mao Y (2009) Oncogenic Adenomatous polyposis coli mutants impair the mitotic checkpoint through direct interaction with Mad2. Mol Biol Cell 20: 2381-2388. doi:10.1091/mbc.E08-12-1206. PubMed: 19261806.
23. Reverte CG, Benware A, Jones CW, LaFlamme SE (2006) Perturbing integrin function inhibits microtubule growth from centrosomes, spindle assembly, and cytokinesis. J Cell Biol 174: 491-497. doi:10.1083/jcb.200603069. PubMed: 16908668.
24. Streuli CH (2009) Integrins and cell-fate determination. J Cell Sci 122: 171-177. doi:10.1242/jcs.018945. PubMed: 19118209.
25. Théry M, Racine V, Pépin A, Piel M, Chen Y et al. (2005) The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. Nat Cell Biol 10: 947-953. PubMed: 16179950.
26. Théry M, Bornens M (2006) Cell shape and cell division. Curr Opin Cell Biol 18: 648-857. doi:10.1016/j.ceb.2006.10.001. PubMed: 17046223.
27. Indra I, Beningo KA (2011) An in vitro correlation of metastatic capacity, substrate rigidity, and ECM composition. J Cell Biochem 112: 3151-3158. doi.10.1002/jcb.23241. PubMed. 21732405.
28. Pellinen T, Tuomi S, Arjonen A, Wolf M, Edgren H et al. (2008) Integrin trafficking regulated by Rab21 is necessary for cytokinesis. Dev Cell 15: 371-385. doi:10.1016/j.devcel.2008.08.001. PubMed: 18804435.
29. Yoshizaki H, Ohba Y, Kurokawa K, Itoh RE, Nakamura T et al. (2003) Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. J Cell Biol 162: 223-232. doi:10.1083/jcb.200212049. PubMed: 12860967.

4.3 Résumé

D'une manière similaire aux cellules épithéliales PtK2 (Kocgozlu *et al.* 2012), une augmentation de la fréquence des anomalies de ségrégation des chromosomes est observée lorsque les cellules tumorales SW480 sont au contact de substrats très mous. Les observations effectuées par vidéo microscopie ont montré que les substrats de 0 kPa provoquent la mort des cellules SW480 par lyse cellulaire (libération du contenu cytoplasmique dans le milieu de culture) pour 100% des cellules en mitose. Cependant, le suivi par vidéomicroscopie des événements de ségrégation des chromosomes, de décondensation de la chromatine et de cytokinèse révèle que sur des substrats de 50 kPa et 20 kPa respectivement 60% et 10% des cellules tumorales réussissent à franchir la phase de mitose. Alors que la létalité cellulaire est fortement corrélée à la forte diminution de rigidité des substrats, ces résultats démontrent qu'une petite proportion de cellules tumorales est capable de s'échapper des substrats très mous. Il est à noter qu'un très petit nombre de ces mitoses portant des anomalies de ségrégation des chromosomes entrent en interphase. Les intégrines interviennent dans différents mécanismes impliqués dans l'organisation du fuseau mitotique (Reverte *et al.* 2006). Nos données montrent qu'en réponse aux substrats mous, l'expression des intégrines-β1 reste inchangée comparée à celle mesurée sur un substrat très rigide comme le verre. Le fuseau mitotique de cellules tumorales au contact de substrats mous est également préservé, en particulier, pour quelques mitoses présentant des fautes de ségrégation de chromosomes. Finalement, sur les substrats mous, les cellules tumorales démarrent une activité de réplication de l'ADN, démontrant que ces cellules progressent dans le cycle cellulaire. Il est à remarquer que le pourcentage de cellules SW480 incorporant du BrdU est corrélé à celui de cellules qui progressent en mitose sur les substrats mous.

En conclusion, malgré une mort cellulaire massive sur substrat très mou (0 kPa), ce travail révèle que des cellules tumorales SW480 de cancer du côlon résistent aux faibles rigidités (20 kPa et 50 kPa) en progressant en mitose et même lorsqu'elles portent des anomalies de ségrégation des chromosomes. Ces résultats pourraient être très pertinents pour la physiopathologie du cancer et la dissémination des cellules tumorales du côlon. En effet, les anomalies de ségrégation chromosomique liées aux variations de rigidité du substrat seraient peut-être à l'origine de possibles

réarrangements chromosomiques qui sont la source de nombreuses mutations. Ces mutations pourraient permettre aux cellules de s'échapper de substrats mous. Ainsi les cellules cancéreuses pourraient poursuivre leur dissémination vers des sites de formation de métastases. Ce travail (actuellement en révision dans le journal *Plos One)* offre deux perspectives en cours d'étude et financé par l'« Alsace Contre le Cancer » :

1) Après la culture de cellules tumorales sur des substrats mous, sélectionner une population de cellules souches résistantes ;

2) Identifier des réarrangements génomiques et les oncogènes permettant à cette cellule de traverser des milieux extracellulaires *a priori* mécaniquement défavorables (collaboration avec le Dr Jean-Noël Freund de l'Unité Inserm 1113).

Ces études de la réponse des cellules tumorales aux changements physiques de l'environnement pourraient aider à identifier de nouvelles cibles potentielles pour la thérapie anticancéreuse.

Chapitre 5 :

Regulation of chromatin plasticity of epithelial cells in response to the substrate elasticity

5 Regulation of chromatin plasticity of epithelial cells in response to the substrate elasticity

Abstract

Chromatin plasticity is a highly relevant property of genetic material. For instance chromatin remodeling in embryonic stem cells contribute to the maintenance of pluripotency and to the determination of differentiation properties. How chromatin organized in nucleus respond to substrate elasticity remains an open question. We used polyelectrolyte multilayer films to mimick microenvironments of various elastic moduli and PtK2 kidney epithelial cells as a model cell system. On a stiff substrate, the nucleus displayed essentially euchromatin. In contrast, a soft substrate induced the partial remodeling of euchromatin, thus leading to the appearance of heterochromatin at the nuclear periphery. In addition, *very* soft substrates induced cell necrosis. The heterochromatin remodeling involves the histone deacetylase (HDAC) provided that after HDAC inhibition chromatin is maintained extended, i.e. in its euchromatin organization, even on *very* soft substrates. This latter form is required in the nuclear transcriptional competence. After HDAC inhibition, for cells deposited on a *very* soft substrate, we observed (i) that chromatin was maintained in its extended state in part of the cells and (ii) that specifically these cells resisted to necrosis even though transcription was inhibited. These results suggest that, on the same physical environment (*very* soft substrates), cell fate is dependent on chromatin plasticity: i) outside-in signaling induced by the soft substrate surface leads to heterochromatin and ultimately necrosis and ii) euchromatin (artificially maintained) allows cells to overcome necrosis. Furthermore, on a *very* soft substrate, cells that overcame necrosis after HDAC inhibition, but that were unable to spread, once transferred after 4h dormancy on a stiff surface reacquired the ability to spread.

5.1 Introduction

Cells of a multicellular organism, all containing identical genetic material, respond to environmental biochemical and mechanical signals in variable ways. Cells are

plastic and continuously in movement, and are able to realize biological events like adhesion, migration, contraction and protrusion with great adaptability to environmental changes. To achieve these dynamic processes, cells generate forces on the surface where they adhere. These forces can activate integrins at focal adhesions physically linked to actin filaments (F-actin: FAs). FAs are themselves connected to microtubules (MTs) and to intermediate filaments (IFs). Various proteins also connect FAs and IFs to nuclear membrane proteins. These proteins connect to the lamins that form the lamina to which chromatin attaches (Wang et al. 2009, Mellad et al., 2011; Gruenbaum et al., 2005). This lamina plays important roles in chromatin organization and in genes regulation (Schneider and Grosschedl 2007, Shimi et al., 2008, Dechat et al., 2008). Chromatin organization has a strong influence on the expression of the genome (Badeaux and Shi, 2013; Capoulade et al., 2011; Bancaud et al., 2009). For instance chromatin remodeling i) contribute to the maintenance of pluripotency and to the determination of differentiation properties in embryonic stem cells (Meshorer and Misteli 2006), ii) might be an essential parameter in nuclear deformation (Dalby et al., 2007; Badique et al. 2013, Le Berre et al. 2012, Booth-Gauthier et al., 2013). How does chromatin organized in nucleus respond to mechanical signals such as substrate elasticity? This constitutes the central issue of this manuscript.

Two well-defined cytological compartments are considered in the nucleus: the condensed, inactive heterochromatin and the extended, active euchromatin. Heterochromatin is restricted to an irregular rim located at the nuclear periphery and around the nucleolus as well as in patches throughout the nucleoplasm, whereas euchromatin fills up the majority of the nucleus. The histones (H2A, H2B, H3 and H4) around which 146 base pairs of DNA are wrapped form the basic nucleosome structure allowing compaction of chromatin (Dillon and Festenstein, 2002). Addition of acetyl groups in histones is catalyzed by histone acetyltransferases (HATs) involved in euchromatin remodeling. The removal of the acetyl group is catalyzed by histone deacetylases (HDACs) involved in heterochromatin remodeling. Correlation between acetylation and transcription has been clearly evidenced (Kurdistani et al., 2004). As a consequence, the repression of transcription (gene silencing) involves the recruitment of HDAC.

Recently, our group studied the behavior of PtK2 kidney epithelial cells deposited on films made of a poly(L-lysine)/hyaluronic acid $(PLL/HA)_{24}$ stratum capped by poly(sodium styrene sulfonate)/poly(allylamine hydrochloride) $(PSS/PAH)_n$ stratum (n = 0, 1, 2 or 5); increasing n increases the substrate stiffness (Francius et al., 2007, Kocgozlu et al. 2012) mimicking the elasticity of biological tissues. We evidenced that at a Young's modulus of about E = 50 kPa of the substrate, the absence of focal contacts and actin stress fibers prevented the activation of DNA replication but not the genes transcription for these epithelial cells. In contrast, a Young's modulus of 200 kPa allows the formation of focal contacts and stress fibers necessary for DNA replication while the transcription activity is maintained (Kocgozlu et al., 2010).

In the present manuscript, we investigate the regulation of chromatin plasticity in response to substrate elasticity. To this aim, PtK2 cells were seeded on the same series of polyelectrolyte multilayer films (PEMs). The correlation of HDAC inhibition induced by tricostatin A (TSA) with chromatin organization and transcriptional competence of the nucleus is also analyzed.

5.2 Materials and Methods

2.1. Notations

The short hand notations E_0, E_{20} and E_{50} and E_{200} stand for $(PLL/HA)_{24}$, $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_n$ films with n = 0, 1, 2, and 5 respectively. E_0, and E_{20} are considered as very soft substrates, E_{50} is a soft substrate and E_{200} a stiff substrate.

1. Cells cultured 24h on glass and further cultured 4h on E_0 are abbreviated "E_0".

2. Cells cultured 24h on glass in the presence of 50 nM TSA and further cultured 4h in the presence of 50 nM TSA on E_0 are abbreviated "E_0+TSA".

3. Cells cultured 24h on glass in the presence of 50 nM TSA and further cultured 4h in the presence of 50 nM TSA on E_{20} are abbreviated "E_{20}+TSA".

4. Cells cultured 24h on glass in the presence of 50 nM TSA and 1mg.mL^{-1} α-amanitin and further cultured 4h in the presence of 50 nM TSA and 1 mg.mL^{-1} α-amanitin on E_0 are abbreviated "E_0+TSA+AMA".

2.2. Materials and fabrication of PEM

PLL (MW = 5.7 x 10^4 Da, Sigma, St. Quentin Fallavier, France) and HA (MW = 4.0 x 10^5 Da, BioIberica, Barcelona) were used for buildup $(PLL/HA)_{24}$ films, and PSS (MW = 7.0 x 10^4 Da, Sigma, St. Quentin Fallavier) and PAH (MW = 7.0 x 10^4 Da, Sigma) for $(PSS/PAH)_n$ capping films (n corresponds to the number of layer pairs), which were deposited on top of $(PLL/HA)_{24}$ strata. PLL, HA, PSS, and PAH were dissolved at 1 mg/mL in a buffer solution containing 150 mM NaCl and 20 mM of tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS, Merck) at pH 7.4, and all rinsing steps were performed in the same buffer. $(PLL/HA)_{24}$ strata and $(PSS/PAH)_n$ capping films were prepared using a dipping machine (Dipping Robot DR3, Riegler & Kirstein GmbH, Berlin, Germany), on glass slides (VWR Scientific, Fontenay sous Bois, France). The rigidity of the $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_n$ film increases with the number of deposited PSS/PAH layer pairs (Table 1) (Francius et al., 200). The short hand notations E_0, E_{20}, E_{50} and E_{200} are for $(PLL/HA)_{24}$, $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_n$ films with n = 0, 1, 2 and 5, respectively.

2.3. Cells

PtK2 cells (CCL-56, LGC Standards, United Kingdom) were grown in EMEM (LGC Standards) supplemented with penicillin 100µg.mL^{-1}, streptomycin 100µg.mL^{-1} (Thermo cientific), and 10% FBS (Gibco) maintained at 37°C with 5% CO_2. Four days prior inhibition, cells were replated at 1 × 10^5 per cm^2. Cells were 24h pre-conditioned either or both with 50 nM TSA (Sigma) or / and 1 mg.mL^{-1} AMA (Sigma) and seeded at 1 × 10^5 per cm^2 from samples in the presence of the corresponding inhibitors and cultured over different times.

2.4. Immunolabeling

Cells were fixed/permeabilized in 3.7% (w/v) PFA in PBS plus 0.1% Triton X-100 for 15 min and blocked with 10% decomplemented FBS (Invitrogen). Cells were incubated with anti-HP1β (dilution 1:50, Abcam followed by rhodamin-conjugated secondary antibody (dilution 1:500, Santa Cruz), or with anti-hnRNPA1 / L (dilution

1:100 and 1:50, Abcam) followed by Fluor 488-conjugated secondary antibody (dilution 1:500, invitrogen), DNA was revealed with Hoechst 33258 (20 µg.mL^{-1}, Sigma) and actin staining with TRITC-phalloidin (2 µg.mL^{-1}, Sigma).

2.5. Fluorescence microscopy

Samples were mounted in VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Fluorescence images were captured using Nikon Elipse TE200 with 63× PL APO (1.4 NA) objectif equipped with Nikon Digital Camera (DS-Q11MC with NIS-Elements softwares), and processed with ImageJ (http://rsb.info.nih.gov/ij/).

2.6. Electronic microscopy

Cells, cultured 4h from the samples, were fixed in 2% PFA-2% glutaraldehyde in 50 nM cacodylate buffer at pH 7.4 for 2h. Cells were fixed in 1% osmium tetroxide in 125mM cacodylate for 30min. Samples were dehydrated in solutions with increasing ethanol content (50, 70, 95, and 100%). Samples were included in epoxy resin (48.2% epon 812, 34% anhydride nadic methyl, 16.4% anhydride [2-dodecenyl] succinic, and 1.5% 2,4,6-tris dimethylaminoetyl] phenol) for 48h at 60°C. The surface of the resin was cut into small block using a circular saw (Bronwill Scientific). Ultra-thin cross sections (100 nm) were performed using an ultramicrotome. Sections were stained by 5% uranyl acetate for 20 min and stained by 4% lead citrate. The specimen was inserted in a transmission electron microscope equipped with a field emission gun and operating at 70 kV (EM208, Philips Compagny).

5.3 Results

1. Soft substrates regulate heterochromatin remodelling

PEM films were used to investigate how the physical properties of the substrate might play a role in chromatin plasticity of epithelial PtK2 cells. To determine whether

chromatin remodeling was affected by the film stiffness, observation by electron microscopy has been made of cells cultured 4h on substrates with different stiffness. On glass, cells spread and display euchromatin uniformly distributed within the nucleus. On this substrates (Fig. 1A, enlargement of the black square), a very thin layer of perinuclear heterochromatin appears in dark. In this condition, the nucleus contains 10% of heterochromatin (Fig. 1B). Although cells spread less on E_{200} than on glass, they displayed a similar organization of chromatin in the nucleus, namely euchromatin homogeneously localized in the nucleus and a thin layer of perinuclear heterochromatin (Fig. 1A). Similarly to glass, on E_{200}, nucleus contains about 11% of heterochromatin (Fig. 1B). By contrast, cells in contact with E_{50}, adopt a round shaped morphology (Fig1. A) and show a large mass of perinuclear heterochromatin (Fig. 1A). Heterochromatin was also present in patches referred to as chromatin granule (Fig.1A). For E_{50}, the percentage of heterochromatin increased to about 20% (Fig. 1B). By contrast to glass and E_{200} substrates, on E_{20} and E_0 substrates the cells went through a lytic process as indicated by necrosis aspects of the cytoplasm and the nucleus, suggesting that the cellular material was released in the culture medium (Fig. 1A, E_{20} and E_0). However, these dead cells still contain in their nucleus perinuclear and perinucleolar condensed and aggregated dark material (Fig. 1A, E_{20} and E_0). This material was considered as heterochromatin because its localization was identical to that observed on living cells (Fig. 1A, glass, E_{200} and E_{50}). Unlike euchromatin, heterochromatin was not released from the nucleus. The graph (Fig. 1B) shows that the percentage of heterochromatin on the surface of the nucleus was significantly superior on E_{50}, E_{20} and E_0 compared to E_{200} and glass substrates. These results suggest that soft substrates remodel euchromatin in heterochromatin.

Heterochromatin proteins 1 β (HP1β) are structural adapters participating in the assembly of macromolecular complexes in chromatin. We next investigated by immunofluorescence analyses whether substrate stiffness also affects the nuclear distribution of HP1β. On glass and on E_{200} substrates, HP1β was uniformly detected within the nuclei exhibiting extended chromatin (Fig. 2A, glass and E_{200}). On E_{50}, HP1β was detected in the nuclei but less concentrated than on glass and on E_{200} (Fig. 2A). By contrast, observations on E_{20} and E_0 showed the absence of HP1β within the nuclei displaying condensed chromatin (Fig. 2A, E_{20} and E_0). This observation is in accordance

with the necrotic state of cells deposited on E_{20} and E_0 substrates (Fig. 1A). The graph (Fig. 2B) shows that the fluorescence intensity of nuclear HP1β signal on glass is superior that on E_{200}, and on E_{50}, E_{20} and E_0 is significantly smaller that on E_{200}.

2. Inhibition of HDAC on soft substrates maintain euchromatin

As soft substrates regulate euchromatin remodeling in heterochromatin (Fig. 1A), we postulate that HDAC is active even on soft substrates. To address this hypothesis, PtK2 cells were cultured on E_0 without or with TSA (a specific inhibitor of HDAC). The nuclear organization was analyzed during different time periods after cell seeding. Without TSA, the percentage of cells with decondensed nucleus decreased with time, becoming close to 10% after 5h of culture (Fig. 3A, black line). In contrast, with TSA, about 60% of the cells maintained their nucleus decondensed during the whole time course (Fig. 3A, red line). Surprisingly, by contrast to necrotic cells appearing on E_0 in the absence of TSA, electron microscopy showed that cells on E_0 with TSA adopted an organized nucleus containing euchromatin showing that cells are not in a necrosis state (Fig. 3D, E_0+TSA, 5h after seeding). It is worth noting that this nucleus is itself embedded in a organized cytoplasm (Fig. 3D, E_0+TSA). On E_0 in the presence of TSA, the percentage of heterochromatin reached, after 5h cell seeding, a level as low as about 6% which should be compared to the 20% obtained without TSA (Fig. 3B). It is remarkable to observe that the TSA treatment compensates (or even overcompensates) the unfavorable effect of the very soft substrate on the maintenance of euchromatin. Indeed, the amount of heterochromatin on E_0 treated with TSA is of the same order (or even less) than the amount of heterochromatin (10%) measured in cells on glass without TSA (Fig. 1B). On E_0 with TSA, HP1β was uniformly distributed in the nuclei exhibiting extended chromatin (Fig. 4A) The graph (Fig. 4B) shows that nuclear HP1β on "E_0+TSA" is superior that on "E_0". Similarly to E_0 with TSA, we observed on E_{20} with TSA that the percentage of heterochromatin decreased also down to about 7% after 5h post-seeding time and that euchromatin was found in the nuclei themselves contained in an organized cytoplasm (Fig. 3B and C).

3. Cell resistance to necrosis on very soft substrates

On the very soft substrates, the remarkable phenomenon of cell resistance to necrosis, induced by HDAC inhibition after addition of TSA (euchromatin maintained) opens several questions:

- Is extended chromatin competent in transcription?
- If so, in order to overcome necrosis, is there a need for a synergistic effect of HDAC inhibition and transcription activity?
- What is the behavior of cells cultured 5h on E_0 in presence of TSA once transferred on glass?

3.3.1. Euchromatin is transcriptionally competent

To address the first of the questions listed above, nuclear transcriptional competence was assessed following the nucleocytoplasmic distribution of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1). Indeed, hnRNP A1 involved in RNA processing (reviewed in Dreyfuss et al. 1993) is an indirect transcriptional marker because its nuclear accumulation is inhibited by the presence of RNA polymerase II transcription inhibitors, implying a link between transport and transcriptional activity. Cells cultured on E_0 and on E_{20} showed that the hnRNP A1 protein was not detected in the nucleus exhibiting condensed chromatin, whereas it was localized in the cytoplasm (Fig. 5A). By contrast, on E_0 with TSA, the hnRNP A1 protein was concentrated within the nuclei displaying extended chromatin (Fig. 5A). Our results demonstrate unambiguously that extended chromatin observed in the condition "E_0+TSA" corresponds to active chromatin competent in transcription. The intranuclear localization of hnRNP L is not affected by the transcription inhibitors (Piñol-Roma and Dreyfuss, 1991). However, on the very soft substrates E_0 and E_{20} where the nuclei are transcriptionally silent, hnRNP L was not homogeneously distributed within the nuclei but only colocalized with condensed chromatin (Fig. 5B). By contrast to E_0 without TSA, for E_0 with TSA, the hnRNP L protein was uniformly localized within the nuclei displaying extended chromatin (Fig 5B). The grapths show that hnRNP A1 (Fig. 5C) and

hnRNP L signal (Fig. 5D) on glass are superior that on E_{20} and on E_0, and on E_0 is significantly smaller that on "E_0+TSA".

In conclusion, our results evidence that euchromatin maintained on very soft substrate is transcriptionally competent as revealed by the concentration of hnRNP A1 in the nucleus.

3.3.2. HDAC inhibition is sufficient for cells to overcome necrosis

Then, to address if euchromatin needs to be competent in transcription to overcome necrosis, cells were treated with α-amanitin (AMA), a specific inhibitor of RNA polymerase II and incubated with TSA on E_0. In cells cultured on glass with AMA, the hnRNP A1 protein localizes in the cytoplasm and is not detected in the nucleus (Fig. 6A). This result shows that AMA, blocking the nuclear import of hnRNP A1 protein, inhibits the transcriptional competence of the nucleus. On E_0 with TSA and AMA, similarly to glass with AMA, the hnRNP A1 protein accumulates in the cytoplasm of cells whose nucleus exhibits extended chromatin (Fig. 6A). Electron microscopy shows that cells, deposited on E_0 with TSA and AMA, adopt round shaped morphology. These cells display organized cytoplasm and nucleus containing cellular material (Fig. 6A). Euchromatin fills up the majority of the nucleus. Heterochromatin is restricted to an irregular rim located at the nuclear periphery and around a compact nucleolus as well as in patches throughout the nucleoplasm (Fig. 6A). We note that the percentage of heterochromatin in cells in contact with "E_0+TSA+AMA" (Fig. 6B) is slightly superior to that in cells on "E_0+TSA" (Fig. 3B). Despite transcription inhibition on "E_0+TSA+AMA", organized cytoplasm and nucleus with euchromatin evidence that cells do not enter necrosis (Fig. 6A). These results strongly suggest that HDAC inhibition, maintaining euchromatin, permits the cells to overcome necrosis independently of the nuclear transcriptional competence.

3.3.3. Round cells cultured on E_0 with TSA once transferred on glass adhere and spread again.

During 5h of culture on E_0 with TSA, cells withstand necrosis and maintain active euchromatin. However, these cells fail to spread (Fig. 7A). Are these cells in a dormancy state which would lead at long term to necrosis? If these cells are brought into contact with stiff substrates, are they able to spread? To answer this question, cells cultured 5h on "E_0+TSA" were transferred on glass and analyzed 24h later. Results showed that the transfer and the subsequent 24-h culture on glass preserved as well extended chromatin as hnRNP A1 protein concentrated in the nuclei (Fig. 7A). Most importantly, phase contract microscopy reveals that these cells are spread (Fig. 7A) as emphasized by the presence of actin microfilaments (Fig. 7A, after transfer on glass) not detected in cells cultured on "E_0+TSA" (Fig. 7A, "E_0+TSA"). The graph (Fig. 7C) shows that nuclear hnRNP A1 signal on "E_0+TSA" is smaller than on "E_0+TSA" transferred on glass.

These results demonstrate that cells that overcome necrosis on "E_0+TSA" but did not spread, after transfer on a stiff surface reacquire the ability to spread.

3.4. Dependence of chromatin remodeling on the cytoskeleton organization

We next studied if physical connection between cytoskeleton and nucleus is involved in the maintenance of euchromatin. We have previously demonstrated that actin filaments and microtubules were absent on E_{50} (Kocgozlu et al., 2010; Kocgozlu et al., 2012). We hypothesized that intermediate filaments (vimentin V9) could be required in euchromatin maintenance. To address this point, cells were cultured 4h on substrates of various stiffness and after fixation stained with anti-vimentin V9. On glass and on E_{200}, cells showed filament network of vimentin V9 uniformly organized in the cytoplasm (Fig. 8A). On E_{50}, filaments of vimentin V9 were localized in a reduced perinuclear region of cells exhibiting nucleus with extended chromatin (Fig. 8A). On E_{20} and E_0, cells presented non-structured vimentin V9 at the periphery of a condensed nucleus (Fig. 8A). In a second set of experiments, cells were cultured for 4h on E_0 in the presence of TSA with or without 3,3'-Iminodipropionitrile (IDPN: inhibitor of intermediate filament vimentin V9). On "E_0+TSA", cells showed a network of vimentin V9 filaments although

the cells are round and nuclei with extended chromatin (Fig. 8B) in comparison to the spread cells on glass substrate (Fig. 8A). In contrast, on "E_0+TSA+IDPN", cells did not show vimentin V9 fibers and they showed nuclei exhibiting condensed chromatin (Fig. 8B). In addition, hnRNP A1 protein was localized in the cytoplasm but not detected in the nucleus (Fig. 8B). These results suggest that inhibition of the intermediate filaments by IDPN induced chromatin condensation and rendered the nucleus transcriptionally silent.

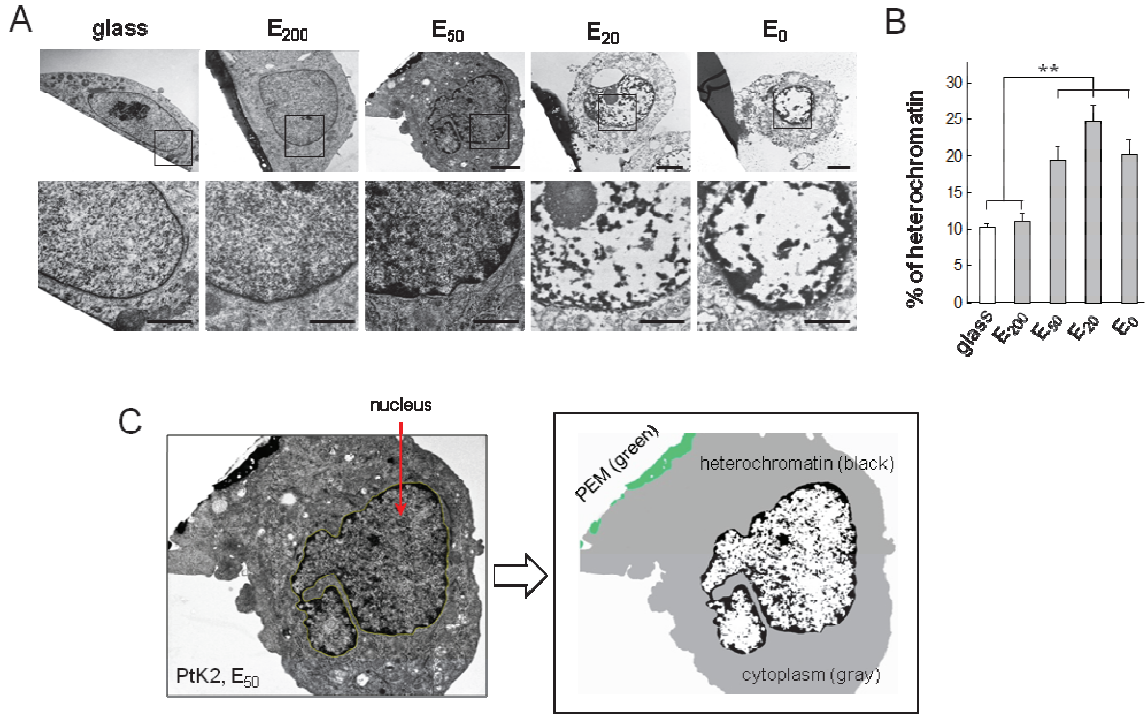


Figure 1. *Ultrastucture of PtK2 cells with respect to substrate elasticity. A) Cells after 4h of culture on glass, E_{200}, E_{50}, E_{20} and E_0, respectively 10, 10, 17, 10 and 10 cells were analyzed; scale bar: 2 µm. Bottom: enlargement of the area delimited by a square showing nuclear ultrastructure, scale bar: 40 nm. B) Percentage of heterochromatin on the nuclear surface of PtK2 cells from A. The Anova-Dunn's test shows that the percentage of cells with heterochromatin on glass and on E_{200} is significantly smaller that on E_{50}, E_{20} and E_0 ($p < 0.05$). C) Cartoon showing the treatment of ultrastucture image by imageJ for quantified percentage of heterochromatin in black on the nuclear surface.*

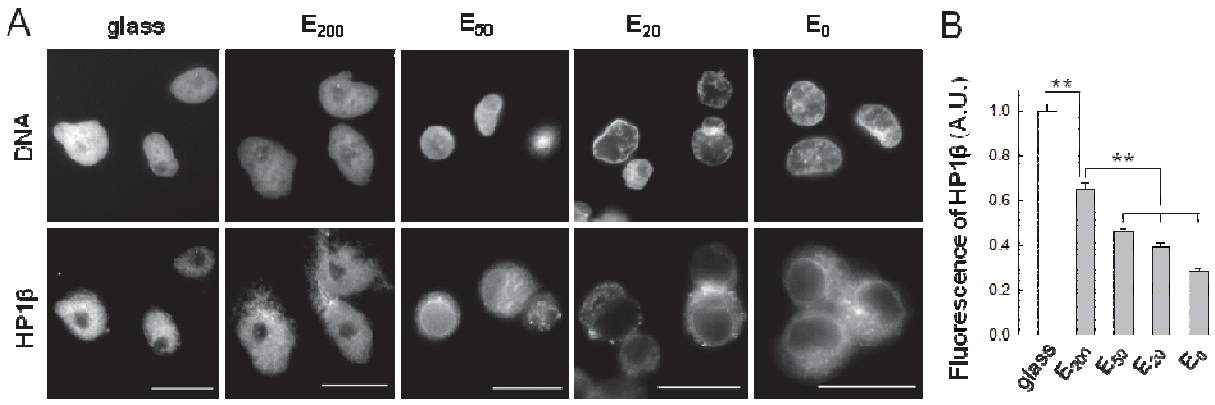


Figure 2. *Nuclear distribution of HP1β protein in regard to substrate elasticity. A) Cells after 4h of culture on glass, E_{200}, E_{50}, E_{20} and E_0, with anti-HP1β and counterstained with Hoechst 33258; scale bar: 20 µm. B) Fluorescence intensity for nuclear HP1β signal using imageJ (an arbitrary value of 1 was attributed to cells on glass). 300 cells were analysed per condition. Results are presented as standard error for three independent experiments. The Anova-Dunn's test shows that the fluorescence of HP1β on glass is different that on E_{200}, and on E_{50}, E_{20} and E_0 is significantly smaller that on E_{200} ($p<0.05$).*

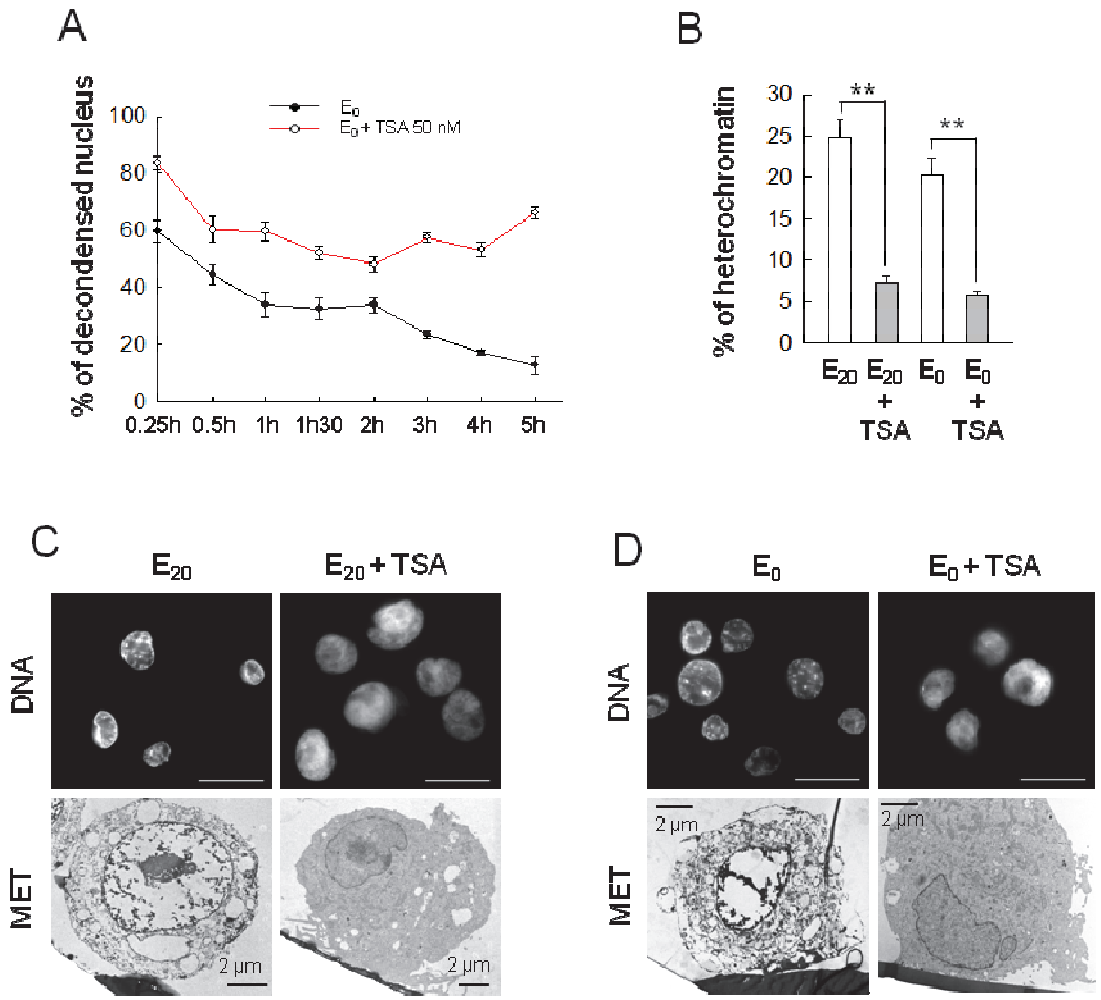


Figure 3. *Chromatin remodeling after HDAC inhibition. A) Percentage of PtK2 cells with decondensed nucleus during different time-periods after cell seeding on substrates. 600 cells were analysed per point for each condition. Standard error for three independent experiments. B) Percentage of heterochromatin from C and D. The Anova-Dunn's Method test shows that the percentage of cell with heterochromatin on E_{20} is significantly smaller that on E_{20} + TSA, and E_0 is significantly smaller that on E_0 + TSA ($p<0.05$). C-D) Top: stained with Hoechst 33258; scale bar: 20 µm. Bottom: cellular ultrastucture was analysed in 10 cells for each in C) and for 10 and 20 cells respectively on E_0 and E_0 + TSA in D). Condition E_0: cells 24h cultured on glass and further 4 h cultured on E_0. Conditions E_{20} + TSA and E_0 + TSA: cells 24h cultured on glass in the presence of 50 nM of TSA and further 4 h cultured on E_{20} and E_0 in the presence of 50 nM of TSA.*

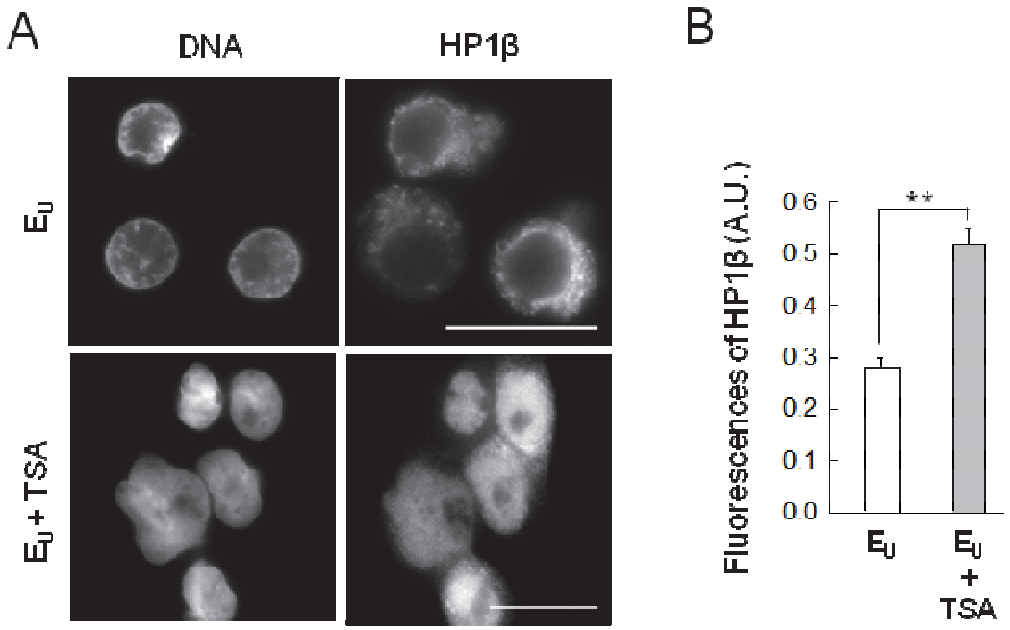


Figure 4. *HP1β distribution after HDAC inhibition. A) Cells after 5h of culture on E_0 and E_0+TSA with anti-HP1β and counterstained with Hoechst 33258; scale bar: 20 µm. B) Fluorescence intensity for nuclear HP1β signal using imageJ. 41 and 49 cells were analysed respectively for E_0 and E_0 + TSA. Condition E_0: cells 24h cultured on glass and further 5h cultured on E_0. Condition E_0 + TSA: cells 24h cultured on glass in the presence of 50 nM of TSA and further 5h cultured on E_0 in the presence of 50 nM of TSA. Results are presented as standard error for two independent experiments. The Anova-Dunn's test shows that the fluorescence signal of HP1β in the nucleus on E_0 is significantly smaller that on E_0 + TSA ($p<0.05$).*

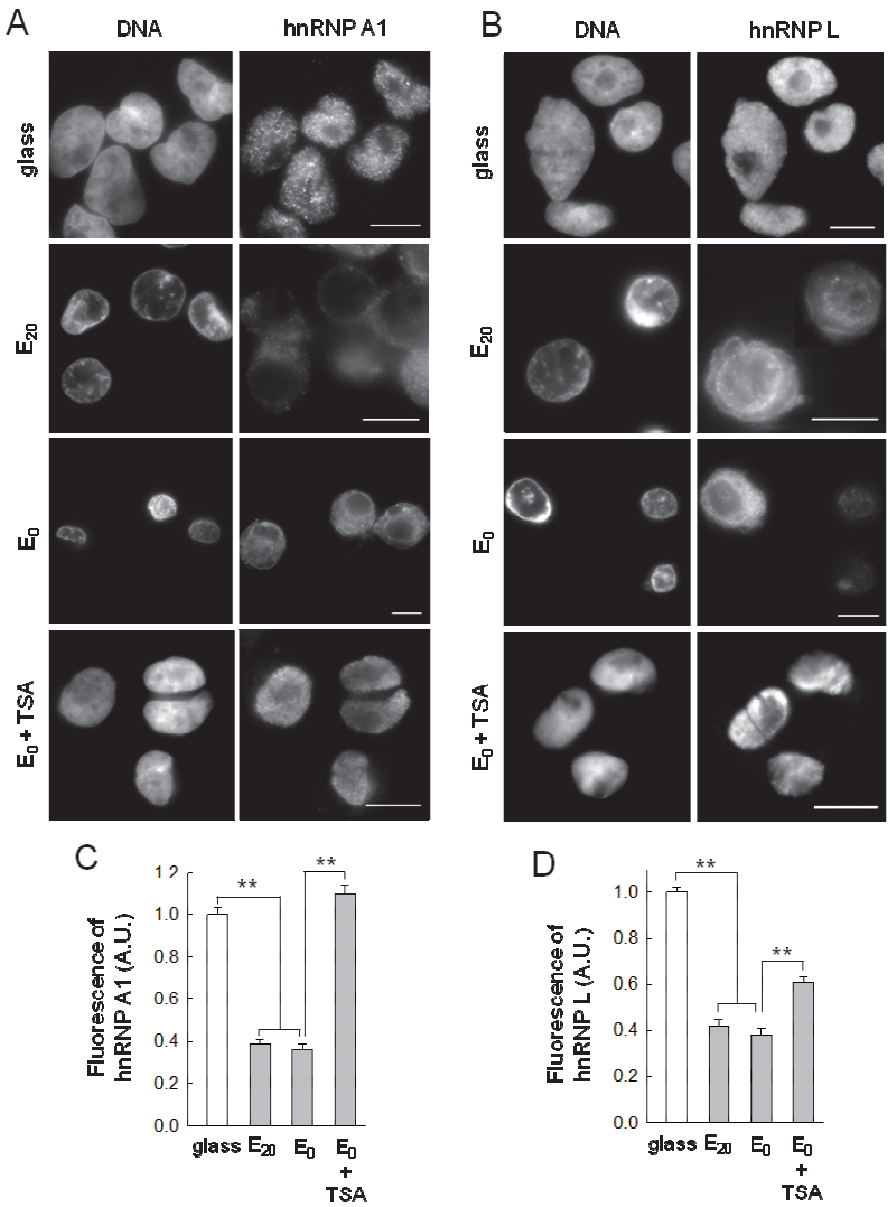


Figure 5. *Nuclear distribution of hnRNP A1 and hnRNP L after HDAC inhibition. A) Cells after 4h of culture on glass, E_{20}, E_0 and E_0 + TSA, with anti-hnRNP A1 and counterstained with Hoechst 33258; scale bar: 10 µm. B) Cells after 4h of culture on glass, E_{20}, E_0 and E_0 + TSA, with anti-hnRNP L and counterstained with Hoechst 33258; scale bar: 10 µm. C and D) Fluorescence intensity for nuclear hnRNPA1 and hnRNP L signal using imageJ, based respectively on A and B: 200 cells were analysed per condition. Results are presented as standard error for three independent experiments (an arbitrary value of 1 was attributed to cells on glass). The Anova-Dunn's test shows that the fluorescence of hnRNP A1 and of hnRNP L from glass is different that on E_{20} and E_0, and on E_0 is significantly smaller that on E_0 + TSA ($p<0.05$). Condition E_0: cells 24h cultured on glass and further 4h cultured on E_0. Condition E_0 + TSA: cells 24h cultured on glass in the presence of 50 nM of TSA and further 4h cultured on E_0 in the presence of 50 nM of TSA.*

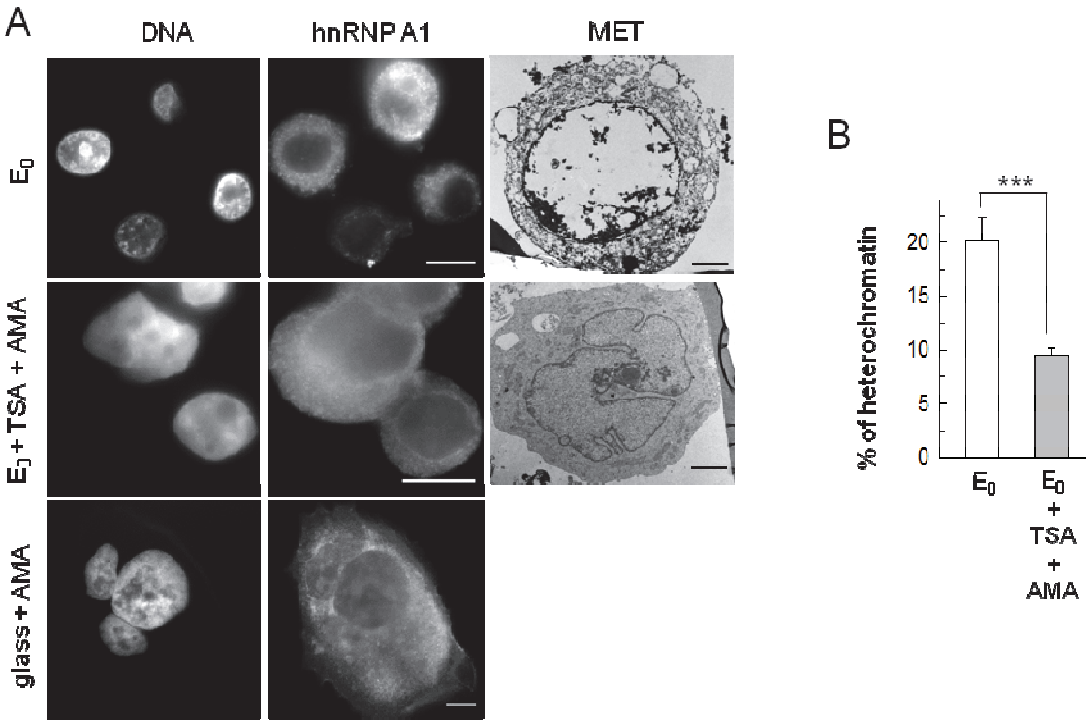


Figure 6. *Nuclear distribution of hnRNP A1 after HDAC inhibition and transcription inhibition by AMA. A) Cells on E0, E0 + TSA + AMA and glass + AMA with anti-hnRNP A1 and counterstained with Hoechst 33258; scale bar: 10 µm. For cellular ultrastructure; scale bar: 2µm. 120-150 cells were analysed per condition for immunofluorescence, and 10 cells were analysed in electronic microscopy. B) Percentage of heterochromatin from ultrastucture data in A. The Normality (Mann-Whitney Test) shows that the percentage of heterochromatin on E_0 is significantly smaller that on E_0 + TSA +AMA that on E_0 ($p<0.001$). Condition E_0: cells 24h cultured on glass and further 4 h cultured on E_0. Condition E_0 + TSA: cells 24h cultured on glass in the presence of 50 nM of TSA and further 4h cultured on E_0 in the presence of 50 nM of TSA. Condition E_0 + TSA + AMA and glass + AMA: cells 24h cultured on glass in the presence of 50 nM of TSA and of 1 mg.mL^{-1} of α-amanitin, and further 4h cultured on E_0 or on glass in the presence of 50 nM of TSA and 1 mg.mL^{-1} of α-amanitin.*

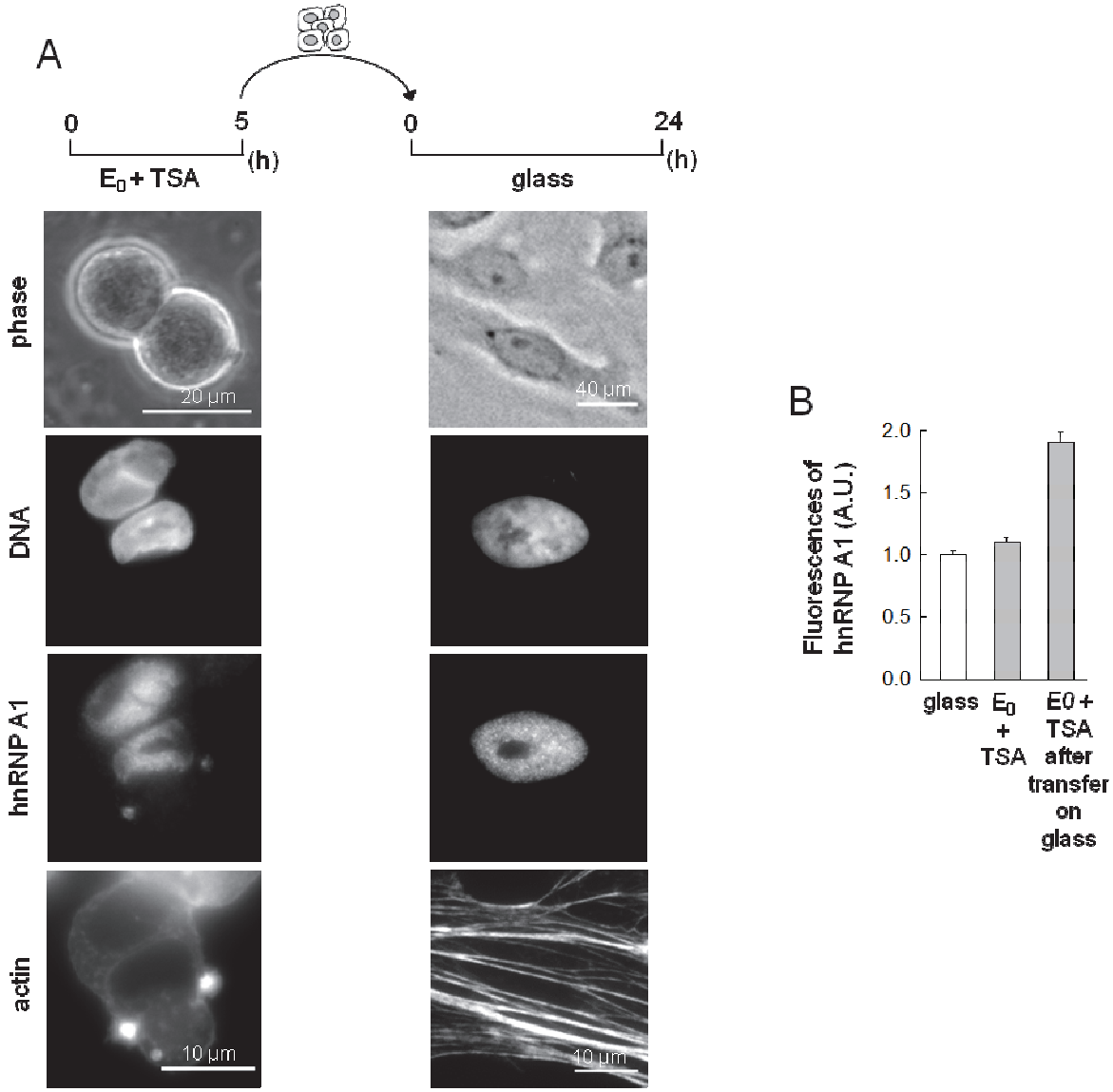


Figure 7. *Cells on E_0 with HDAC inhibition transferred on glass. A) Cell with anti-hnRNP A1 labeled with phalloidin and counterstained with Hoechst 33258. Condition E_0 + TSA transferred on glass: cells 24h cultured on glass in the presence of 50 nM of TSA and further 5h cultured on E_0 in the presence of 50 nM of TSA, then these cells were transferred after trypsin treatment on glass and cultured 24h. B) Fluorescence intensity for nuclear hnRNP A1 signal using imageJ. 60 cells were analysed for each condition. Results are presented as standard error for two independent experiments.*

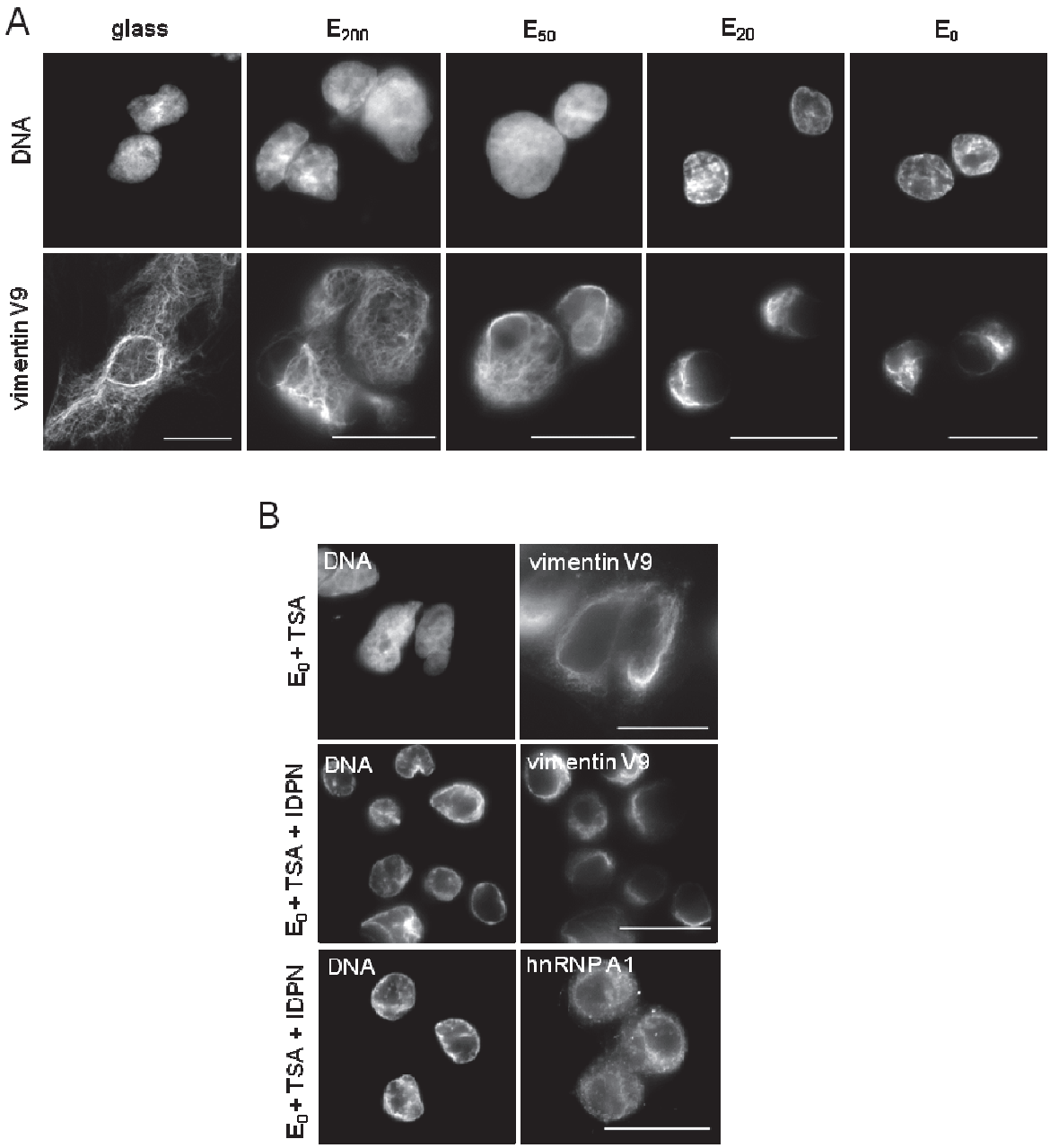


Figure 8. *Cytoplasmic organization of vimentin V9 in regard to substrat elasticity. A) Cells after 4h of culture on glass, E_{200}, E_{50}, E_{20} and E_0, with anti-vimentin V9 and counterstained with Hoechst 33258; scale bar: 20 µm. B) Vimentin V9 distribution after HDAC inhibition with or without 2% of IDPN. Condition E_0: cells 24h cultured on glass in presence of 50 nM of TSA and further 4h cultured on E_0 with TSA. Condition E_0+TSA+IDPN: cells 24h cultured on glass with 50 nm of TSA and further 4h cultured on E_0 with TSA and with 2% of IDPN. Cells were either stained with anti-vimentin V9 counterstained with Hoechst 33258 or with anti-hnRNP A1; scale bar: 20 µm.*

5.4 Conclusion

In this work, relationships between substrate elasticity and chromatin plasticity of epithelial cells were investigated. We report that on a stiff substrate, the nucleus exhibits essentially euchromatin. In contrast, soft substrates regulate remodeling of euchromatin in heterochromatin. In addition, *very* soft substrates induce cell necrosis. We demonstrate that, on *very* soft substrates, HDAC inhibition, maintaining euchromatin, permits the cells to overcome necrosis whether the transcriptional state of the nucleus. However, euchromatin maintenance is dependent on the intermediate filament vimentin V9. Indeed, inhibition of vimentin V9 induces chromatin condensation and renders the nucleus transcriptionally silent. Our findings emphasize the prime incidence of the substrate elasticity on chromatin plasticity: i) outside-in signaling induced by the soft substrate surface leads to heterochromatin and ultimately necrosis and ii) euchromatin (artificially maintained) allows cells to overcome necrosis. Furthermore, on a *very* soft substrate, cells that overcome necrosis after HDAC inhibition, but that are unable to spread, once transferred after 4h dormancy on a stiff surface reacquire the ability to spread.

5.5 References

- Badeaux AI, Shi Y (**2013**). "Emerging roles for chromatin as a signal integration and storage platform." *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(4): 211-224.
- Badique F, Stamov DR, Davidson M, Veuillet M, Reiter JN, Franz CM, Anselme K (**2013**) "Directing nuclear deformation on micropillared surfaces by substrate geometry and cytoskeleton organization." *Biomaterials*, 34(12), 2991-3001.
- Bancaud A, Huet S, Daigle N, Mozziconacci J, Beaudouin J, Ellenberg J (**2009**). "Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin." *EMBO Journal*, 28(24): 3785.

- Booth-Gauthier EA, Du V, Ghibaudo M, Rape AD, Dahl KN, Ladoux B (**2013**). "Hutchinson-Gilford progeria syndrome alters nuclear shape and reduced cell motility in three dimensional model substrates*." Integrative Biology* 5(3): 569-577.
- Capoulade J, Wachsmuth M, Hufnagel L, Knop M (**2011**). "Quantitative fluorescence imaging of protein diffusion and interaction in living cells." *Nature Biotechnology* 29(9): 835-839.
- Dalby MJ, Gadegaard N, Herzyk P, Sutherland D, Agheli H, Wilkinson CDW, Curtis ASG (**2007**). "Nanomechanotransduction oand interphase nuclear organization influence on genomic control." *Journal of cellular Biochemistry* 102(5): 1234-1244.
- Dillon N, Festenstein R (**2002**). "Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility." *TRENDS in Genetics* 18(5): 252-258.
- Francius G, Hemmerle J, Ball V, Lavalle P, Picart C, Voegel JC, Schaaf P, and Senger B (**2007**). "Stiffening of soft polyelectrolyte architecture by multilayer capping evidence by viscoelastic analysis of AFM indentation measurements." *Journal of Physical Chemistry C* 111(23): 8299-8306.
- Gruenbaum Y, Margalit A, Goldman RD, Shumaker DK, Wilson KL (**2005**). "The nuclear lamina comes of age*." Nat Rev Mol Cell Biol* 6(1):21-31.
- Le Berre M, Aubertin J, Piel M (**2012**). "Fine control of nuclear confinement identifies a threshold deformation leading to lamina rupture and induction of specific genes." *Integrative Biology* 4(11): 1406-1414.
- Mellad JA, Warren DT, Shanahan CM (**2011**). "Nesprins LINC the nucleus and cytoskeleton." *Current Opinion in Cell Biology* 23(1): 47-54.
- Meshorer E, Misteli T (**2006**). "Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(7): 540-546.
- Kocgozlu L, Lavalle P, Koenig G, Senger B, Haikel Y, Schaaf P, Voegel JC, Tenebaum H, Vautier D (**2010**). "Selective and uncoupled role of substrate elasticity in the

regulation of replication and transcription in epithelial cells." *J Cell Sci* 123(1): 29-39.

- Kocgozlu L, Rabineau M, Koenig G, Haikel Y, Schaaf P, Freund JN, Voegel JC, Lavalle P, Vautier D (**2012**). "The control of chromosome segregation during mitosis in epithelial cells by substrate elasticity." *Biomaterials* 33(3): 798-809.

- Kurdistani SK, Tavazoie S, Grunstein M (**2004**). "Mapping global histone acetylation patterns to gene expression." *Cell* 117(6): 721-733.

- Shimi t, Pfleghaar K, Kojima S, Pack CG, Solovei I, Glodman AE, Adam SA, Shumaker DK, Kinjo M, Cremer T, Goldman RD (**2008**). "The A- and B- type nuclear lamin networks microdomaons in chromatin organization and transcription." *Genes Dev* 22(24): 3409-3421.

- Wang N, Tytell JD, Ingber DE (**2009**). « Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus." *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(1):75-82.

Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse s'intéresse à l'influence de substrats mimant l'élasticité des tissus biologiques sur plusieurs comportements cellulaires :

- La ségrégation des chromosomes de cellules PtK2 ;
- La division cellulaire de cellules tumorales du cancer du côlon SW480 ;
- La plasticité de la chromatine de cellules PtK2.

Concernant les cellules tumorales SW480, alors que la létalité cellulaire est corrélée à la diminution de rigidité des substrats, une petite proportion de cellules tumorales est capable de s'échapper des substrats E_{50} et E_{20}. De plus, un petit nombre de ces mitoses portant des anomalies de ségrégation des chromosomes entrent en interphase. Ces anomalies seraient à l'origine de possibles réarrangements chromosomiques, source de nombreuses mutations, Ces mutations pourraient permettre aux cellules de s'échapper des substrats mous qui n'exerceraient plus une barrière physique contrairement pour les cellules humaines de colon HCoEpiC.

La plasticité de la chromatine est à bien des égards une propriété essentielle pour le matériel génétique. Pour des cellules souches embryonnaires, le remodelage de la chromatine contribue à maintenir les cellules pluripotentes ou au contraire déclenche leur différenciation. La plasticité de la chromatine pourrait influencer la déformation du noyau. Cette propriété est essentielle pour la migration de cellules sur des surfaces de topographie, de rugosité et d'élasticité données. La déformation du noyau est aussi un processus crucial lors de l'extravasion des vaisseaux sanguins et de la dissémination de métastases dans les tissus et les organes cibles. Pour les cellules PtK2, les substrats mous (E_{50}) conduisent au remodelage de la chromatine en hétérochromatine tandis que les substrats très mous (E_{20} et E_0) induisent la nécrose des cellules. Sur ces substrats, HDAC est impliquée dans la structuration de l'hétérochromatine. En effet, lorsque HDAC est inhibée, la chromatine est maintenue en euchromatine. Cette organisation du génome est utilisée par la cellule pour lui permettre de résister à la nécrose,

indépendamment de la compétence transcriptionnelle du noyau. De plus, les cellules résistantes à la nécrose (E_0 avec inhibition de HDAC) sont à nouveau capables de s'étaler après transfert sur substrats rigides. Ces résultats suggèrent que sur un même environnement physique (substrat mou) le devenir de la cellule dépend de la plasticité de la chromatine selon 1) une voie de signalisation entrante « *outside-in* » initiée à la surface du substrat conduisant à la formation d'hétérochromatine et finalement à la nécrose, 2) une voie de signalisation sortante « *inside-out* » initiée à partir de l'euchromatine permettant à la cellule de résister à la nécrose. Suite à ces résultats, plusieurs perspectives sont envisageables :

- Etudier les mécanismes qui permettent l'étalement d'une cellule « dormante » sur substrat mou après transfert sur un substrat rigide ;
- La cellule déploie-elle ses complexes d'adhésions préalablement concentrés sur une zone d'adhésion réduite lorsqu'elle est cultivée sur substrat mou, permettant une réorganisation en cascade du cytosquelette ?
- La cellule se réorganise-t-elle à partir de son génome maintenu actif ?

Les propriétés physiques de la chromatine pourrait-être analysées en fonction de l'élasticité du substrat en 1) quantifiant par « *fluorescence correlation spectroscopy* » (FCS) les propriétés de diffusion et de dynamique de protéines interagissant avec la chromatine comme la protéine HP1β 2) mesurant les propriétés mécaniques de rigidité ou d'élasticité du génome par AFM en mode spectroscopie.

Un phénomène analogue peut-être établi entre les deux aspects de la thèse résumé ci-dessus : d'une part, une petite proportion de cellules tumorales SW480 survie aux faibles rigidités du substrat probablement par des réarrangements chromosomiques ; d'autre part, grâce aux propriétés de plasticité de la chromatine, des cellules PtK2 sont capables de résister à la nécrose induite par les substrats mous. La signature génétique de la petite proportion de cellules tumorales qui échappent aux substrats faiblement rigides pourrait être comparée à celle de la majorité des cellules tumorales bloquées sur ces substrats. Parallèlement, la signature génétique des cellules PtK2 pourrait être étudiée en fonction des propriétés de plasticité de la chromatine en réponse à l'élasticité du substrat. Enfin, pour la cellule tumorale, le transcriptome de

celles qui progressent en mitose pourrait être comparé à celle dont plasticité de la chromatine serait modifiée.

Références

Adams, J. C. et F. M. Watt (**1993**). "Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix." *Development* 117(4): 1183-1198.

Anderson, N. G., J. L. Maller, N. K. Tonks et T. W. Sturgill (**1990**). "Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase." *Nature* 343(6259): 651-653.

Anno, T., N. Sakamoto et M. Sato (**2012**). "Role of nesprin-1 in nuclear deformation in endothelial cells under static and uniaxial stretching conditions." *Biochem Biophys Res Commun* 424(1): 94-99.

Anthis, N. J. et I. D. Campbell (**2011**). "The tail of integrin activation." *Trends in Biochemical Sciences* 36(4): 191-198.

Badique, F., D. R. Stamov, P. M. Davidson, M. Veuillet, G. Reiter, J.-N. Freund, C. M. Franz et K. Anselme (**2013**). "Directing nuclear deformation on micropillared surfaces by substrate geometry and cytoskeleton organization." *Biomaterials* 34(12): 2991-3001.

Balaban, N. Q., U. S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi et B. Geiger (**2001**). "Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates." *Nat Cell Biol* 3(5): 466-472.

Booth-Gauthier, E.A., V. Du, M. Ghibaudo, A.D. Rape, K.N. Dahl et B. Ladoux (**2013**). "Hutchinson-Gilford progeria syndrome alters nuclear shape and reduces cell motility in three dimensional model substrates." *Integrative Biology* 5: 569-577.

Boudou, T., T. Crouzier, K. Ren, G. Blin et C. Picart (**2010**). "Multiple functionalities of polyelectrolyte multilayer films: new biomedical applications." *Adv Mater* 22(4): 441-467.

Boura, C., S. Muller, D. Vautier, D. Dumas, P. Schaaf, J. Claude Voegel, J. François Stoltz et P. Menu (**2005**). "Endothelial cell—interactions with polyelectrolyte multilayer films." *Biomaterials* 26(22): 4568-4575.

Boveri, T. (**1900**). Zellen-Studien: Über die Natur der Centrosomen, G. Fischer.

Bruce Alberts, A. J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, Ed. (**2002**). Molecular Biology of the Cell. New York.

Carazo-Salas, R. E. et E. Karsenti (**2003**). "Long-range communication between chromatin and microtubules in *Xenopus* egg extracts." *Current Biology* 13(19): 1728-1733.

Carlier, M. F. (**1991**). "Actin: protein structure and filament dynamics." *J Biol Chem* 266(1): 1-4.

Chambon, P. (**1975**). "Eukaryotic nuclear RNA polymerases." *Annual Review of Biochemistry* 44(1): 613-638.

Chiou, N.-T., G. Shankarling et Kristen W. Lynch (**2013**). "HnRNP L and hnRNP A1 induce extended U1 snRNA interactions with an exon to repress spliceosome assembly." *Molecular Cell* 49(5): 972-982.

Chou, S. Y., C. M. Cheng et P. R. LeDuc (**2009**). "Composite polymer systems with control of local substrate elasticity and their effect on cytoskeletal and morphological characteristics of adherent cells." *Biomaterials* 30(18): 3136-3142.

Choudhary, C., C. Kumar, F. Gnad, M. L. Nielsen, M. Rehman, T. C. Walther, J. V. Olsen et M. Mann (**2009**). "Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions." *Science* 325(5942): 834-840.

Cleveland, D. W., Y. Mao et K. F. Sullivan (**2003**). "Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling." *Cell* 112(4): 407-421.

Crisp, M., Q. Liu, K. Roux, J.B. Rattner, C. Shanahan, B. Burke, P.D. Stahl et D. Hodzic (**2006**). "Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINK complex." *J Cell Biol* 172(1): 41-53.

Crisp, M. et B. Burke (**2008**). "The nuclear envelope as an integrator of nuclear and cytoplasmic architecture." *FEBS Lett* 582(14): 2023-2032.

Decher, G. (**1997**). "Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites." *Science* 277(5330): 1232-1237.

Decher, G., J. D. Hong et J. Schmitt (**1992**). "Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces." *Thin Solid Films* 210–211, Part 2(0): 831-835.

del Rio, A., R. Perez-Jimenez, R. Liu, P. Roca-Cusachs, J. M. Fernandez et M. P. Sheetz (**2009**). "Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding." *Science* 323(5914): 638-641.

Desprat, N., W. Supatto, P.-A. Pouille, E. Beaurepaire et E. Farge (**2008**). "Tissue Deformation Modulates Twist Expression to Determine Anterior Midgut Differentiation in Drosophila Embryos." *Developmental Cell* 15(3): 470-477.

du Roure, O., A. Saez, A. Buguin, R. H. Austin, P. Chavrier, P. Siberzan et B. Ladoux (**2005**). "Force mapping in epithelial cell migration." *PNAS* 102(7): 2390-2395.

Eden, S., R. Rohatgi, A. V. Podtelejnikov, M. Mann et M. W. Kirschner (**2002**). "Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck." *Nature* 418(6899): 790-793.

Engler, A. J., M. A. Griffin, S. Sen, C. G. Bonnemann, H. L. Sweeney et D. E. Discher (**2004**). "Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments." *J Cell Biol* 166(6): 877-887.

Engler, A. J., L. Richert, J. Y. Wong, C. Picart et D. E. Discher (**2004**). "Surface probe measurements of the elasticity of sectioned tissue, thin gels and polyelectrolyte multilayer films: Correlations between substrate stiffness and cell adhesion." *Surface Science* 570(1–2): 142-154.

Engler, A. J., S. Sen, H. L. Sweeney et D. E. Discher (**2006**). "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification." *Cell* 126(4): 677-689.

Fanti, L. et S. Pimpinelli (**2008**). "HP1: a functionally multifaceted protein." *Current Opinion in Genetics & Development* 18(2): 169-174.

Farge, E. (**2003**). "Mechanical induction of twist in the *Drosophila Foregut/Stomodeal Primordium*." *Current Biology* 13(16): 1365-1377.

Felsenfeld, G. et M. Groudine (**2003**). "Controlling the double helix." *Nature* 421(6921): 448-453.

Fletcher, D. A. et R. D. Mullins (**2010**). "Cell mechanics and the cytoskeleton." *Nature* 463(7280): 485-492.

Francius, G., J. Hemmerlé, V. Ball, P. Lavalle, C. Picart, J.-C. Voegel, P. Schaaf et B. Senger (**2007**). "Stiffening of Soft Polyelectrolyte Architectures by Multilayer Capping Evidenced by Viscoelastic Analysis of AFM Indentation Measurements." *J Phys Chem C* 111(23): 8299-8306.

Frantz, C., K. M. Stewart et V. M. Weaver (**2010**). "The extracellular matrix at a glance." *J Cell Science* 123(24): 4195-4200.

Freeman S, H. H. (**2005**). Biological science.

Fuda, N. J., M. B. Ardehali et J. T. Lis (**2009**). "Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription in vivo." *Nature* 461(7261): 186-192.

Galbraith, C. G. et M. P. Sheetz (**1997**). "A micromachined device provides a new bend on fibroblast traction forces." *PNAS* 94(17): 9114-9118.

Gardner, M. K., M. Zanic et J. Howard (**2013**). "Microtubule catastrophe and rescue." *Curr Opin Cell Biol* 25(1): 14-22.

Garrouste, F., C. Capo, A. M. Benoliel, P. Bongrand et R. Depieds (**1982**). "Nonspecific binding by macrophages: different modulation of adhesive properties of rat peritoneal cells after plating on a glass or a plastic surface." *J Reticuloendothel Soc* 31(5): 415-422.

Garza, J. M., P. Schaaf, S. Muller, V. Ball, J. F. Stoltz, J. C. Voegel et P. Lavalle (**2004**). "Multicompartment films made of alternate polyelectrolyte multilayers of exponential and linear growth." *Langmuir* 20(17): 7298-7302.

Ghassemi, S., G. Meacci, S. Liu, A. A. Gondarenko, A. Mathur, P. Roca-Cusachs, M. P. Sheetz et J. Hone (**2012**). "Cells test substrate rigidity by local contractions on submicrometer pillars." *PNAS* 109(14): 5328-5333.

Gong, X. Q., Y. A. Nedialkov et Z. F. Burton (**2004**). "α-Amanitin Blocks Translocation by Human RNA Polymerase II." *J Biol Chem* 279(26): 27422-27427.

Gribova, V., T. Crouzier et C. Picart (**2011**). "A material's point of view on recent developments of polymeric biomaterials: control of mechanical and biochemical properties." *Journal of Materials Chemistry* 21(38): 14354-14366.

Haase, K., A.E. Pelling (**2013**). "Resiliency of the plasma membrane and actin cortex to large-scale deformation." *Cytoskeleton.*

Halliburton, W. D. (**1887**). "On Muscle-Plasma." *The Journal of Physiology* 8(3-4): 133-202.

Hartwell, L. et T. Weinert (**1989**). "Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events." *Science* 246(4930): 629-634.

Haxaire, K., Y. Maréchal, M. Milas et M. Rinaudo (**2003**). "Hydration of hyaluronan polysaccharide observed by IR spectrometry. II. Definition and quantitative analysis of elementary hydration spectra and water uptake." *Biopolymers* 72(3): 149-161.

Helmke, B. et P. Davies (**2002**). "The Cytoskeleton Under External Fluid Mechanical Forces: Hemodynamic Forces Acting on the Endothelium." *Annals of Biomedical Engineering* 30(3): 284-296.

Huang, Y., W. Li, X. Yao, Q.-j. Lin, J.-w. Yin, Y. Liang, M. Heiner, B. Tian, J. Hui et G. Wang (**2012**). "Mediator complex regulates alternative mRNA processing *via* the MED23 subunit." *Molecular Cell* 45(4): 459-469.

Huebsch, N., P. R. Arany, A. S. Mao, D. Shvartsman, O. A. Ali, S. A. Bencherif, J. Rivera-Feliciano et D. J. Mooney (**2010**). "Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate." *Nat Mater* 9(6): 518-526.

Humphries, J. D., A. Byron, M. D. Bass, S. E. Craig, J. W. Pinney, D. Knight et M. J. Humphries (**2009**). "Proteomic analysis of integrin-associated complexes identifies RCC2 as a dual regulator of Rac1 and Arf6." *Sci Signal* 2(87): ra51.

Humphries, J. D., A. Byron et M. J. Humphries (**2006**). "Integrin ligands at a glance." *Journal of Cell Science* 119(19): 3901-3903.

Hung, L.-H., M. Heiner, J. Hui, S. Schreiner, V. Benes et A. Bindereif (**2008**). "Diverse roles of hnRNP L in mammalian mRNA processing: A combined microarray and RNAi analysis." *RNA* 14(2): 284-296.

Hynes, R. O. (**2002**). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." *Cell* 110(6): 673-687.

Hynes, R. O. (**2009**). "The extracellular matrix: not just pretty fibrils." *Science* 326(5957): 1216-1219.

Ishikawa, H., R. Bischoff et H. Holtzer (**1968**). "Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle." *The Journal of Cell Biology* 38(3): 538-555.

Izaurralde, E., A. Jarmolowski, C. Beisel, I. W. Mattaj, G. Dreyfuss et U. Fischer (**1997**). "A Role for the M9 Transport Signal of hnRNP A1 in mRNA Nuclear Export." *J Cell Biol* 137(1): 27-35.

Johnson, G. L. et R. Lapadat (**2002**). "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases." *Science* 298(5600): 1911-1912.

Kandow, C. E., P. C. Georges, P. A. Janmey et K. A. Beningo (**2007**). "Polyacrylamide hydrogels for cell mechanics: steps toward optimization and alternative uses." *Methods Cell Biol* 83: 29-46.

Katsumi, A., A. W. Orr, E. Tzima et M. A. Schwartz (**2004**). "Integrins in Mechanotransduction." *Journal of Biological Chemistry* 279(13): 12001-12004.

Kim, J. H., B. Hahm, Y. K. Kim, M. Choi et S. K. Jang (**2000**). "Protein-protein interaction among hnRNPs shuttling between nucleus and cytoplasm." *J Mol Biol* 298(3): 395-405.

Klein, E. A., L. Yin, D. Kothapalli, P. Castagnino, F. J. Byfield, T. Xu, I. Levental, E. Hawthorne, P. A. Janmey et R. K. Assoian (**2009**). "Cell-cycle control by physiological matrix elasticity and *in vivo* tissue stiffening." *Current Biology* 19(18): 1511-1518.

Knoblich, J. A. (**2010**). "Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(12): 849-860.

Kocgozlu, L., P. Lavalle, G. Koenig, B. Senger, Y. Haikel, P. Schaaf, J.-C. Voegel, H. Tenenbaum et D. Vautier (**2010**). "Selective and uncoupled role of substrate elasticity in the regulation of replication and transcription in epithelial cells." *J Cell Science* 123(1): 29-39.

Kocgozlu, L., M. Rabineau, G. Koenig, Y. Haikel, P. Schaaf, J.-N. Freund, J.-C. Voegel, P. Lavalle et D. Vautier (**2012**). "The control of chromosome segregation during mitosis in epithelial cells by substrate elasticity." *Biomaterials* 33(3): 798-809.

Kumar, A. et S. H. Wilson (**1990**). "Studies of the strand-annealing activity of mammalian hnRNP complex protein A1." *Biochemistry* 29(48): 10717-10722.

Labat-Robert, J., M. Bihari-Varga et L. Robert (**1990**). "Extracellular matrix." *FEBS Letters* 268(2): 386-393.

Labat-Robert, J. et L. Robert (**2005**). "Introduction: matrix biology in the 21st century. From a static-rheological role to a dynamic-signaling function." *Pathologie Biologie* 53(7): 369-371.

Ladam, G., P. Schaaf, F. J. G. Cuisinier, G. Decher et J.-C. Voegel (**2001**). "Protein adsorption onto auto-assembled polyelectrolyte films." *Langmuir* 17(3): 878-882.

Lafaurie-Janvore, J., P. Maiuri, I. Wang, M. Pinot, J.-B. Manneville, T. Betz, M. Balland et M. Piel (**2013**). "ESCRT-III assembly and cytokinetic abscission are induced by tension release in the intercellular bridge." *Science* 339(6127): 1625-1629.

Lavalle, P., C. Gergely, F. J. G. Cuisinier, G. Decher, P. Schaaf, J. C. Voegel et C. Picart (**2002**). "Comparison of the structure of polyelectrolyte multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime: An in Situ Atomic Force Microscopy Study." *Macromolecules* 35(11): 4458-4465.

Lavalle, P., V. Vivet, N. Jessel, G. Decher, J.-C. Voegel, P. J. Mesini et P. Schaaf (**2004**). "Direct evidence for vertical diffusion and exchange processes of polyanions and polycations in polyelectrolyte multilayer films." *Macromolecules* 37(3): 1159-1162.

Le Berre, M., J. Aubertin et M. Piel (**2012**). "Fine control of nuclear confinement identifies a threshold deformation leading to lamina rupture and induction of specific genes." *Integr Biol* 4(11): 1406-1414.

Lee, K., E. A. Silva et D. J. Mooney (**2011**). "Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments." *J R Soc Interface* 8(55): 153-170.

Lee, K. K. et J. L. Workman (**2007**). "Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(4): 284-295.

Legate, K. R., S. A. Wickström et R. Fässler (**2009**). "Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling." *Genes & Development* 23(4): 397-418.

Leibovitz, A., J. C. Stinson, W. B. McCombs, C. E. McCoy, K. C. Mazur et N. D. Mabry (**1976**). "Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines." *Cancer Research* 36(12): 4562-4569.

Levental, I., P. C. Georges et P. A. Janmey (**2007**). "Soft biological materials and their impact on cell function." *Soft Matter* 3(3): 299-306.

Liu, J., Y. Tan, H. Zhang, Y. Zhang, P. Xu, J. Chen, Y.-C. Poh, K. Tang, N. Wang et B. Huang (**2012**). "Soft fibrin gels promote selection and growth of tumorigenic cells." *Nat Mater* 11(8): 734-741.

Lo, C. M., H. B. Wang, M. Dembo et Y. L. Wang (**2000**). "Cell movement is guided by the rigidity of the substrate." *Biophys J* 79(1): 144-152.

Lombardi, M.L., D.E. Jaalouk, C.M. Shanahan, B. Burke, K.L. Roux et J. Lammerding (2011). "The interaction between nesprins and sun proteins at the nuclear envelope is critical for force transmission between the nucleus and cytoskeleton." *J Biol Chem* 286(30): 26743-26753.

Lyer, K.V., S. Pulford, A. Mogilner et G.V. Shivashankar (**2012**). "Mechanical activation of cells induces chromatin remodeling preceding MKL nuclear transport." *Biophys J* 103(7): 1416-1428.

Mack, P. J., M. R. Kaazempur-Mofrad, H. Karcher, R. T. Lee et R. D. Kamm (**2004**). "Force-induced focal adhesion translocation: effects of force amplitude and frequency." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 287(4): C954-C962.

Maniotis, A. J., C. S. Chen et D. E. Ingber (**1997**). "Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure." *PNAS* 94(3): 849-854.

Matsusaki, M., H. Ajiro, T. Kida, T. Serizawa et M. Akashi (**2012**). "Layer-by-layer assembly through weak interactions and their biomedical applications." *Adv Mater* 24(4): 454-474.

Matthew Michael, W., M. Choi et G. Dreyfuss (**1995**). "A nuclear export signal in hnRNP A1: A signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway." *Cell* 83(3): 415-422.

McCulloch, S. D. et T. A. Kunkel (**2008**). "The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases." *Cell Res* 18(1): 148-161.

Mejat, A. et T. Misteli (**2010**). "LINC complexes in health and disease." *Nucleus* 1(1): 40-52.

Mendelsohn, J. D., S. Y. Yang, J. A. Hiller, A. I. Hochbaum et M. F. Rubner (**2002**). "Rational design of cytophilic and cytophobic polyelectrolyte multilayer thin films." *Biomacromolecules* 4(1): 96-106.

Mertz, D., C. Vogt, J. Hemmerle, J. Mutterer, V. Ball, J.-C. Voegel, P. Schaaf et P. Lavalle (**2009**). "Mechanotransductive surfaces for reversible biocatalysis activation." *Nat Mater* 8(9): 731-735.

Meselson, M. et F. W. Stahl (**1958**). "The replication of DNA in *Escherichia coli*." *PNAS* 44(7): 671-682.

Mettouchi, A., S. Klein, W. Guo, M. Lopez-Lago, E. Lemichez, J. K. Westwick et F. G. Giancotti (**2001**). "Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G1 phase of the cell cycle." *Molecular Cell* 8(1): 115-127.

Miller, T. E., L. A. Beausang, L. F. Winchell et G. P. Lidgard (**1992**). "Detection of nuclear matrix proteins in serum from cancer patients." *Cancer Research* 52(2): 422-427.

Miron-Mendoza, M., J. Seemann et F. Grinnell (**2010**). "The differential regulation of cell motile activity through matrix stiffness and porosity in three dimensional collagen matrices." *Biomaterials* 31(25): 6425-6435.

Mitsushima, M., F. Toyoshima et E. Nishida (**2009**). "Dual role of Cdc42 in spindle orientation control of adherent cells." *Mol Cell Biol* 29(10): 2816-2827.

Miura, M., Y. Miura, H. M. Padilla-Nash, A. A. Molinolo, B. Fu, V. Patel, B.-M. Seo, W. Sonoyama, J. J. Zheng, C. C. Baker, W. Chen, T. Ried et S. Shi (**2006**). "Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation." *Stem Cells* 24(4): 1095-1103.

Moore, S. W., P. Roca-Cusachs et M. P. Sheetz (**2010**). "Stretchy proteins on stretchy substrates: the important elements of integrin-mediated rigidity sensing." *Developmental Cell* 19(2): 194-206.

Morgan, M. R., M. J. Humphries et M. D. Bass (**2007**). "Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(12): 957-969.

Munevar, S., Y.-l. Wang et M. Dembo (**2001**). "Traction force microscopy of migrating normal and H-ras transformed 3T3 fibroblasts." *Biophysical Journal* 80(4): 1744-1757.

Nakayama, J.-i. (**2010**) "The role of chromatin structure in the regulation of gene switching." *Riken Research.*

Nemir, S. et J. L. West (**2010**). "Synthetic materials in the study of cell response to substrate rigidity." *Ann Biomed Eng* 38(1): 2-20.

Nielsen, P. R., D. Nietlispach, H. R. Mott, J. Callaghan, A. Bannister, T. Kouzarides, A. G. Murzin, N. V. Murzina et E. D. Laue (**2002**). "Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9." *Nature* 416(6876): 103-107.

Nigg, E. A. (**2002**). "Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression?" *Nat Rev Cancer* 2(11): 815-825.

Noll, M. et R. D. Kornberg (**1977**). "Action of micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H1." *Journal of Molecular Biology* 109(3): 393-404.

Paszek, M. J., N. Zahir, K. R. Johnson, J. N. Lakins, G. I. Rozenberg, A. Gefen, C. A. Reinhart-King, S. S. Margulies, M. Dembo, D. Boettiger, D. A. Hammer et V. M.

Weaver (**2005**). "Tensional homeostasis and the malignant phenotype." *Cancer Cell* 8(3): 241-254.

Pelc, S. R. et A. Howard (**1955**). "Effect of various doses of X-rays on the number of cells synthesizing deoxyribonucleic acid." *Radiation Research* 3(2): 135-142.

Pelham, R. J., Jr. et Y. Wang (**1997**). "Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility." *PNAS* 94(25): 13661-13665.

Pellinen, T., S. Tuomi, A. Arjonen, M. Wolf, H. Edgren, H. Meyer, R. Grosse, T. Kitzing, J. K. Rantala, O. Kallioniemi, R. Fassler, M. Kallio et J. Ivaska (**2008**). "Integrin trafficking regulated by Rab21 is necessary for cytokinesis." *Dev Cell* 15(3): 371-385.

Picart, C., P. Lavalle, P. Hubert, F. J. G. Cuisinier, G. Decher, P. Schaaf et J. C. Voegel (**2001**). "Buildup mechanism for poly(l-lysine)/hyaluronic acid films onto a solid surface." *Langmuir* 17(23): 7414-7424.

Piñol-Roma, S., Y. D. Choi, M. J. Matunis et G. Dreyfuss (**1988**). "Immunopurification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles reveals an assortment of RNA-binding proteins." *Genes & Development* 2(2): 215-227.

Pinol-Roma, S. et G. Dreyfuss (**1992**). "Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm." *Nature* 355(6362): 730-732.

Piñol-Roma, S. et G. Dreyfuss (**1993**). "hnRNP proteins: localization and transport between the nucleus and the cytoplasm." *Trends in Cell Biology* 3(5): 151-155.

Porcel, C., P. Lavalle, V. Ball, G. Decher, B. Senger, J.-C. Voegel et P. Schaaf (**2006**). "From exponential to linear growth in polyelectrolyte multilayers." *Langmuir* 22(9): 4376-4383.

Porcel, C. H., A. Izquierdo, V. Ball, G. Decher, J. C. Voegel et P. Schaaf (**2005**). "Ultrathin coatings and (poly(glutamic acid)/polyallylamine) films deposited by continuous and simultaneous spraying." *Langmuir* 21(2): 800-802.

Qin, Z. et M.J. Buehler (**2011**). "Flaw tolerance of nuclear intermediate filament lamina under extreme mechanical deformation." ACS Nano 5(4): 3034-3042

Raeber, G. P., M. P. Lutolf et J. A. Hubbell (**2005**). "Molecularly engineered PEG hydrogels: a novel model system for proteolytically mediated cell migration." *Biophys J* 89(2): 1374-1388.

Rajagopalan, H., M. A. Nowak, B. Vogelstein et C. Lengauer (**2003**). "The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer." *Nat Rev Cancer* 3(9): 695-701.

Ramachandran, G. N. (**1956**). "Structure of Collagen." *Nature* 177(4511): 710-711.

Ren, K., T. Crouzier, C. Roy et C. Picart (**2008**). "Polyelectrolyte multilayer films of controlled stiffness modulate myoblast cell differentiation." *Advanced Functional Materials* 18(9): 1378-1389.

Reverte, C. G., A. Benware, C. W. Jones et S. E. LaFlamme (**2006**). "Perturbing integrin function inhibits microtubule growth from centrosomes, spindle assembly, and cytokinesis." *J Cell Biol* 174(4): 491-497.

Richert, L., F. Boulmedais, P. Lavalle, J. Mutterer, E. Ferreux, G. Decher, P. Schaaf, J.-C. Voegel et C. Picart (**2003**). "Improvement of stability and cell adhesion Properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross-Linking." *Biomacromolecules* 5(2): 284-294.

Richert, L., A. J. Engler, D. E. Discher et C. Picart (**2004**). "Elasticity of native and cross-linked polyelectrolyte multilayer films." *Biomacromolecules* 5(5): 1908-1916.

Ridley, A. J. (**2001**). "Rho family proteins: coordinating cell responses." *Trends in Cell Biology* 11(12): 471-477.

Roth, S. Y., J. M. Denu et C. D. Allis (**2001**). "Histones acetyltransferases." *Annual Review of Biochemistry* 70(1): 81-120.

Saif, M. T., C. Sager et S. Coyer (**2003**). "Functionalized biomicroelectromechanical systems sensors for force response study at local adhesion sites of single living cells on substrates." *Annals of Biomedical Engineering* 31(8): 950-961.

Schultz, P., D. Vautier, L. Richert, N. Jessel, Y. Haikel, P. Schaaf, J. C. Voegel, J. Ogier et C. Debry (**2005**). "Polyelectrolyte multilayers functionalized by a synthetic analogue of an anti-inflammatory peptide, alpha-MSH, for coating a tracheal prosthesis." *Biomaterials* 26(15): 2621-2630.

Schwartz, M. A. et D. W. DeSimone (**2008**). "Cell adhesion receptors in mechanotransduction." *Current Opinion in Cell Biology* 20(5): 551-556.

Serrels, B., A. Serrels, V. G. Brunton, M. Holt, G. W. McLean, C. H. Gray, G. E. Jones et M. C. Frame (**2007**). "Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex." *Nat Cell Biol* 9(9): 1046-1056.

Shankar, S. et R. Srivastava (**2007**). Histone Deacetylase Inhibitors: Mechanisms and Clinical Significance in Cancer: HDAC Inhibitor-Induced Apoptosis. Programmed Cell Death in Cancer Progression and Therapy, Springer Netherlands. 615**:** 261-298.

Shin, H., S. Jo et A. G. Mikos (**2003**). "Biomimetic materials for tissue engineering." *Biomaterials* 24(24): 4353-4364.

Singh, P. B., J. R. Miller, J. Pearce, R. Kothary, R. D. Burton, R. Paro, T. C. James et S. J.Gaunt (**1991**). "A sequence motif found in a Drosophila heterochromatin protein is conserved in animals and plants." *Nucleic Acids Research* 19(4): 789-794.

Slautterback, D. B. (**1963**). "Cytoplasmic Microtubules. I. Hydra." *J Cell Biol* 18: 367-388.

Stallmach, A., B. von Lampe, H. Matthes, G. Bornhöft et E. O. Riecken (**1992**). "Diminished expression of integrin adhesion molecules on human colonic epithelial cells during the benign to malign tumour transformation." *Gut* 33(3): 342-346.

Stillman, B. (**2008**). "DNA polymerases at the replication fork in eukaryotes." *Mol Cell* 30(3): 259-260.

Streuli, C. H. (**2009**). "Integrins and cell-fate determination." *Journal of Cell Science* 122(2): 171-177.

Swift, J., I.L. Ivanovska, A. Buxboim, T. Harada, P.C. Dingal, J. Pinter, D.J. Pajerowski, Kr; Spinler, J.W. Shin, M. Tewari, F. Rehfeldt, D.W. Speicher et D.E. Discher (**2013**). "Nuclear lamina-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation." *Science* 341: 1240104-1240114.

Taddei, A., C. Maison, D. Roche et G. Almouzni (**2001**). "Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases." *Nat Cell Biol* 3(2): 114-120.

Tang, X., Q. Wen, T. B. Kuhlenschmidt, M. S. Kuhlenschmidt, P. A. Janmey et T. A. Saif (**2012**). "Attenuation of cell mechanosensitivity in colon cancer cells during *in vitro* Metastasis." *PLoS One* 7(11): e50443.

Thery, M., V. Racine, A. Pepin, M. Piel, Y. Chen, J.-B. Sibarita et M. Bornens (**2005**). "The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis." *Nat Cell Biol* 7(10): 947-953.

Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman*, et al.* (**2001**). "The sequence of the human genome." *Science* 291(5507): 1304-1351.

Versaevel, M., T. Grevesse et S. Gabriele (**2012**). "Spatial coordination between cell and nuclear shape within micropatterned endothelial cells." *Nat Commun* 14(3):671.

Vicente-Manzanares, M., C. K. Choi et A. R. Horwitz (**2009**). "Integrins in cell migration – the actin connection." *Journal of Cell Science* 122(2): 199-206.

Vigushin, D. M., S. Ali, P. E. Pace, N. Mirsaidi, K. Ito, I. Adcock et R. C. Coombes (**2001**). "Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer *in vivo*." *Clinical Cancer Research* 7(4): 971-976.

Vogel, V. et M. Sheetz (**2006**). "Local force and geometry sensing regulate cell functions." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(4): 265-275.

Wang, H. B., M. Dembo et Y. L. Wang (**2000**). "Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 279(5): C1345-1350.

Wang, N., K. Naruse, D. Stamenović, J. J. Fredberg, S. M. Mijailovich, I. M. Tolić-Nørrelykke, T. Polte, R. Mannix et D. E. Ingber (**2001**). "Mechanical behavior in living cells consistent with the tensegrity model." *PNAS* 98(14): 7765-7770.

Wang, N., E. Ostuni, G. M. Whitesides et D. E. Ingber (**2002**). "Micropatterning tractional forces in living cells." *Cell Motility and the Cytoskeleton* 52(2): 97-106.

Wang, N., J. D. Tytell et D. E. Ingber (**2009**). "Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus." *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(1): 75-82.

Watson, J. D. et F. H. C. Crick (**1953**). "Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid." *Nature* 171(4356): 737-738.

Weaver, B. A. A. et D. W. Cleveland (**2007**). "Aneuploidy: instigator and inhibitor of tumorigenesis." *Cancer Research* 67(21): 10103-10105.

Wells, J. T., J. R. Runo et M. R. Lucey (**2008**). "Portopulmonary hypertension." *Hepatology* 48(1): 13-15.

Wittmann, T. et C. M. Waterman-Storer (**2001**). "Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way?" *Journal of Cell Science* 114(21): 3795-3803.

Wozniak, M. A., R. Desai, P. A. Solski, C. J. Der et P. J. Keely (**2003**). "ROCK-generated contractility regulates breast epithelial cell differentiation in response to the physical properties of a three-dimensional collagen matrix." *The Journal of Cell Biology* 163(3): 583-595.

Yoshida, M. (**2008**) "Chemical genetics enables an approach to life phenomena and developments in drug discovery." *Riken Research* 3(10).

Yoshizaki, H., Y. Ohba, K. Kurokawa, R. E. Itoh, T. Nakamura, N. Mochizuki, K. Nagashima et M. Matsuda (**2003**). "Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes." *J Cell Biol* 162(2): 223-232.

Yoshizaki, H., Y. Ohba, K. Kurokawa, R. E. Itoh, T. Nakamura, N. Mochizuki, K. Nagashima et M. Matsuda (**2003**). "Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes." *The Journal of Cell Biology* 162(2): 223-232.

Zaari, N., P. Rajagopalan, S. K. Kim, A. J. Engler et J. Y. Wong (**2004**). "Photopolymerization in microfluidic gradient generators: microscale control of

substrate compliance to manipulate cell response." *Advanced Materials* 16(23-24): 2133-2137.

Zhang, H., F. Landmann, H. Zahreddine, D. Rodriguez, M. Koch et M. Labouesse (**2011**). "A tension-induced mechanotransduction pathway promotes epithelial morphogenesis." *Nature* 471(7336): 99-103.

Zhang, X., A. Chen, D. De Leon, H. Li, E. Noiri, V. T. Moy et M. S. Goligorsky (**2004**). "Atomic force microscopy measurement of leukocyte-endothelial interaction." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 286(1): H359-H367.

Zisch, A. H., M. P. Lutolf, M. Ehrbar, G. P. Raeber, S. C. Rizzi, N. Davies, H. Schmokel, D. Bezuidenhout, V. Djonov, P. Zilla et J. A. Hubbell (**2003**). "Cell-demanded release of VEGF from synthetic, biointeractive cell ingrowth matrices for vascularized tissue growth." *FASEB J* 17(15): 2260-2262.

Publications scientifiques

- Kocgozlu L., **Rabineau M.**, Koenig G., Haïkel Y., Schaaf P., Freund J.-N., Voegel J.-C., Lavalle P., D. Vautier. "The control of chromosome segregation during mitosis in epithelial cells by substrate elasticity." *Biomaterials* (2012); 33: 798-809.

- **Rabineau M.**, Kocgozlu L., Dujardin D., Senger B., Haïkel Y., Voegel J.-C., Freund J.-N., Schaaf P., Lavalle P., D. Vautier. "Contribution of soft substrates to malignancy and tumor suppression during colon cancer cell division." *PloS One* (2013); 8(10):e78468.

- **Rabineau M.**, et al., "Regulation of chromatin plasticity of epithelial cells in response to substrate elasticity." En préparation.

- Vrana E., Erdemli O., Francis G., Fashs A., **Rabineau M.**, Debry C., Tezcaner A., Kestin D. et P. Lavalle. "Double Entrapment of VEGF by PCL nanoparticles loaded into polyelectrolyte multilayer films." En révision dans *Journal Materials Chemistry B*.

Communications

Communications orales

- **Rabineau M**. *PEM elasticity controls chromosome segregation during mitosis: a cell type dependent response.* Kick-off meeting ETH-INSERM U 977, Pr J. Vörös and Dr J.-C. Voegel, Titisee, DE (Novembre 2011).

- **Rabineau M.**, Kocgozlu K., Koenig G., Schaaf P., Voegel J.-C., Lavalle P., D. Vautier. *Soft substrates damage integrin engagement, mitotic spindle and chromosome segregation during mitosis*. MRS Spring Meeting, San Francisco, USA (Avril 2012).

- **Rabineau M.**, Kocgozlu K., Freund J.-N., Voegel J.-C., Schaaf P., Lavalle P., D. Vautier. *Do soft substrates promote malignancy or contribute to tumor suppression ?* SFBMec, Strasbourg, FR (Mars 2013).

Présentations par affiche

- **Rabineau M.**, Kocgozlu L., Koenig G., Voegel J.-C., Schaaf P., Lavalle P. et D. Vautier. *Soft matrix selects a subpopulation of dividing human colon tumors cells.* Workshop NanoPhysics for Health, Mittelwihr, FR (Novembre 2012).

- **Rabineau M.**, Kocgozlu K., Freund J.-N., Voegel J.-C., Schaaf P., Lavalle P., D. Vautier. *Do soft substrates promote malignancy or contribute to tumor suppression?* Workshop Mitosis and Nuclear Structure organisé par *The Compagny of Biologists*, Brighton, UK (Juin 2013).

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé STRASBOURG

Morgane RABINEAU

Influence de l'élasticité du substrat sur la plasticité de la chromatine de cellules épithéliales et sur la division de cellules tumorales

- *Résumé :*

Dans le domaine des biomatériaux, cette thèse s'intéresse à l'influence de l'élasticité du substrat sur la division et la plasticité de la chromatine de cellules épithéliales. La létalité des cellules est corrélée aux faibles rigidités des substrats. Cependant, quelques cellules tumorales SW480, incluant celles portant des anomalies de ségrégation des chromosomes, progressent en mitose. Ces anomalies seraient à l'origine de réarrangements chromosomiques, sources de nombreuses mutations. Les substrats mous conduisent à la formation d'hétérochromatine tandis que les substrats très mous induisent la nécrose des cellules PtK2. Sur ces substrats, l'euchromatine est maintenue après inhibition de HDAC, permettant aux cellules de résister à la nécrose, indépendamment de la compétence transcriptionnelle du noyau. Ces cellules s'étalent à nouveau après transfert sur un substrat rigide. Ces résultats suggèrent 1) une voie de signalisation entrante initiée par le substrat conduisant à la nécrose via la formation d'hétérochromatine 2) une voie de signalisation sortante initiée par l'euchromatine permettant la survie cellulaire.

Mots-clés : films multicouches de polyélectrolytes, mécanobiologie, élasticité du substrat, division cellulaire, instabilité chromosomique, malignicité, plasticité de la chromatine, quiescence.

- *Abstract :*

In the biomaterials field, this PhD work is about influence of substrate elasticity on cell division and chromatin plasticity of epithelial cells. Soft substrates cause massive death. However, some SW480 tumor cells, including those bearing chromosomal segregation abnormalities progress in mitosis. These abnormalities could result in more chromosomal rearrangements, increasing mutations. Soft substrates lead to heterochromatin remodelling and very soft substrates promote necrosis of PtK2 cells. On these substrates, euchromatin could be maintained after HDAC inhibition independently of the nuclear transcriptional competence. These cells spread again after tranfer on stiff substrates. These results suggest i) outside-in signalling cascade initiated at the soft substrate surface leading to heterochromatin remodelling and ultimately necrosis, ii) inside-out signaling cascade initiated from euchromatin allowing cell to overcome necrosis on soft substrate.

Keyswords: polyelectrolytes multilayers films, mechanobiology, substrate elasticity, cell division, chromosome missegregation, malignancy, chromatin plasticity, quiescence.