HAL
open science

Propriétés biophysiques des cardiomyocytes vivants en condition physio/physiopathologique et architecture des récepteurs couplés aux protéines G explorées par microscopie à force atomique

Véronique Lachaize

To cite this version:

Véronique Lachaize. Propriétés biophysiques des cardiomyocytes vivants en condition physio/physiopathologique et architecture des récepteurs couplés aux protéines G explorées par microscopie à force atomique. Chimie thérapeutique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. NNT : 2016TOU30298 . tel-01416906v2

HAL Id: tel-01416906

https://theses.hal.science/tel-01416906v2

Submitted on 19 Jan 2018

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 Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :
Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Cotutelle internationale avec :

Présentée et soutenue par :
Véronique LACHAIZE

Le mardi 11 octobre 2016

Titre :
Propriétés biophysiques des cardiomyocytes vivants en condition physio/physiopathologique et architecture des récepteurs couplés aux protéines G explorées par microscopie à force atomique

---

ED SDM : Chimie, Biologie, Santé - CO 042

Unité de recherche :
Institut des Technologies Avancées en sciences du Vivant (ITAV-CNRS USR 3505)

Directeur(s) de Thèse :
Céline GALES
Etienne DAGUE

Rapporteurs :

Pr. Sid LABDI
Pr. Philippe MANIVET

Autre(s) membre(s) du jury :

Dr. Sofiane EL-KIRAT-CHATEL	Examinateur
Pr. Jean-Michel SENARD	Examinateur
Dr. Childerick SEVERAC	Invité

Avant-propos

Avant toute chose, je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury qui m'ont fait l'honneur de participer à l'évaluation de mes travaux de thèse. Travaux qui n'ont pu exister que grâce à la confiance de mes deux directeurs de thèse, Etienne Dague et Céline Galés. Même si cela n'a pas été toujours facile, je vous remercie de m'avoir permis de faire cette thèse et sachez que je suis très heureuse de l'avoir réalisée. Je tiens à souligner l'immense patience d'Etienne à supporter ma difficulté à communiquer avec le monde exterieur.

Je remercie ensuite l'ensemble des personnes et infrastructures qui ont rendu ce travail possible. Tout d'abord, le directeur de l'Institut des Technologies Avancées du vivant, Pr Ducommun, qui m'a accueilli pendant ces trois années, ainsi que toutes les personnes de cet institut qui m'ont épaulé dans mes démarches et problèmes scientifiques. Merci à Childérick Severac, Jacques Rouquette, Rémi Touron, Camille Libet…

Je remercie également toutes les personnes impliquées dans ce proget de mes differents laboratoires d'accueil, I'Instituts des Maladies Métabolique et Cardiovasculaires et le Laboratoire d'analyse et d'architecture des systèmes, qui m'ont accueilli et m'ont apporté leur aide et leur expertise.

Je souhaite également adresser de vifs remerciements aux personnes qui m'ont accompagné dans cette aventure : Georgy, bien que nous n'avons pas toujours eu la même vision des choses; Marie qui m'a accompagné dès l'aube pour s'occuper des petites souris… ; Mathias et Du qui m'ont bien fait rire pendant c'est 3 ans (et courage, c'est pas encore fini pour vous !) ; Céline Guilbeau pour toujours avoir pris le temps de répondre à mes questions ; Dina pour ton écoute ; Childérick pour ta gentillesse et ton soutien moral sans faille ; Cécile, une super rencontre (j'ai hâte de t'inviter avec toute ta petite famille en NZ) ; et les meilleurs pour la fin la « Team briquet », Arthur, Marion et Yanito, cette thèse m'a offert de superbes rencontres et vous êtes les plus belles (avec une mention spéciale à mon Arthur !)

Enfin, un immence merci à mes sœurs et mes parents, qui ont rendu tout cela possible et qui m'ont supporté. Pour finir, je tiens à dédier ces travaux de thèse à mes grand-parents que j'adore.

Table des matières

AVANT-PROPOS **3**

TABLE DES MATIERES **5**

PRODUCTION SCIENTIFIQUE **8**

LISTE DES FIGURES **10**

LISTE DES ABREVIATIONS **11**

INTRODUCTION **13**

CHAPITRE 1: OVERVIEW PRESENTATION GLOBALE **19**

11. Eléments de cardiologie et intérêt de la microscopie à force atomique en cardiologie **21**
111. Eléments d'anatomo-physiologie cardiaque. 21
112. L'insuffisance cardiaque (IC), un problème de membrane ? 25
113. Projet de thèse : La nécrose des CMs lors de l'IC est-elle la conséquence d'une altération précoce de la ML ? 29
114. La Microscopie à Force Atomique (AFM), une approche innovante en cardiologie 30
115. Travaux de thèse : Etude par AFM de la structure et l'architecture de la membrane latérale du cardiomyocyte 35
115.2 Etude de la membrane latérale de CM par AFM couplé à la microscopie électronique après un infarctus du myocarde. 36

12. Application de l'AFM pour l'étude de récepteurs transmembranaires **44**
121. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) 45
122. La Spectroscopie de Force à l'échelle de la Molécule Unique 47
123. Projet de thèse : Etude par AFM de l'architecture oligomérique des RCPGs sur la membrane cellulaire 49

13. Discussion **56**
131. Avantages de l'AFM dans notre étude 56
132. Limites technologiques et biologiques à nos travaux 57
133. Perspectives (diagnostic, dépistage…) 58

CONCLUSION **60**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **64**

CHAPITRE 2: ARTICLES PRESENTATION DETAILLEE **68**

21. Revue bibliographique **70**
211. Introduction 70

212. AFM, une technologie innovante pour étudier la surface membranaire du CM en condition physio / physiopathologique 72

22. Caractérisation des propriétés nanomécaniques de la membrane des cardiomyocytes en condition d'insuffisance cardiaque 88
221. Introduction 88
222. Etude de la membrane latérale de CM par AFM couplé à la microscopie électronique après un infarctus du myocarde. 92
223. Etude des effets de la doxorubicine sur l'architecture de la membrane latérale des cardiomyocytes, chez la souris. 105

23. Etude par AFM de l'architecture oligomérique des RCPGs sur la membrane cellulaire 143
231. Introduction 143
232. Validation de l'utilisation de l'AFM afin d'étudier les récepteurs transmembranaires 146
233. Etude par spectroscopie de force à l'échelle de la molécule unique de l'architecture oligomérique de protéines membranaires 158

ANNEXES 196

Demande d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques 198

Biophysical properties of cardiomyocytes surface explored by multiparametric AFM 220

Production Scientifique

- PUBLICATIONS

Dague E*, Genet G*, **Lachaize V***, Guilbeau-Frugier C, Fauconnier F, Mias C, Payré B, Chopinet L, Alsteens D, Kasas S, Severac C, Thireau J, Heymes C, Honton B, Lacampagne L, Pathak A, Sénard JM, Galés C,
"Atomic force and electron microscopic-based study of sarcolemmal surface of living cardiomyocytes unveils unexpected mitochondrial shift in heart failure"
J. Mol. Cell. Cardiol., vol. 74, p. 162-172, sept. 2014.

** equal contribution*

Formosa C, **Lachaize V**, Galés C, Rols MP, Martin-Yken H, François JM, Duval RE, Dague E.
"Mapping HA-tagged protein at the surface of living cells by atomic force microscopy"
J MolRecognit. 2015 Jan;28(1):1-9. doi: 10.1002/jmr.2407.

Lachaize V, Formosa C, Smolyakov G, Guilbeau-Frugier C, Galés C, Dague E
"Atomic Force Microscopy: an innovative technology to explore cardiomyocyte cell surface in cardiac physio/pathology"
Letters in applied NanoBioSciences 2015 4. 321-334

Smolyakov G, Cauquil M, Severac C, **Lachaize V,** Guilbeau-Frugier C, Sénard J-M, Galés C, Dague
"Biophysical properties of cardiomyocytes surface explored by multi parametric AFM "
Submitted to Journal of Structural Biology, 2016

Lachaize V, Formosa Dague C, Poirot M, Galandrin S, Sénard JM, Galés C, Dague E
"Single molecule force spectroscopy of HA-Tag GPCRs reveals the impact of receptors organization at the surface of living cells on their behavior to agonist stimulated"
To be submitted

Lachaize V, Cauquil M, Smolyakov G, Guilbeau-Frugier C, Senard JM, Galés C, Dague E
"Doxorubicin effects on the lateral membrane architecture of cardiomyocytes in mice."
To be submitted

- COMMUNICATIONS AFFICHEES

Linz Winter Workshop 2014, Fevrier 2014, Linz, Autriche.
Poster: "AFM-based sarcolemmal surface analysis of living cardiomyocytes unveils unexpected mitochondrial shift in heart failure"

AFMBioMed Conference, Décembre 2014, San Diego, USA
Poster:"AFM-basedsarcolemmal surface analysis of living cardiomyocytes unveils unexpected mitochondrial shift in heart failure"

- COMMUNICATIONS ORALES

L'*imagerie biologique*, Octobre 2014, Toulouse, France
"Exploring modification cardiomyocyte structure in heart failure by AFM and TEM "

Forum de microscopies à sonde locale, Mars 2014, Montauban, France.
"L'analyse AFM de la surface du sarcolemme des cardiomyocytes adultes vivants dévoile un changement mitochondrial inattendu dans l'insuffisance cardiaque"

GDR Workshop, Octobre 2015, Toulouse, France
"Atomic force microscopy: a nanotechnology tool to explore cardiomyocyte surface topography and nanomechanical properties in heart failure condition "

APR 2013, trois ans plus tard, Juin 2016, Toulouse, France
"Utilisation de la microscopie à force atomique pour caractériser les propriétés nanomécanique de la membrane du cardiomyocyte en condition d'insuffisance cardiaque"

Liste des Figures

Figure 1 *: Schéma de coupe de cœur physiologique* *22*
Figure 2 *: Cardiomyocyte adulte, l'unité contractile du cœur* *23*
Figure 3 *: Vue d'ensemble du cardiomyocyte* *24*
Figure 4 *: Techniques d'observation des cardiomyocytes par microscopie..* *25*
Figure 5 *: Etapes cellulaires de la nécrose.* *28*
Figure 6 *: Représentation schématique du principe de fonctionnement de la microscopie à force atomique* *32*
Figure 7 *: Schéma d'une Courbe de Force (CF)* *33*
Figure 8 *: Cartes extraites de la carte non traitée obtenue par spectroscopie de force.* *33*
Figure 9 *: Dispositif expérimentale de la purification des CMs* *35*
Figure 10 *: Infarctus du myocarde* *36*
Figure 11 *: Cinétique d'observation* *36*
Figure 12 *: Cardiomyocyte en condition normale* *37*
Figure 13 *: Observation par AFM et TEM de la structure du CMaprès infarctus du myocarde..* *38*
Figure 14 *: Cinétique d'observation chimiothérapie basée sur la Doxorubicine.* *40*
Figure 15 *: Analyse de la structure de la membrane latérale du cardiomyocyte par AFM en mode spectroscopie de force.* *42*
Figure 16 *: Fonctionnalisation de la pointe AFM par un anticorps* *47*
Figure 17 *: Spectroscopie de Force à l'échelle de la molécule unique associé au système HA fusionné au RCPG et anticorps Anti-HA* *49*
Figure 18 *: Répartition des différentes population oligomérique selon les conditions.* *53*

Liste des abréviations

AFM	*Microscopie à force atomique*
ARβ2	*Récepteurs beta-adrénergiques beta 2*
AT1	*Récepteurs de l'angiotensine II de type 1*
CF	*Courbe de forces*
CHO	*Chinese hamster ovary*
CM	*Cardiomyocyte*
DI	*Disque Intercalaire*
Dox	*Doxorubicine*
ECM	*Matrice extracellulaire*
ELIA	*Ingénierie pour les Sciences du Vivant*
FRM	*Fondation pour la Recherche Médicale*
HA	*Human influenza hemagglutinin*
IC	*Insuffisance cardiaque*
IFM	*Mitochondrie interfibrillaire*
ITAV	*Institut des Technologies en sciences du Avancées du Vivant*
I2MC	*Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires*
LAAS-CNRS	*Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes du CNRS*
mGlu3	*Récepteurs métabotropes du glutamate de type 3*
ML	*Membrane latérale*
PAR1	*Protéase activée 1*
PRES	*Pôles de Recherche et d'Enseignement Supérieur*
RCPG	*Récepteurs couplés aux protéines G*
ROS	*Espèces réactives oxygénées*
SF	*Mode spectroscopie de force*
SMSF	*Spectroscopie de force à l'échelle de la molécule unique*
SSM	*Mitochondrie subsarcolemmale*
TEM	*Microscopie électronique à transmission*
TT	*Tubules transverses*
VD	*Ventricule droit*
VG	*Ventricule gauche*
YM	*Module de Young*

Introduction

Ma thèse s'intitule, « Propriétés biophysiques des cardiomyocytes vivants en condition physio/physiopathologique et architecture des récepteurs couplés aux protéines G explorée par microscopie à force atomique ». Comme le titre l'indique mes travaux se caractérisent par une forte interdisciplinarité, à l'interface de la physique, de la chimie et de la médecine. Ce sujet a été possible grâce à la création d'une équipe projet de « nanocardiologie » hébergée au sein de L'Institut des Technologies Avancées en sciences du Vivant (ITAV) à Toulouse. Cette équipe est née de la collaboration entre Céline Galés chercheur de l'Inserm (I2MC : Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires) qui travaille sur les déterminants moléculaires et cliniques de l'architecture cardiaque et Etienne Dague, chercheur du CNRS, qui quant à lui étudie les propriétés biophysiques des interfaces cellulaires au sein de l'équipe ELIA (Ingénierie pour les Sciences du Vivant) du Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes du CNRS (LAAS-CNRS). Cette équipe projet alliant une expertise en cardiologie et des compétences dans la caractérisation biophysique des interfaces biologiques a permis l'émergence de nouvelles questions dans le domaine de la cardiologie et plus précisément dans l'insuffisance cardiaque (IC) et ses cibles thérapeutiques. Je me suis intégrée à cette équipe et ma thèse portant, entre autres, sur l'évolution de la membrane latérale(ML) du cardiomyocyte (CM) lors de l'installation d'une IC a été financée par la région Midi Pyrénées et les Pôles de Recherche et d'Enseignement Supérieur (PRES) de Toulouse. Le projet a également reçu le soutien de la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) qui a payé un ingénieur de recherche pendant 2 ans. Enfin l'équipe, et moi-même, nous sommes appuyés sur la plateforme de Mécanobiologie de l'ITAV, dirigée par Childérick Severac.

Concrètement, pour ces travaux de thèse nous avons utilisé une technologie issue des nanosciences : la microscopie à force atomique (AFM) pour répondre de façon originale à l'interrogation sur l'évolution de la membrane de l'unité contractile du cœur, le CM, lors de l'installation de l'IC, et en parallèle nous avons contribué de façon novatrice aux débats sur l'organisation des Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPGs).

Cette question de cardiologie concernant le mécanisme de l'évolution vers l'insuffisance cardiaque (IC), trouve son intérêt dans le fait que cette pathologie cardiovasculaire est la plus meurtrière dans le monde, et malgré les nombreuses recherches dans le domaine certains points ne sont pas encore résolus. En effet au cours de l'IC, tous les constituants cellulaires du myocarde sont affectés et sont à l'origine d'une modification architecturale globale du tissu cardiaque. Cependant, c'est l'unité contractile du myocarde, le cardiomyocyte (CM) qui semble présenter les altérations subcellulaires les plus marquées. La plus caractéristique est l'hypertrophie qui permet

de compenser l'augmentation du travail cardiaque. Néanmoins, pour des raisons encore inconnues, avec le temps et l'installation de l'IC, cette hypertrophie du CM passe à un stade délétère conduisant à la mort du CM. Cette mort est essentiellement représentée par des mécanismes de nécrose qui est une caractéristique biologique de l'IC avancée. La membrane latérale (ML) du CM (qui est la membrane plasmique se situant particulièrement en position latéral de la cellule lors de sa section longitudinal) est impactée lors de ces phénomènes de nécrose, avec des fragilités physiques et des anomalies de l'intégrité des propriétés de la surface qui seront probablement la cause de la rupture nécrotique de cette membrane. De plus une étude précédente a montré, grâce au Scanning Ion Conductance Microscopy (SICM), qu'en situation d'IC, la ML perd sa structure ionique[5], ce qui laisse suggérer un impact sur sa morphologie ainsi que sur ses propriétés nanomécaniques. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon premier travail de thèse qui s'intéresse à l'évolution des caractéristiques morphologiques et biophysiques de la ML des CMs lors de l'installation de l'IC. Nous avons cherché à observer les modifications topographiques et mécaniques précoces de la ML pouvant être initiatrices de cette fragilité membranaire. Ainsi que déterminer si les anomalies d'intégrité de la ML sont un phénomène commun aux IC provoquées de différentes façons. Pour cela nous avons choisi une approche habituellement utilisée en physique pour caractériser la surface de matériaux : l'AFM. L'AFM permet d'observer la topographie de la surface des CMs et permet d'obtenir des données nanomécaniques de la ML. Les mesures ont été réalisées dans des conditions proches du vivant grâce à l'isolement de CMs adultes à partir de cœur de souris (C57/BL6 âgées de 8 semaines) et des acquisitions en atmosphère contrôlée (CO_2 et 37°C). Pour répondre à ces questions, nous avons observé l'évolution de CMs lors de l'installation d'une IC induite par deux facteurs différents :

- La ligature de coronaires qui induit un infarctus du myocarde et une IC ;
- Un traitement à la doxorubicine (Dox) (anticancéreux ayant une toxicité cardiaque connue) qui induit une IC dose dépendant

Pour l'étude biophysique des CMs issus de ces deux modèles d'IC, nous avons utilisé le mode Spectroscopie de Force. Nous avons alors analysé, la surface membranaire de CMs isolés à différents temps en amont de la déclaration de l'IC.

Pour ce qui est du modèle « infarctus du myocarde », nous avons cherché à montrer, en couplant l'AFM et la Microscopie Electronique à Transmission (TEM), l'impact d'un infarctus du myocarde provoqué par ligature permanente de coronaires, sur la structure et les propriétés nanomécaniques de la ML. Le TEM permettra d'observer les changements morphologiques au niveau intracellulaire, alors que l'AFM montre les modifications de la topographie de la surface. Le couplage entre le TEM et l'AFM devrait montrer des corrélations originales entre ces différentes données morphologiques et mécaniques.

En ce qui concerne le second modèle, une IC d'installation lente survenant à la suite d'une chimiothérapie basée sur la Dox, nous étudierons par AFM, la surface des CMs préalablement isolés de cœur de souris ayant reçu une injection hebdomadaire de Dox. Ces observations se feront à différentes doses reçues afin d'étudier l'évolution du CM jusqu'à la mise en place de l'IC. Ces travaux aideront à comprendre les mécanismes précis impliqués dans la mise en place d'une IC, et permettront d'agir de façon plus précoce et ciblée, pour les patients, lors des premiers signes, avant que l'IC soit totalement installée et que les dommages cardiaques soient irrémédiables comme c'est le cas aujourd'hui.

En parallèle de ce sujet nous avons étudié l'architecture de cibles thérapeutiques visées pour traiter les symptômes liés à l'IC. En effet les traitements médicamenteux de l'IC font intervenir des molécules telles que les béta bloquants et les vasodilateurs, couramment utilisés pour améliorer la qualité de vie en réduisant les symptômes et en maintenant l'activité de la vie quotidienne. Cependant ces médicaments présentent de nombreux effets secondaires qui doivent être limités au maximum afin que leur bénéfice ne soit pas atténué par des effets non désirés. Ces molécules ciblent la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) comme d'ailleurs beaucoup d'autres médicaments sur le marché. De nombreuses études ont été effectuées pour tenter d'améliorer ces traitements, les rendre plus spécifiques et mieux comprendre les raisons de ces effets secondaires afin de les diminuer voire de les supprimer. Ces recherches ont révélé un aspect encore inconnu qui pourrait être la clef de la compréhension de ces effets non désirés : la régulation de l'activité de ces récepteurs par leur organisation oligomérique. En effet, une étude récente a montré un lien entre l'oligomérisation des RCPGs et les effets secondaires induits par une molécule synthétique par rapport à son homologue naturelle. Dans ce contexte, nous nous sommes proposés d'observer l'architecture oligomérique des RCPGs dans différentes conditions, (après stimulation de différents agonistes, densité de récepteurs exprimés sur la membrane croissante). Pour ce projet nous avons utilisé une technologie particulière de l'AFM, la Spectroscopie de Force à l'échelle de la Molécule Unique (SMFS). Dans cette technologie, les pointes AFM interagissent avec des biomolécules immobilisées sur des substrats ou des biomembranes artificielles ou même présentes à la surface de cellules vivantes afin d'en étudier les interactions intra et inter-moléculaires. Pour rendre l'interaction entre la pointe et la molécule étudiée spécifique, il est nécessaire de fonctionnaliser la pointe. La fonctionnalisation consiste à lier à la pointe un anticorps spécifique ciblant la protéine d'intérêt, cependant il peut être difficile d'obtenir l'anticorps reconnaissant la protéine. Pour surmonter cette difficulté, nous avons utilisé des RCPGs (B2-AR , AT1, et mGlu3), préalablement fusionnés en N-terminal avec l'épitope HA. Celui-ci pourra alors être détecté par la pointe AFM fonctionnalisée avec un anticorps anti-HA. Lorsqu'une interaction spécifique entre la pointeanti-HA et le tag HA du RCPG a lieu, les courbes de retrait montrent un pic d'adhésion spécifique, qui se caractérise par sa force de rupture et la

distance de rupture entre la pointe et la surface. L'utilisation de la SMFS permet une approche innovante pour l'étude de l'architecture oligomérique des RCPGs par l'analyse des distances de déploiement des interactions. Ces distances de rupture représentent le déploiement d'un RCPG plus ou moins oligomérisés, et permettent de comparer les différentes proportions de population oligomériques en fonction des différentes conditions. Néanmoins, avant de pouvoir analyser les distances de rupture, il a fallu dans un premier temps valider le système « HA / Anti-HA ». Puis, une fois cette validation réalisée, nous avons observé l'effet de la densité de récepteurs présents sur la surface membranaire sur le degré d'oligomérisation des récepteurs. Pour cela nous avons transfecté des quantités de plasmides codant les RCPGs croissantes (0,01µg/0,1µg/1µg). L'impact de différents ligands synthétiques et endogènes (Angiotensine II pour AT1, Isoprotérenol/Epinephrine/Norepinephrine pour ARβ2) sur l'architecture de ces molécules dans la membrane a également été analysé. Cette étude permettra une meilleure compréhension de l'effet de l'oligomérisation sur l'activité des RCPGs. Dans l'avenir ces connaissances seront utiles pour élaborer de nouvelles molécules, ciblant certaines formes oligomériques des RCPGs, dans le but de limiter les effets secondaires et d'augmenter leur spécificité et efficacité.

Ces deux approches interdisciplinaires, la spectroscopie de force appliquée aux CMs isolés et vivants ainsi que la SMFS couplée à l'outil du tag HA en N-terminal des RCPGs, permettent d'aborder des questions innovantes que ce soit dans l'étude de l'IC ou dans le domaine des RCPGs. Les stratégies biologiques et expérimentales mises en place ont fourni des données et résultats originaux.

La suite de mon mémoire de thèse est organisée de la façon suivante :

- Le premier chapitre est une synthèse de mes travaux avec une première partie ciblée sur l'étude du CM en condition d'IC et une seconde partie qui décrira le contexte de l'étude des RCPGs ainsi que l'examen que nous avons effectué sur l'oligomérisation. Cette partie se termine par une discussion globale des résultats de cette thèse, et les perspectives envisagées.

- Le second chapitre est constitué par les articles déjà publiés ou soumis ou à soumettre. Il est divisé en 2 parties et consiste en une présentation détaillée de mes travaux. La première regroupe les articles concernant la cardiologie.

Dans la partie cardiologie, nous présentons une étude bibliographique intitulée :

Lachaize V, Formosa C, Smolyakov G, Guilbeau-Frugier C, Galés C, Dague E
"Atomic Force Microscopy: an innovative technology to explore cardiomyocyte cell surface in cardiac physio/pathology"(publié en 2015 dans *Letters in applied NanoBioSciences,4. 321-334*),

puis une introduction aux deux articles suivants :

Dague E*, Genet G*, Lachaize V*, Guilbeau-Frugier C, Fauconnier F, Mias C, Payré B, Chopinet L, Alsteens D, Kasas S, Severac C, Thireau J, Heymes C, Honton B, Lacampagne L, Pathak A, Sénard JM, Galés C
"Atomic force and electron microscopic-based study of sarcolemmal surface of living cardiomyocytes unveils unexpected mitochondrial shift in heart failure" (publié en 2014 dans *Journal of Molecular and Cellular Cardiology,vol. 74, p. 162 -172*),

* equal contribution

et

Lachaize V, Cauquil M, Smolyakov G, Karsenti C,Severac C,Guilbeau-Frugier C, Senard JM, Galés C, Dague E
"Etude des effets de la doxorubicine sur l'architecture de la membrane latérale des cardiomyocytes, chez la souris" (à soumettre)

La seconde partie est constituée par les articles sur les RCPGs. Le premier, publié dans Journal of Molecular recognition :

Formosa C, Lachaize V, Galés C, Rols MP, Martin-Yken H, François JM, Duval RE, Dague E.
"Mapping HA-tagged protein at the surface of living cells by atomic force microscopy" (publié en 2015 dans *Journal of Molecular Recognition, 1-9. doi: 10.1002/jmr.2407*)

détaillant la validation de la stratégie Tag-HA pour les RCPGs et l'article en préparation sur les RCPGs (effet de la densité et des agonistes sur l'oligomérisation) :

Lachaize V, Formosa Dague C, Poirot M, Galandrin S, Sénard JM, Galés C, Dague E
"La Spectroscopie de Force à l'échelle de la molécule unique appliquée aux RCPGs taggés HA révèle l'organisation et la dynamique des récepteurs à la surface de cellules vivantes" (à soumettre)

Chapitre 1: Overview Présentation Globale

11. Eléments de cardiologie et intérêt de la microscopie à force atomique en cardiologie

12. Application de l'AFM pour l'étude des récepteurs transmembranaires

13. Discussion

11. Eléments de cardiologie et intérêt de la microscopie à force atomique en cardiologie

111. Eléments d'anatomo-physiologie cardiaque.

La cardiologie est la spécialité étudiant le cœur et les maladies associées. Mais avant de comprendre et d'espérer pouvoir traiter les pathologies associées il a fallu apprendre à connaître la physiologie et le rôle du cœur. Déjà à l'époque de l'Egypte antique, dans les papyrus, l'existence des pulsations cardiaques étaient décrites. Depuis toujours, le cœur fascine les Hommes et cet intérêt n'a fait que croître au fil des siècles, jusqu'à la naissance de la cardiologie en tant que discipline médicale à part entière au XVIIème siècle[1]. Aujourd'hui, ce domaine de recherche est toujours plus actif ce qui se justifie par l'importance que prennent les maladies cardiovasculaires dans le monde. En effet, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le nombre de décès imputable aux maladies cardiovasculaires est estimé, dans le monde, en 2015, à 17,5 millions (dont 7,4 millions sont dus aux pathologies cardiaques) ; ce qui en fait la première cause de mortalité dans le monde[2]. Et selon le rapport de l'OMS, la fraction de la population exposée aux facteurs de risques comportementaux (antécédents familiaux, tabagisme, sédentarisation, surpoids, cholestérol, obésité…) augmente ; ce qui a pour conséquence l'augmentation parallèle de la prévalence des pathologies cardiovasculaires, et plus particulièrement des pathologies cardiaques[3]. Avant de chercher à identifier les anomalies cardiaques provoquant ces maladies cardiovasculaires, il est donc important de définir les caractéristiques du cœur à l'état physiologique.

111.1 La physiologie du Cœur

Le cœur est l'organe central du système cardiovasculaire dont la fonction est d'assurer une circulation sanguine en adéquation avec les besoins de l'ensemble des cellules de l'organisme. Il est composé de deux cavités supérieures (l'oreillette droite et l'oreillette gauche) et de deux cavités inférieures (le ventricule droit et le ventricule gauche) qui communiquent entre-elles (**Fig. 1**) par les valves tricuspide et mitrale.

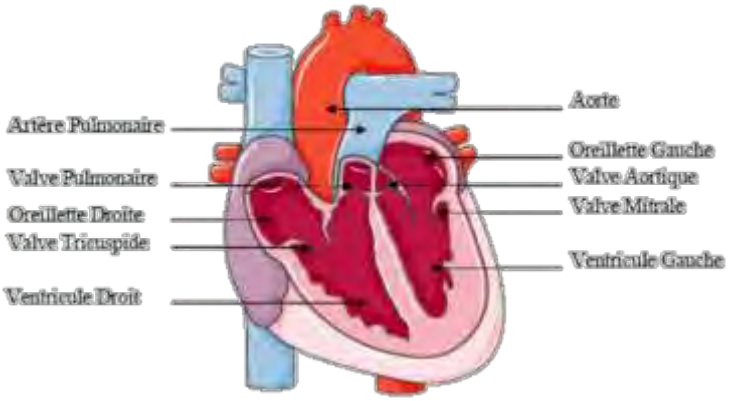


Figure1 *: Schéma de coupe de cœur physiologique*

Cet organe est divisé, verticalement, en deux par les septums inter-auriculaires et inter-ventriculaires qui séparent la partie droite de la partie gauche. Le cœur comprend donc deux unités fonctionnelles distinctes appelées « cœur droit » et « cœur gauche », chacune étant composée d'une oreillette et d'un ventricule.

Cette organisation particulière du cœur permet de créer deux circulations sanguines parallèles avec des sous-fonctions différentes. Le passage du sang du « cœur droit » vers le « cœur gauche » en passant par les poumons constitue la « petite circulation » dont le but est d'oxygéner le sang. Le transport de celui-ci du « cœur gauche » vers le « cœur droit » en passant par les organes correspond, pour sa part, à la « circulation systémique » qui vise à oxygéner et fournir en nutriments les différents organes de l'organisme ainsi que les débarrasser de leur CO_2 et de leurs déchets. Le mécanisme de circulation sanguine nécessite l'alternance d'une phase de relaxation du cœur (diastole), durant laquelle le cœur se remplit de sang, et d'une phase de contraction (systole) qui permet l'éjection du sang vers les artères. Le cœur, par cette activité rythmique consistant à alterner état relaxé et état contracté, remplit la fonction d'une pompe[4]. Les phénomènes impliqués dans la contraction et la relaxation du cœur sont assurés par le tissu musculaire cardiaque, ou myocarde, dont l'unité cellulaire contractile, des cellules musculaires très spécialisées, sont appelées cardiomyocytes (CMs) (**Fig. 2**). L'activité mécanique coordonnée de ces cellules, conduit à la contraction cardiaque [5].

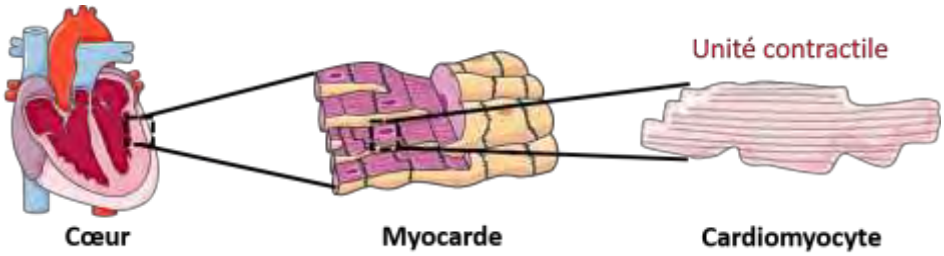


Figure 2 : ***Cardiomyocyte adulte, l'unité contractile du cœur***

111.2 Le cardiomyocyte

Le CM adulte est une cellule hautement différenciée et polarisée. Elle est caractérisée par une morphologie rectangulaire, d'une longueur comprise entre 100 et 150 µm, une largeur de 10 à 20 µm ainsi qu'une épaisseur de 10 à 30 µm[6], ces dimensions sont conservées chez toutes les espèces. D'un point de vue structurel, le CM mature comprend différents compartiments organisés comme suit (**Fig.3**):

- La membrane latérale (ML ou sarcolemme), représente la membrane se trouvant en position latérale de la membrane plasmique du CM lors d'une section longitudinale. Elle joue un rôle clé dans l'interface avec la matrice extracellulaire (ECM) mais aussi dans la fonction contractile ainsi que l'organisation tridimensionnelle du tissu cardiaque. En outre, la ML des CMs adultes se caractérise par la présence de multiples invaginations intracellulaires tubulaires appelées Tubules Transverses (TT), dessinant un réseau complexe autour des myofibrilles. Les structures TT sont responsables du couplage excitation-contraction du CM, et permet donc la transmission en profondeur du potentiel d'action responsable d'une contraction homogène à travers tout le CM.
- Le Disque Intercalaire (DI), localisé à l'extrémité longitudinale des CMs leur permet une interaction directe et étroite les uns avec les autres. Ces interconnexions directes entre cellules assurent la synchronisation de la contraction entre deux CMs adjacents.
- Les myofibrilles jouent un rôle important dans l'architecture et la fonction des CMs car elles constituent la base de leur activité contractile. Les myofibrilles contribuent également à l'organisation spatiale des autres composants cytoplasmiques tels que les mitochondries interfibrillaires (IFM), fournissant l'alimentation en énergie nécessaire à la contraction du CM. Chaque myofibrille est divisée en plusieurs unités contractiles appelées sarcomères, composé de filaments d'actine et de myosine et chaque sarcomère est délimitée par deux stries Z.

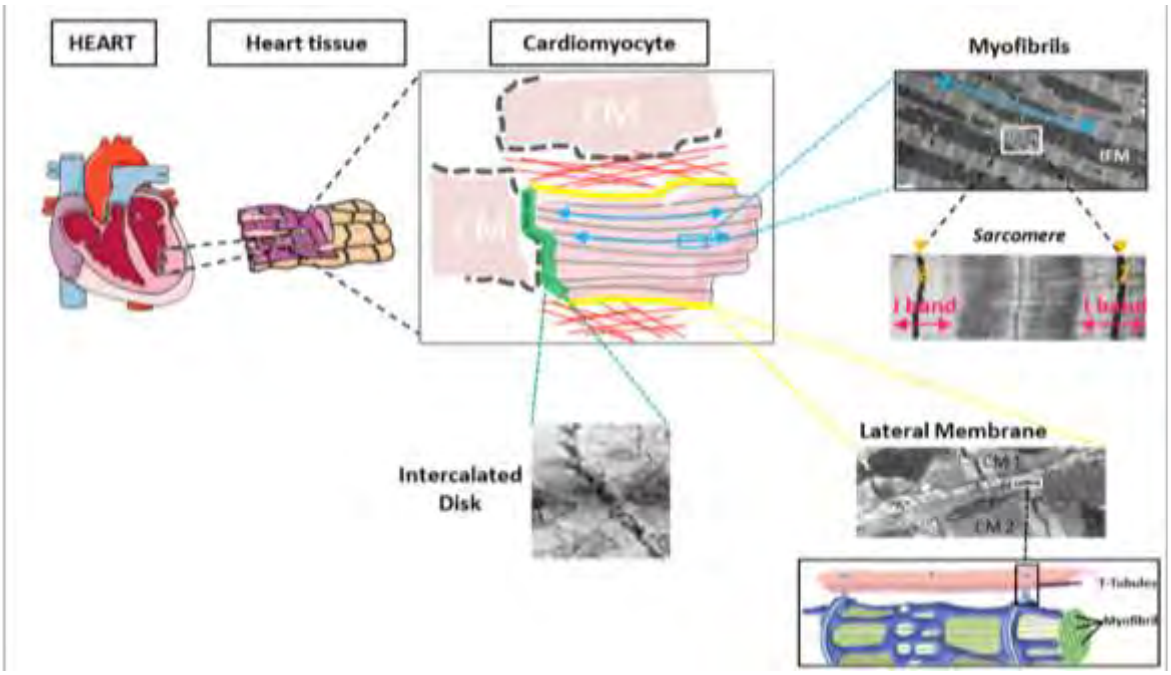


Figure 3 : ***Vue d'ensemble du cardiomyocyte****. CM = cardiomyocytes ; Rouge = Matrice extracellulaire ; Bande verte = disque intercalaire ; Bande jaune = membrane latérale ; Les flèches bleues = myofibrilles ; IFM = mitochondries interfibrillaires ; Z = ligne Z. images de microscopie électronique illustrant les différents domaines spécialisés présentés.*

Les cardiopathies affectant la fonction contractile du cœur sont induites par une dysfonction directe de l'unité contractile du cœur, le CM. Ces anomalies peuvent être métaboliques[5,7,8] ou structurales[9–11]. Afin d'observer ces anomalies potentielles de structures des CMs, différentes techniques sont à la disposition des cardiologues .La microscopie optique est l'outil de choix, elle peut être couplée à des méthodes de coloration et à la fluorescence pour marquer spécifiquement telle ou telle structure du CM (ex : marquage de l'α actinine pour mettre en évidence les myofibrilles).La microscopie électronique ainsi que des microscopies à sondes locales (microscopie à conductances ioniques, microscopie à force atomique) sont utilisées par les chercheurs mais ne font pas partie des outils habituels du biologiste hospitalier. Ces méthodes d'observation de la structure des CMs sont décrites dans notre étude bibliographique publiée en 2015 dans Letters in applied NanoBioSciences, Lachaize et al., : « Atomic force microscopy: an innovative technology to explore cardiomyocyte cell surface structure in cardiac physio/pathophysiology » (cf. Chapitre II) (**Fig. 4**).

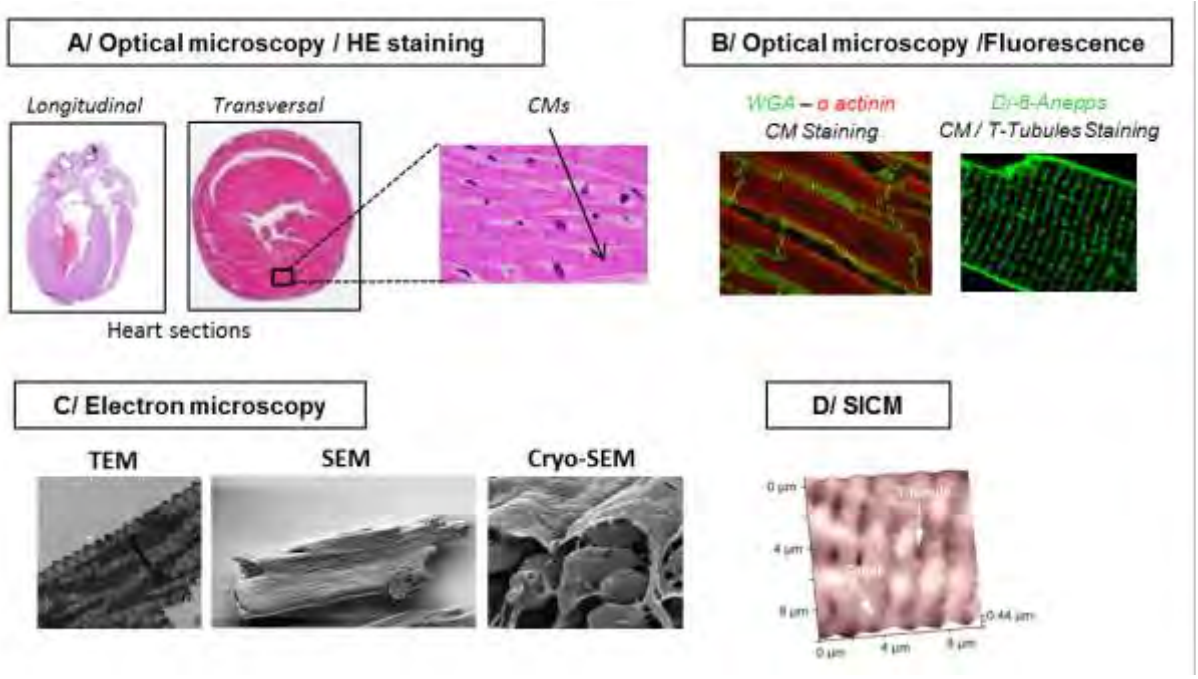


Figure 4 : ***Techniques d'observation des cardiomyocytes par microscopie****. (**A**) la morphologie du CM observé par **microscopie optique couplée à la coloration d'hématoxyline et d'éosine** (HE) ou (**B**) La **microscopie couplée à la fluorescence** (**C**) La **microscopie électronique** a permis de donner accès aux détails ultrastructuraux du CM par la microscopie électronique à transmission (TEM), ainsi que la morphologie tridimensionnelle des CMs par microscopie électronique à balayage (SEM) ou par Cryo-SEM. (**D**) Topographie de la ML du CM déduite par analyse en **microscopie de conductance ionique** (SICM).*

112. L'insuffisance cardiaque (IC), un problème de membrane ?

112.1 Description de l'IC

Dans les pays industrialisés, l'IC est une pathologie cardiaque qui constitue un véritable problème de santé publique. En France, plus d'un million de personnes sont atteintes d'une IC et 120 000 d'entre elles seront hospitalisées chaque année. Cette pathologie est ainsi la première cause d'hospitalisation chez l'adulte en France. De plus elle est responsable de 32000 décès[12] chaque année. Cette pathologie est devenue une urgence de la recherche biomédicale comme le montre la production scientifique sur le sujet (en 2015, 11 500 articles ont été publiés dans le domaine et référencer dans pubmed avec le mot clef « heart failure »).

Bien que les concepts physiopathologiques de l'IC soient en continuelle évolution, la majorité des théories et des chercheurs s'accordent pour définir l'IC comme : l'incapacité du cœur à fournir un débit suffisant pour satisfaire les dépenses énergétiques de l'organisme. Ce déclin des performances globales de la pompe cardiaque jusqu'à l'installation de l'IC se divise en 2 étapes. La première, appelée compensation, est le point de départ des mécanismes d'adaptation du myocarde afin de tenter de maintenir un débit suffisant. C'est une étape transitoire qui évolue irrémédiablement vers la seconde étape, appelée décompensation, et qui se traduit par une diminution du débit cardiaque et une vasoconstriction périphérique excessive entretenant la

surcharge mécanique en pression et volume du myocarde (déclin des performances du cœur). L'IC n'est pas un simple problème mécanique, mais plutôt une pathologie cardio-circulatoire impliquant des mécanismes d'adaptation qui conduisent à des modifications biologiques et structurales du myocarde[13]. Ce remodelage cardiaque représente ainsi la transition entre un phénomène physiologique d'adaptation et un phénomène pathologique d'altération expliquant l'installation progressive de l'IC dans le temps[14]. Les étapes essentielles au développement et à la progression de l'IC incluent des changements dans l'architecture et la géométrie du cœur, principalement au niveau des ventricules, appelé remodelage ventriculaire. Néanmoins, les mécanismes de remodelage conduisant à l'hypertrophie et à la compensation ne sont pas encore clairement établis. De même les processus amenant à la phase de décompensation sont inconnus. Il existe différents modèles de remodelage cardiaque ventriculaire en fonction du stimulus pathologique initial[15]:

- Les pathologies hypertensives et les sténoses aortiques, induisant une surcharge de pression dans le cœur, entrainant un remodelage dit « concentrique » se caractérisant par une augmentation de l'épaisseur myocardique au dépend de la cavité ventriculaire.
- Les cardiomyopathies dilatées et les valvulopathies, induisant une augmentation de contrainte en diastole, entrainent un remodelage dit « excentrique » se manifestant par une dilatation ventriculaire et un amincissement pariétal. L'infarctus du myocarde, entraine une perte tissulaire provoquée par une obstruction coronarienne, artère qui alimente le cœur en sang et en oxygène. Privées d'oxygène, les CMs meurent rapidement par nécrose (Cf § 2.2 Nécrose) sur une zone plus ou moins étendue. Cela entraîne des troubles contractiles du myocarde, se manifestant par des troubles du rythme, une insuffisance cardiaque, voire l'arrêt du cœur. La seule solution est la reperfusion du cœur en débouchant l'artère le plus rapidement possible après le début des symptômes. Mais cette zone nécrotique va induire dans un premier temps une hypertrophie ventriculaire associé à une fibrose à la fois dans la zone infarcie et avoisinante qui évolue dans le temps vers un amincissement pariétal et une dilatation ventriculaire

Au cours de l'IC, tous les constituants cellulaires du CM sont affectés et sont à l'origine d'une modification architecturale globale du tissu cardiaque. Néanmoins, c'est le CM qui semble présenter les altérations subcellulaires les plus marquées, dont la plus caractéristique est l'hypertrophie, qui permet de compenser l'augmentation du travail cardiaque. Néanmoins, pour des raisons encore inconnues, lorsque les stimuli pathologiques persistent, cette hypertrophie du CM passe à un stade délétère conduisant à la mort du CM. Cette mort est essentiellement représentée par des mécanismes de nécrose qui est une caractéristique histologique des patients présentant un stade d'IC avancé[16].

112.2 Nécrose

La nécrose a été la première forme de mort cellulaire mise en évidence en 1858 par Dr. Rudolf Virchow[17] comme un procédé passif de dégénérescence. Aujourd'hui, elle peut être définie comme une réponse à une agression structurale ou chimique dont la cellule ne peut se remettre. Elle n'est pas déterminée par des facteurs intrinsèques, mais uniquement par des perturbations de l'environnement. Elle est l'aboutissement de conditions d'agressions, non physiologiques, et n'est pas déclenchée de façon "programmée". Elle peut être induite par différents stimuli tels qu'une hypoxie, des agents physiques (traumatismes mécaniques, thermiques, radiations), chimiques et/ou infectieux (virus, bactéries, champignons, parasites), ou des réactions immunologiques… La nécrose a longtemps été considérée comme seulement un phénomène de mort cellulaire "non programmée" et provoquée par un déséquilibre dans les flux ioniques membranaires (plasmique et des organites). Il se traduit par la pénétration massive d'eau dans le cytosol ce qui conduit à la turgescence des organites et de la cellule en général. L'ADN nucléaire est dégradé de manière "aléatoire" par des endonucléases. Le gonflement de la cellule se résout par la rupture de la membrane et la libération du contenu intracellulaire. Cela provoque la mort cellulaire ainsi qu'une inflammation[18,19] (**Fig. 5**).

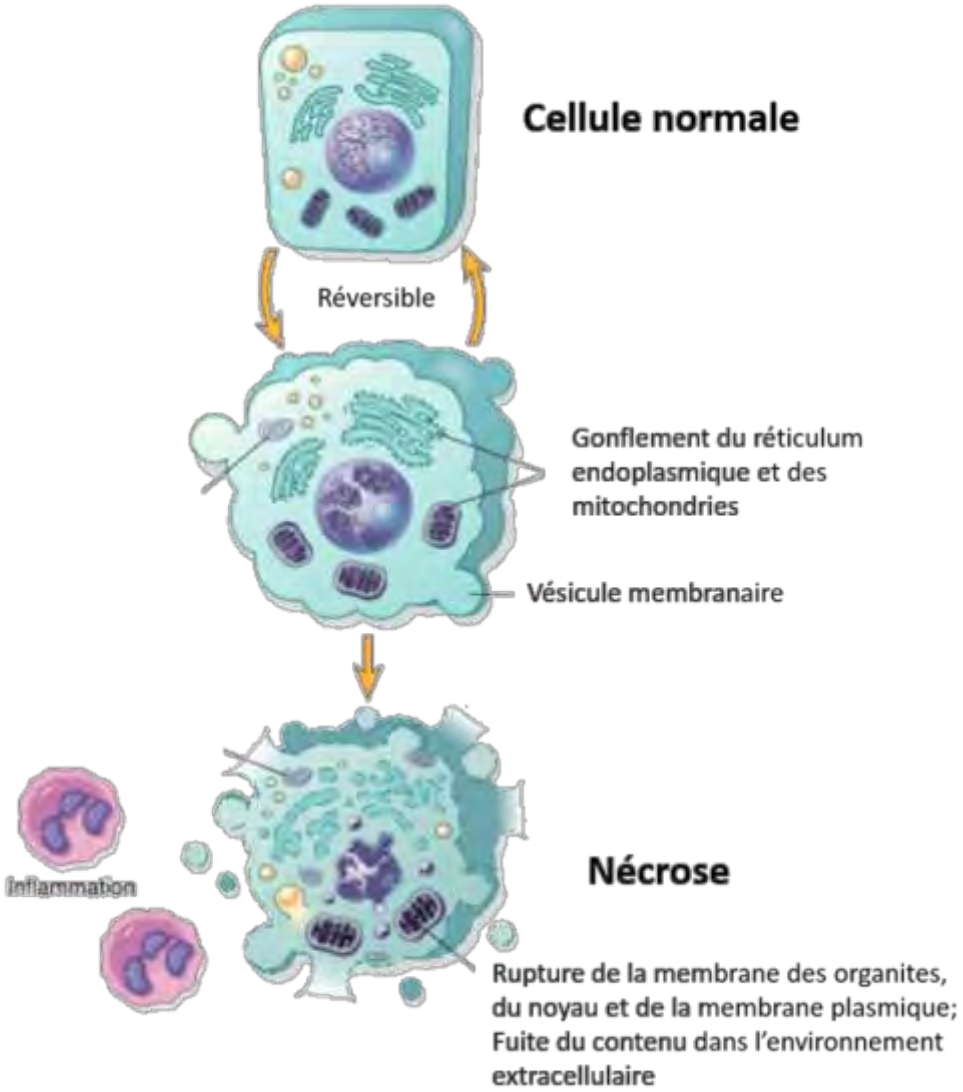


Figure 5 : ***Etapes cellulaires de la nécrose.*** *Représentation des principaux changements morphologiques avec le gonflement des organites et de la cellule suivie de la rupture des membranes des organites, de la membrane nucléaire ainsi que de la membrane plasmique. (adaptée de Art of Medecine).*

Cependant aujourd'hui la nécrose n'est plus limitée à une mort cellulaire désordonnée et accidentelle. En effet de récentes études révèlent l'existence d'une nécrose induite, physiologique[20–22] dont les dérégulations sont pathologiques. Donc dans la nécrose, trois catégories se forment :

- La nécrose accidentelle : en réponse à une agression environnementale amenant à une rupture de la membrane plasmique provoquant une mort cellulaire dite " désordonnée "
- La nécrose non programmée : en réponse à une agression environnementale sans rupture membranaire et induite par une succession d'étapes organisées.
- La nécrose induite : maintien de l'homéostasie chez l'adulte et est le résultat d'un processus structuré et organisé.

Dans le cas particulier des CMs en condition d'IC, qui nous intéresse pour notre étude, la ML va donc être impactée lors de ces mécanismes de nécrose, avec des fragilités physiques de la membrane.

112.3 Etude de la membrane latérale du CM dans l'IC

Précédemment, nous avons vu que lors de la phase de décompensation, un phénomène de nécrose des CMs est observé. Comme nous l'avons expliqué au paragraphe précédent les membranes jouent un rôle clé dans le phénomène de nécrose. Il nous est donc apparu intéressant d'étudier les caractéristiques morphologiques et biophysiques de la ML des CMs lors de l'évolution vers l'IC. Si cette membrane se fragilise pour finir par rompre lors de l'évolution vers une IC, c'est que probablement les propriétés d'intégrité de cette surface ont été modifiées. Pour observer ces paramètres membrane, la microscopie à force atomique (AFM).

113. Projet de thèse : La nécrose des CMs lors de l'IC est-elle la conséquence d'une altération précoce de la ML ?

La nécrose, et plus précisément l'étape de mort cellulaire, est induite à la suite d'un phénomène de rupture mécanique des membranes plasmiques. Si cette hypothèse est vérifiée alors l'apparition d'une IC traduite au niveau cellulaire par la nécrose des CMs est la conséquence d'une fragilité préalable de la ML des CMs. Afin de répondre à cette interrogation, nous avons cherché au cours de mes travaux de thèse à :

- observer les modifications topographiques et mécaniques précoces de la ML pouvant être initiatrices de cette fragilité membranaire au long terme ;
- déterminer si les anomalies d'intégrité de la ML sont un phénomène commun aux IC de différentes origines.

En effet, l'IC est une pathologie définie par l'incapacité du cœur à fournir un débit sanguin suffisant pour l'organisme, provoqué par un trouble de la fonction contractile, survenue à la suite de la nécrose des CMs. Cependant ces événements font suite à différents facteurs tel que le diabète, l'infarctus du myocarde, une hypertension chronique, une cardiotoxicité médicamenteuse…
Pour atteindre ce double objectif j'ai, au cours de ma thèse, étudié l'impact de l'installation d'une IC sur les CMs induite par deux facteurs différents :

- une IC induite à la suite d'un infarctus du myocarde
- une IC apparaissant à la suite d'un traitement anticancéreux à base de Doxorubicine (Dox).

Ces deux modèles ont été choisis afin de répondre à une nécessité de comprendre l'évolution de ces facteurs en IC. L'infarctus du myocarde est une pathologie qui touche 120 000 personnes par an en France, dont 10% décèdent dans l'heure suivante et 15% dans l'année suivante[23,24]. Les décès dans l'heure peuvent être expliqués par la non prise en charge de l'obstruction coronarienne. En effet une zone nécrotique, induite par une obstruction coronarienne (cf § 152.L'insuffisance cardiaque (IC), un problème de membrane ?), trop étendue provoque une perte de la fonction contractile du myocarde et donc le décès. Si le patient passe cette période critique, c'est que le cœur a mis en place des mécanismes permettant, dans la mesure du possible, un débit sanguin suffisant pour l'organisme. Mais ces mécanismes peuvent ne pas suffire et mettre le patient en IC dans un stade avancé et provoquer son décès, même un an après l'infarctus. C'est dans ce contexte que nous nous sommes demandés quelles sont les anomalies précoces qui peuvent être observées afin de prévenir au maximum les décès liés aux IC induites par un infarctus du myocarde. Considérant que l'IC se termine par une nécrose massive des CMs il est intéressant d'observer la topographie et les propriétés biophysiques de la ML afin de mieux comprendre cette fragilité membranaire. Cette étude a été faite sur un second modèle afin de voir si les IC d'origines différentes présentes la même évolution membranaire. Le modèle choisi est une IC induite par la cardiotoxicité médicamenteuse d'une chimiothérapie basée sur la molécule de Dox. Cette IC présente une installation moins brutale que celle survenue à la suite d'infarctus du myocarde. En effet, sa cardiotoxicité dose dépendante connue[25,26], permet au cœur de mettre en place tous ces mécanismes compensatoires afin de maintenir le plus longtemps possible un débit sanguin suffisant pour l'apport énergétique avant le basculement en phase décompensatoire et l'IC.

Afin d'observer les potentielles anomalies membranaires nous avons utilisé l'AFM qui a permis l'analyse morphologique ainsi que nanomécanique de la surface membranaire du CM vivant, afin de comprendre la fragilité de la ML, responsable de la nécrose de ces cellules. Cette approche permet d'étudier i) la topographie pour observer les désorganisations structurales de la ML mais aussi ii) les données nanomécaniques pour quantifier le phénomène de fragilité membranaire. Cependant cette analyse implique un challenge technologique consistant à analyser des CMs vivants par AFM. Pour cela, il a fallu isoler les CMs du cœur, les maintenir vivants, non battants et immobilisés pour réaliser les mesures AFM nécessaires à notre étude.

114. La Microscopie à Force Atomique (AFM), une approche innovante en cardiologie

L'AFM est une technologie utilisée en biologie depuis 1995[27]. Néanmoins son utilisation en cardiologie est très récente et encore limitée. L'AFM est pourtant un outil de choix pour l'étude des caractéristiques morphologiques et structurales des cellules[28–32].Cette technologie offre de nombreuses possibilités puisqu'elle permet de déterminer les propriétés nanomécaniques telle

que l'élasticité des cellules vivantes et cela à l'échelle individuelle. Mais elle permet aussi d'obtenir des images tridimensionnelles de la topographie d'une surface membranaire avec une résolution nanométrique, en conditions le plus proche possible de l'état physiologique. Cependant, l'étape préliminaire de préparation et d'immobilisation des cellules doit être adaptée en fonction de chaque type cellulaire. La préparation des CMs vivants, pour l'AFM, a été un véritable challenge et un des points déterminants de l'expérimentation, les résultats obtenus en dépendent directement. Cette partie sera développée par la suite (cf. 3.2. Préparation et immobilisation des CMs).

Dans ce projet, nous avons cherché à caractériser la membrane latérale des CMs, d'un point de vue topographique et nanomécanique. Nous avons donc naturellement utilisé le Microscope à Force Atomique.

114.1 L'AFM : Une microscopie issue des nanosciences

A la différence des microscopies dites traditionnelles qui sont basées sur l'observation d'un faisceau de photons ou d'électrons, l'AFM est basée sur le toucher. Son principe est basé sur la mesure physique des forces d'interactions entre une sonde et l'échantillon à analyser. La mesure de cette interaction permet, en plus d'obtenir la topographie de l'échantillon, de caractériser les propriétés biophysiques de l'échantillon. L'AFM est un mode de visualisation de l'échantillon relativement novateur (1986), puisque cet outil dérive de la microscopie à effet tunnel mis au point en 1981[33]. Sur la figure 6, l'architecture et le fonctionnement d'un AFM sont décrits de façon schématique. Le microscope est constitué d'une céramique piézo-électrique déplaçable dans les trois dimensions de l'espace (x, y et z). Un levier portant une pointe est placé sur la céramique piézo-électrique. Cette pointe est ensuite mise en contact avec l'échantillon. La topographie est alors obtenue en balayant la pointe sur la surface. La déformation subie par le levier lors de l'interaction, entre la pointe et la surface, est alors mesurée via la déviation de la réflexion d'un faisceau laser sur un photodétecteur. La topographie de l'échantillon est ainsi reconstituée, ligne par ligne.

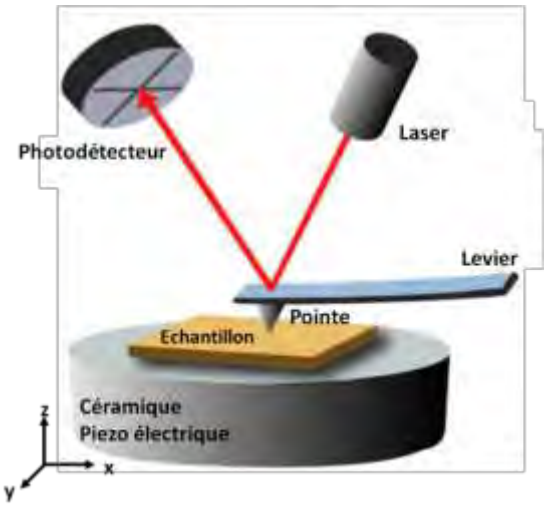


Figure 6 ***: Représentation schématique du principe de fonctionnement de la microscopie à force atomique*** *(adapté de [34]).*

L'AFM n'est cependant pas qu'un outil d'imagerie. C'est une machine de force très performante, capable de mesurer des forces de l'ordre du pN. Lors de nos travaux nous avons tiré avantage de cette caractéristique en utilisant un mode particulier de l'AFM, le mode spectroscopie de force (SF). Dans ce mode la pointe n'est pas en contact constant avec la surface mais elle est successivement approchée puis retirée de l'échantillon. La déflexion du levier enregistrée lors de ce mouvement permet d'obtenir des courbes de force (CF) (approche et retrait)[31] (**Fig.7**). Ces CF permettent d'obtenir différents renseignements sur les propriétés de l'échantillon. En effet par la courbe d'approche de la CF nous pouvons obtenir la topographie de la surface de la cellule, grâce à la reconstruction de l'image faite par analyse de la position du point de contact ou du point atteint à la force d'appui maximale. Le point de contact correspond à la hauteur où la pointe et l'échantillon ont interagi. Cette donnée permet de retrouver l'image, 0 force, à partir d'une matrice spatiale de CF. Mais en plus de données topographiques, l'avantage du mode SF est l'acquisition de données nanomécaniques. En effet, ce mode d'acquisition permet d'extraire de nombreuses informations sur les caractéristiques physiques de l'échantillon telles que son élasticité, sa rugosité, ses propriétés d'adhésion. L'élasticité de la membrane est le paramètre physique qui permettra de quantifier une potentielle fragilité de la ML du CM lors de l'évolution de l'IC[35,36].

Lorsque cette méthodologie est appliquée sur une matrice à la surface de l'échantillon, chaque point de la matrice spatiale est une courbe de force (**Fig. 8**). Les courbes, une fois collectées, sont analysées individuellement afin de reconstruire la topographie, la carte d'élasticité, la carte d'adhésion etc…

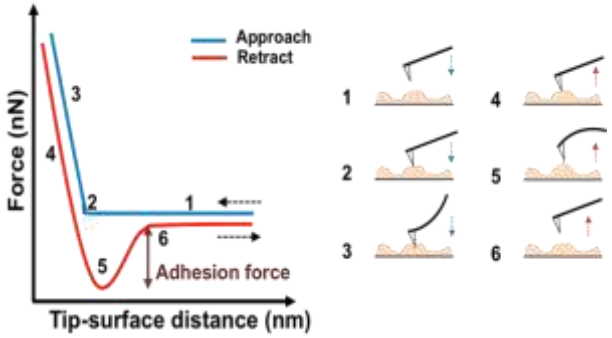


Figure 7 : ***Schéma d'une Courbe de Force (CF)*** *: La ligne bleue représente la courbe d'approche et la courbe rouge celle de retrait. A droite la position de la pointe par rapport à l'échantillon est représentée* ***1)*** *La pointe s'approche à vitesse constante de l'échantillon* ***2)*** *Point de contact entre la pointe et l'échantillon* ***3)*** *La pente représente l'indentation de la pointe dans l'échantillon, de l'échantillon qui permettra d'extraire le module de Young représentant l'élasticité.* ***4)*** *Retrait de la pointe de l'échantillon* ***5)*** *Adhésion entre la pointe et l'échantillon. Il faut appliquer une force plus importante pour séparer la pointe et l'échantillon, c'est la force de rupture.****6)*** *La pointe s'éloigne de l'échantillon à vitesse constante.*

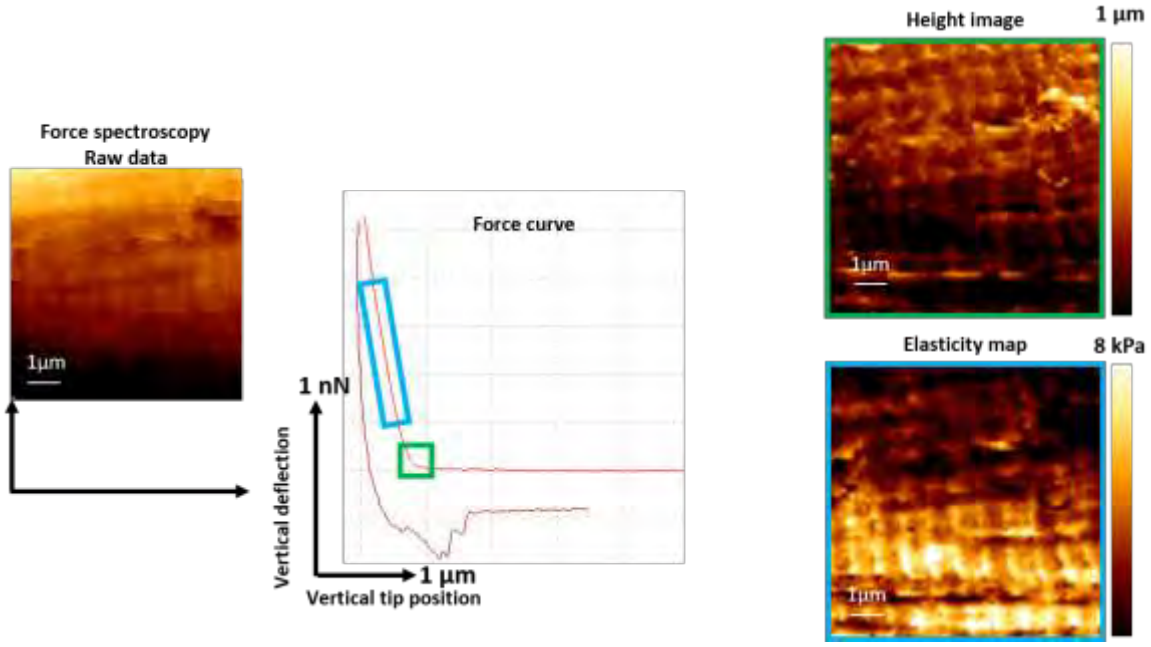


Figure 8 : Cartes extraites de la carte non traitée obtenue par spectroscopie de force. Chaque pixel représente une courbe de force sur laquelle une image de hauteur est extraite grâce à l'application du modèle de Sneddon et la détermination du point de contact au niveau de la zone verte, et de la même façon une carte d'élasticité est extraite par fit du modèle de Sneddon au niveau de la zone bleue.

Cependant, afin de pouvoir utiliser cette technique de microscopie il a fallu dans un premier temps isoler les CMs, à partir des souris traitées ou non. Pour supporter les forces de friction latérale induite par la pointe de l'AFM lors du balayage de la surface il a aussi été nécessaire d'immobiliser les cellules. De plus les CMs sont des cellules contractiles et nous avons dû implémenter au protocole de préparation des cellules vivantes, une étape ayant pour but d'inhiber la contraction spontanée des CMs isolés.

114.2 Préparation et immobilisation des CMs

Les cardiomyocytes adultes sont des cellules différenciées, non proliférantes, difficiles à maintenir en culture plus de quelques heures. Comme les CMs adultes sont non proliférants, il est impossible de travailler une lignée cellulaire et nous n'avons réalisé que des cultures primaires. De plus, les CMs adultes sont des cellules délicates qui dédifférencient rapidement lorsqu'elles sont sorties de leur environnement tissulaire en 3 dimensions. La préparation de l'échantillon est donc une étape clé qui doit être réalisée de façon rigoureuse, elle a pour but de fournir des CMs adultes, vivants, non battants, qui puissent être analysés par AFM. Cette analyse doit être réalisée dans un temps court (2 à 3h) car passé ce délai les CMs adultes perdent leur forme caractéristique, et leur ML est altérée.

Le protocole de purification des CMs de souris adultes repose sur la méthode de Langendorff[37]. Dans cette méthode, les cœurs sont d'abord extraits des souris puis canulés sur le système Langendorff via l'aorte, et perfusés avec différentes solutions afin de laver le tissu cardiaque(solution de lavage : solution de Krebs + $CaCl_2$), inhiber la contraction (solution de décalcification : solution de Krebs + EGTA) digérer la matrice extracellulaire (solution enzymatique :solution de Krebs + II collagénase) et d'accroître la viabilité des cellules (milieu MEM modifié : MEM + sérum de veau fœtal,+ Pénicilline,+ Glutamine +2,3-butanedione monomoxime). Une succession de cinq étapes permettent d'obtenir les cellules isolées les unes des autres (cf. Chapitre II) (**Fig.9**).

Une fois les CMs isolés, ils sont incubés pendant 20 minutes, à 37°C, sous atmosphère 5% CO2, sur des boîtes de Petri fonctionnalisées par de la laminine, un composant majeur de la lame basale du CM. Ce procédé permet de les immobiliser sur les boîtes. La solution d'incubation contient, notamment, des inhibiteurs de contraction (le butaneidone monoxime[38] et la blebbistatin) indispensable pour pourvoir réaliser les mesures AFM. Les mesures AFM sont réalisées dans une cellule de perfusion[39] qui permet de contrôler la température (maintenue à 37°C) et l'atmosphère (maintenue à 5% de CO_2). Ces conditions nous ont permis d'étudier la ML des CMs adultes vivants.

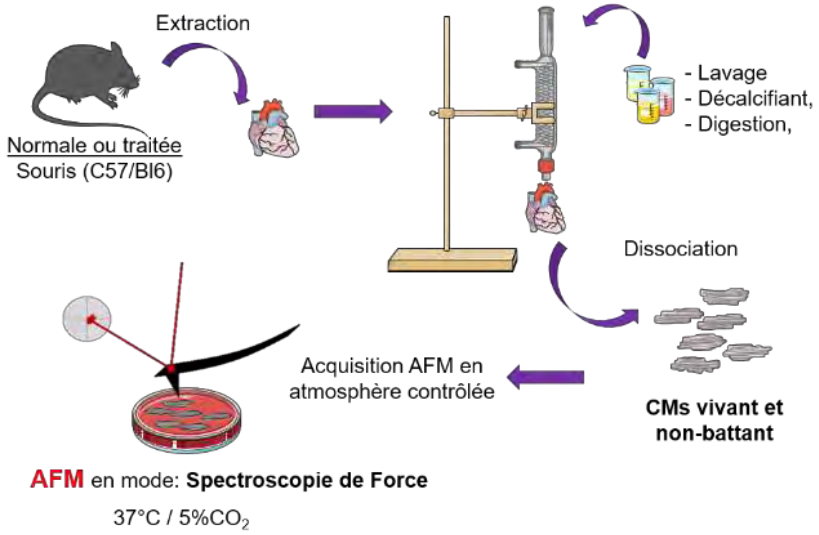


Figure 9 ***: Dispositif expérimentale de la purification des CMs.***

115. Travaux de thèse : Etude par AFM de la structure et l'architecture de la membrane latérale du cardiomyocyte

Mon premier objectif a été d'étudier les modifications topographiques ainsi que les anomalies des propriétés nanomécaniques induites sur la ML des CMs en situation d'IC. Pour cela nous avons choisi d'étudier l'IC induite à la suite d'un infarctus du myocarde.

Mon second objectif a été de vérifier si les anomalies observées sur la ML des CMs dans le cas d'une IC brutale provoquée par un infarctus, se retrouvent dans le cas d'une IC progressive induite par un traitement de chimiothérapie (doxorubicine) connu pour sa cardiotoxicité dose dépendante.

115.1 IC induite par un infarctus de myocarde

L'infarctus du myocarde est un cas particulier de l'IC. Cette pathologie est définie comme une nécrose d'une partie du myocarde due à une ischémie locale provoquée par un trouble coronarien[40]. L'infarctus, comme décrit précédemment, va engendrer un remodelage cardiaque entrainant une IC avec une hypertrophie ventriculaire associée à une fibrose (**Fig.10**).

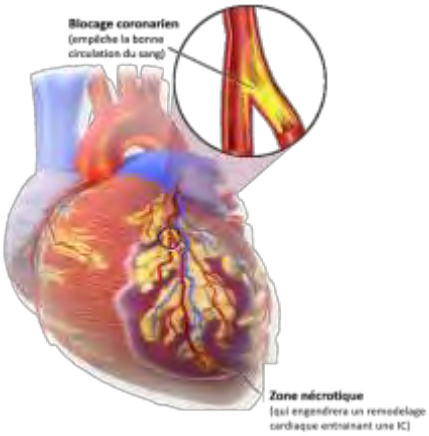


Figure 10 *: **Infarctus du myocarde** provoqué par une obturation d'une artère coronaire (ici, par plaque d'athérome) (d'après BlausenMedical Communications, Inc.)*

Nos travaux se sont focalisés sur cette évolution vers l'IC après un infarctus du myocarde avec une observation de la ML du CM extrait de notre modèle de souris à différents temps après infarctus du myocarde. Pour cela nous avons utilisé un modèle murin, plus précisément des souris C57/Bl6 mâles âgées de 8 semaines, sur lesquelles nous avons pratiqué une ligature permanente de la coronaire gauche afin de provoquer un infarctus[41]. Nos observations ont été faites dès 3 jours post infarctus afin d'étudier les effets précoces de cette pathologie sur l'architecture de la ML du CM. Puis, nous avons effectué des observations à 15 jours afin de comparer les données topographiques et nanomécaniques avec la condition normale (souris saine), ainsi qu'avec l'effet précoce post infarctus (+ 3 jours) et une fois que l'IC est installé (+ 15 jours) (**Fig.11**).

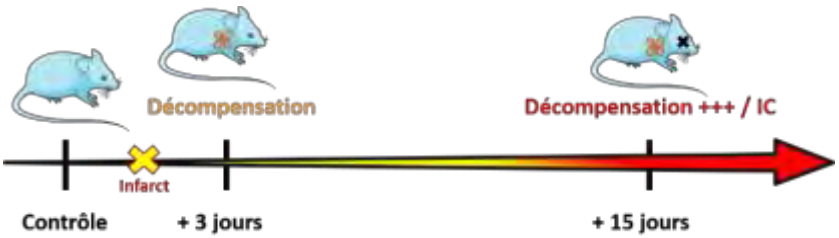


Figure 11 *: **Cinétique d'observation** de l'évolution la ML des CM lors de l'installation de l'IC après un **infarctus du myocarde** provoqué par ligature permanente de coronaires.*

115.2 Etude de la membrane latérale de CM par AFM couplé à la microscopie électronique après un infarctus du myocarde.

Ces travaux sont développés dans l'article « Atomic force and electron microscopic-based study of sarcolemmal surface of living cardiomyocytes unveils unexpected mitochondrial shift in heart failure. » du chapitre 2.

Cette étude a montré, par un couplage de l'AFM et de la microscopie électronique à transmission (TEM), l'impact d'un infarctus du myocarde provoqué par ligature permanente de coronaires, sur la structure et les propriétés nanomécaniques de la ML. Dans un premier temps il a fallu

caractériser la surface des CMs « sains » avant de s'intéresser dans un second temps au CMs en conditions pathologiques. L'AFM a mis en évidence une membrane hautement organisée avec une structure périodique de creux et de crêtes (**Fig. 12A**). En parallèle, le TEM a permis d'observer la présence de mitochondries sous le sarcolemme du CM responsable de la structure en creux/crêtes de la ML (**Fig. 12B**). Ces mitochondries appelées mitochondries subsarcolemmales (SSM) ont été découvertes dans les années 1970 mais encore aujourd'hui leur fonction reste inconnue[42], et ces mitochondries ne font pas l'objet de recherches particulières, elles restent essentiellement ignorées dans la littérature traitant des CMs. Ce qui est évident est le fait qu'elles présentent de nombreuses différences avec l'autre type de mitochondries, les mitochondries interfibrillaires (IFM), que ce soit dans leur localisation mais aussi dans leur morphologie, ce qui suggère des fonctions différentes. Les IFM ont un rôle bien identifié dans l'apport énergétique nécessaire à la cellule pour permettre sa fonction contractile[43]. En cas d'altérations, des troubles contractiles peuvent être détectés et donc être un composant supplémentaire au renforcement de l'installation de l'IC.

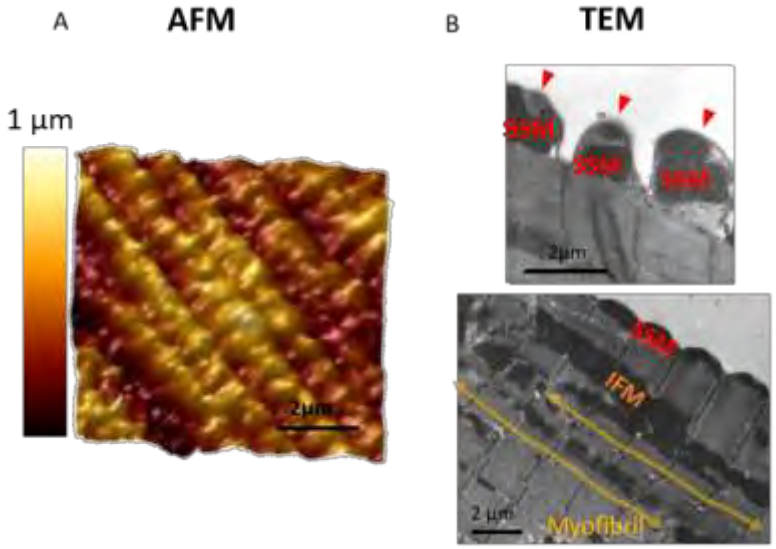


Figure 12 *: **Cardiomyocyte en condition normal**. **A**) Observation de la ML du CM par **AFM** avec une organisation creux/crêtes. **B**) Observation de la coupe transversale du CM par **TEM** avec visible sous le sarcolemme les mitochondries subsarcolemmales (SSM) et situé le long des myofibrilles (flèches jaunes) les mitochondries interfibrillaires (IFM). (adaptée de [11])*

Nos résultats ont permis de montrer, en couplant l'AFM et le TEM, l'impact d'un infarctus du myocarde sur la structure et les propriétés nanomécaniques de la ML, et plus particulièrement sur la redistribution des mitochondries (IFM et SSM) dans le CM. Les différentes observations par spectroscopie de force montrent un changement de la structure de la ML avant la mort des CMs par nécrose. Dès 3 jours post infarctus, nous avons pu observer une perte de la structure caractéristique des CMs en creux/crêtes pour un motif structural plat et avec une élasticité plus faible, puis 15 jours post infarctus ce motif plat est remplacé par un motif de protrusions avec une élasticité plus importante qu'en condition normale. Ces données ont été corrélées avec les

observations faites en TEM. L'observation des coupes transversales a permis de montrer que ces modifications structurales sont dues à des changements mitochondriaux. En effet, la perte de l'organisation en crêtes au détriment d'un motif plat est causée par la disparition des SSM. La migration des IFM vers la ML provoque l'apparition de ces protrusions ainsi que l'augmentation de l'élasticité. L'ensemble de ces résultats mettent en évidence la disparition des crêtes de la ML des CMs, liée à une perte des SSM dès les étapes précoces de l'évolution vers l'IC puis la montée des IFM à la surface cellulaire en phase terminale (**Fig. 13**).

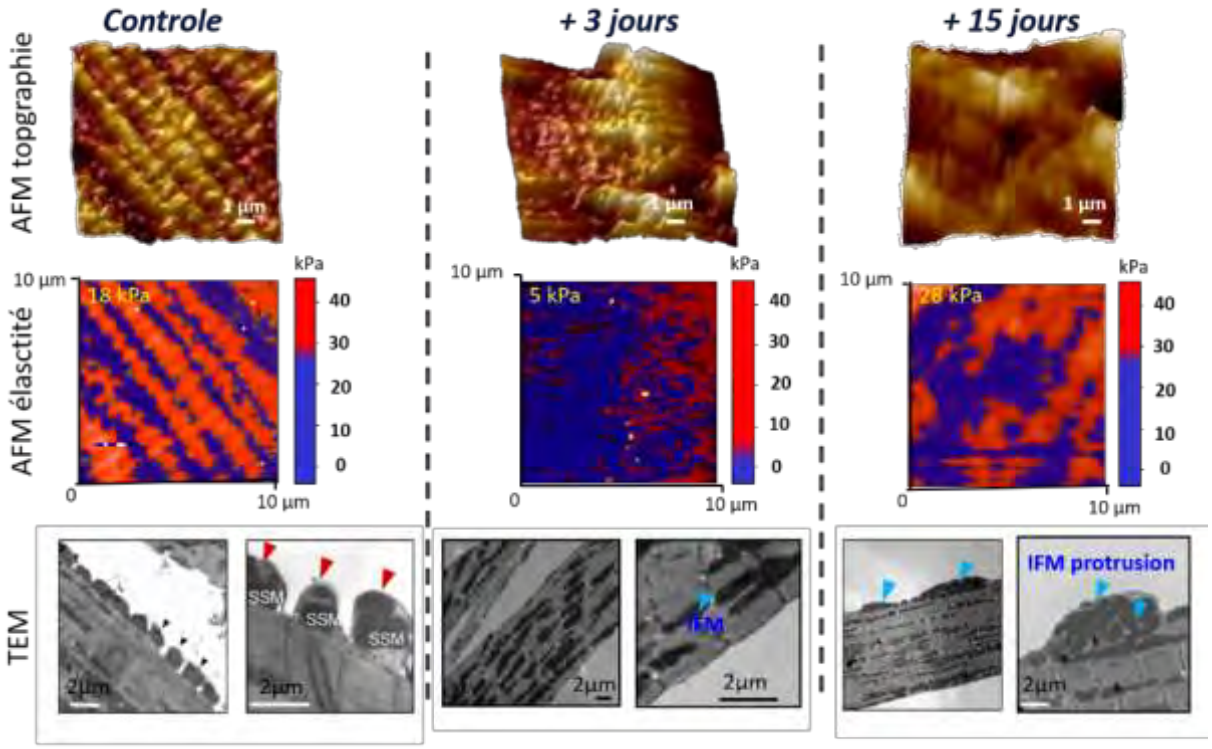


Figure 13 : ***Observation par AFM et TEM de la structure du CM après infarctus du myocarde.*** *De gauche à droite, les 3 conditions d'observations, avec le CM en condition normal, puis le CM 3 jours post infarctus et le CM 15 jours post infarctus. De haut en bas, on trouve l'image de hauteur obtenue par AFM, puis la carte d'élasticité avec en rouge les zones les plus molles et en bleu les zones dures. En bas on retrouve les observations de coupes transversales de CM par TEM.*

Ces résultats sont en accord avec une précédente étude qui utilisait la microscopie à conductance ionique afin d'observer les modifications de l'architecture ionique de la ML lors d'une IC[10]. Les auteurs ont montré la perte de l'organisation en crêtes, obtenue de façon indirecte par les échanges ioniques de la sonde et de la surface cellulaire. De plus, une étude publiée en 1997, corrobore nos résultats sur la disparition des SSM lors de l'installation d'une IC. Ces travaux ont été faits par microscopie électronique et ont permis de montrer une première étape définie par la perte des SSM suivi d'une seconde étape de réorganisation des IFM[44]. Pour conclure sur ces travaux nous pouvons dire que l'AFM a permis une nouvelle approche de cette thématique de mise en place de l'IC. Grâce à cet outil, nous avons pu étudier la topographie de façon directe et sur des

ML de CMs vivants, ce qui rend unique l'approche. De plus l'AFM nous a donné accès aux propriétés nanomécaniques, et particulièrement l'élasticité. Cependant ces travaux présentent des limites. La plus importante est certainement liée au fait que cette étude soit réalisée sur des cellules isolées. Cela induit un biais de sélection lors de la préparation des CMs pour l'AFM lors de l'étape d'immobilisation des cellules. Cette étape sélectionne les cellules en bonne santé, capable d'adhérer à la laminine. Le taux de mortalité des CMs n'est alors pas pris en compte. Il en est de même pour les CMs ayant une membrane trop fragile pour supporter l'analyse AFM.
Toutefois, cette étude a mis en évidence une modification topographique et mécanique de la ML en situation d'IC. La question qui se pose alors est de savoir si ces modifications sont retrouvées dans d'autres modèles d'IC. C'est à partir de cette interrogation que s'est construit le second objectif: montrer que les modifications sont retrouvées dans un autre modèle. Pour atteindre cet objectif nous avons choisi de nous intéresser à l'IC induite par un traitement anticancéreux à base de Dox. Cette molécule induit une évolution lente et progressive vers l'IC, contrairement à l'infarctus qui est brutal et quasi immédiat.

115.3 L'IC induite par une chimiothérapie à base de Doxorubicine

L'étude précédente permet de mettre en évidence l'apparition d'anomalie membranaire dans les phases précoces de l'installation de l'IC. Ces anomalies sont à la fois morphologiques, avec une perte de structure à la surface de la ML, mais aussi nanomécaniques avec une modification de l'élasticité qui pourrait expliquer la fragilité de la cellule ainsi que sa nécrose dans les phases suivantes. Afin de vérifier que ce phénomène existe dans un autre modèle d'IC, très différent, nous avons choisi de travailler sur la cardiotoxicité induite par la doxorubicine[24,26,45,46]. Ce choix a été motivé par la volonté d'observer la progression vers l'IC. En effet le modèle d'IC induite par un infarctus du myocarde est un modèle d'IC très violent et ne permet pas au cœur de mettre en place ces mécanismes de compensation, et il entre rapidement en phase de décompensation. Donc il est possible que nos observations soient spécifiques au modèle choisi. C'est dans ce contexte que nous avons choisi une IC dont l'évolution est plus lente et où les impacts sur la ML peuvent être observés lors de toutes les phases d'évolution de l'IC avant l'apparition de la nécrose des CMs. En effet les patients ayant subi une chimiothérapie de Dox présentent dans 2% des cas une IC 10 ans après[25]. Le traitement du cancer se base sur la trilogie, chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie. Parmi les anticancéreux utilisés en chimiothérapie, les anthracyclines sont une classe de molécules particulièrement efficaces. Ce sont des agents intercalants dont le mécanisme d'action consiste en une inhibition compétitive de la topoisomérase II en s'intercalant entre les bases de l'ADN. Il se produit alors une interférence dans les mécanismes réplicatifs de l'ADN qui entraîne la mort

cellulaire. Ce phénomène apoptotique n'est pas spécifique des cellules cancéreuses, cependant les cellules cancéreuses sont plus touchées que les cellules normales car leur vitesse de division est beaucoup plus élevée[47]. Cependant, en pratique clinique, une Dose Cumulative Maximale autorisée de 450-550 mg/m^2 a été imposée pour limiter les effets cardiotoxiques de la dox et limiter la prévalence de l'IC à la suite de ce traitement chimiothérapeutique[24,25]. Cette toxicité est à la fois aigüe/sub aigüe et chronique[48,23,49,50].

A court terme : l'effet de la dox est réversible et non dose-dépendant,

- aigüe (pendant ou juste après l'injection), provoque l'apparition d'arythmies, et de modifications électrocardiographiques chez environ 1 % des patients.
- subaigüe (dans les deux semaines qui suivent le traitement), responsable chez 1,4 à 2 % des patients de myocardites.

A long terme (la plupart du temps 10 ans après la fin du traitement), l'effet est dose-dépendant, cumulatif et irréversible. Il se caractérise par :

- un trouble de l'électrocardiogramme avec un allongement de l'espace QT,
- l'élévation des marqueurs d'IC (Troponine, dont l'augmentation dans le sang circulant signifie qu'il y a une souffrance myocardique),
- une fonction diastolique puis une fraction d'éjection du Ventricule Gauche altérées, conduisant à une IC dilatée chez 1.6 à 5 % des patients.

A ce stade il est trop tard. La question qui se pose alors est de savoir si des altérations de la ML, analogues à celles observées dans l'IC provoquée par l'infarctus, seraient mesurables précocement. Pour aborder cette question, mes travaux ont consisté à observer l'effet de la Dox sur la structure des CMs, au cours d'un protocole mimant une chimiothérapie. Nous avons choisi le modèle murin (souris C57/Bl6) avec des injections intrapéritonéales hebdomadaires de Dox de 5mg/kg. Les observations ont été faites à différentes doses reçues (J3 (5mg/Kg), J28 (25mg/Kg), J35 (30mg/Kg), J56 (45mg/Kg), J70 (55mg/Kg)) afin d'étudier l'évolution du CM jusqu'à la mise en place d'une IC (**Fig. 14**).

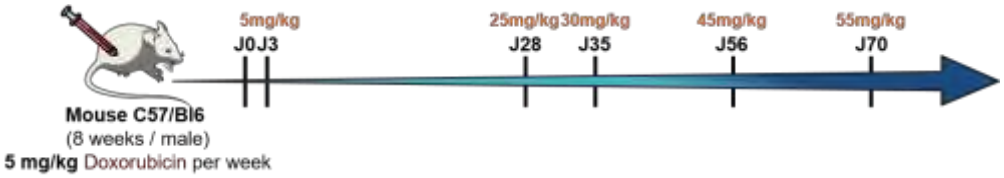


Figure 14 *: **Cinétique d'observation** de l'évolution la ML des CM lors d'un protocole mimant une **chimiothérapie basée sur la Doxorubicine** chez le modèle murin.*

Ces observations précoces de la structure de la ML des CMs, nous ont permis de vérifier si les modifications observées dans le cas d'une IC induite par un infarctus sont aussi présentes, précocement, après un traitement chimiothérapie basé sur la molécule de Dox.

115.4 Etude des effets de la doxorubicine sur l'architecture de la ML

Lors de notre seconde étude s'intéressant à la similarité des effets observés sur un autre modèle d'IC. Nous avons observé l'effet de la Dox sur la structure des CMs, un protocole mimant une chimiothérapie chez le modèle murin (souris C57/Bl6). Avec les mêmes paramètres d'AFM que ceux utilisés dans l'étude précédente, nous avons étudié la surface de CMs préalablement isolés de cœur de souris ayant reçu, chaque semaine, une injection de 5mg/kg de Dox. Les observations ont été faites à différentes doses reçues afin d'étudier l'évolution du CM jusqu'à la mise en place d'une IC. L'observation de la topographie par AFM montre une désorganisation croissante des crêtes de la ML au cours du temps. En effet dès la première dose un effet sur l'organisation topographique a été observé. Cet effet s'accentue avec l'augmentation de la dose de Dox. Cette dégradation de la structure est corrélée avec une modification de l'élasticité. Avec l'augmentation de la dose nous avons pu observer une perte précoce de la structure organisée en creux/crêtes de la membrane avec une apparition d'un motif « plat », puis la formation de protrusions sur la ML (**Fig. 15**).

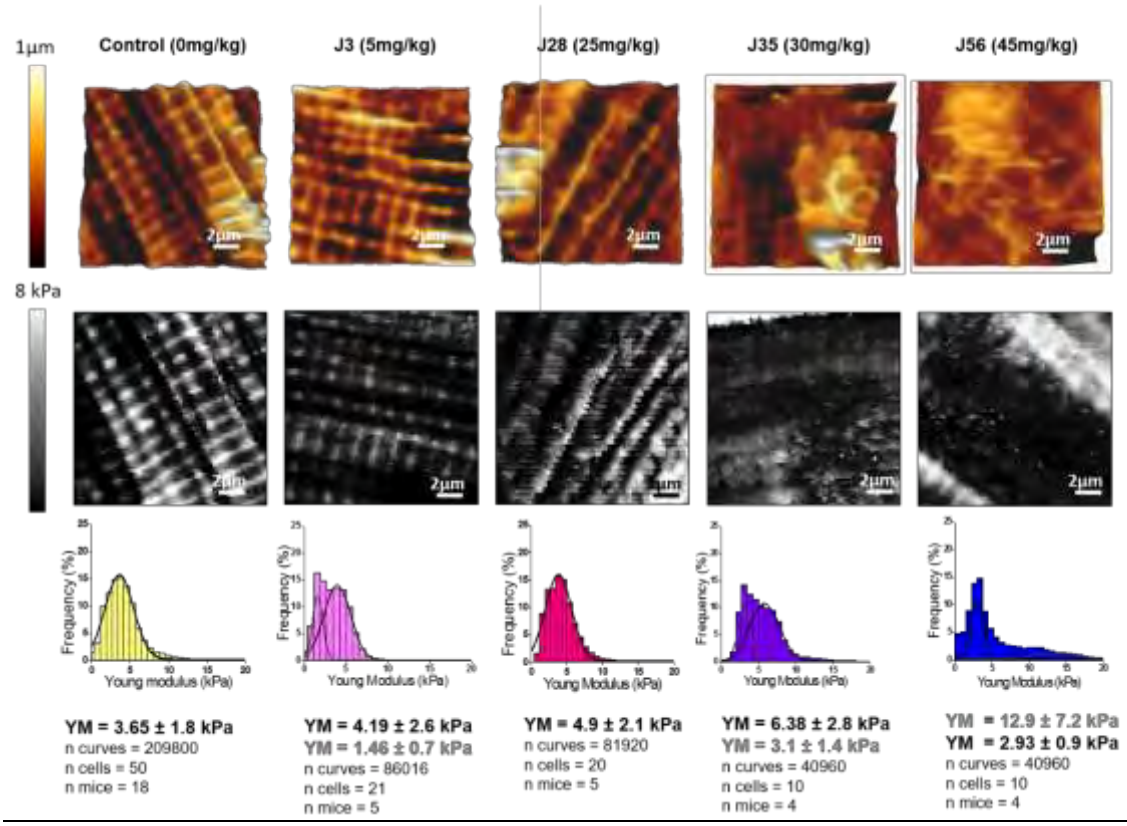


Figure 15 *: **Analyse de la structure de la membrane latérale du cardiomyocyte par AFM en mode spectroscopie de force.***

De haut en bas :

i) topographie de la surface analysée (10µmx10µm) – Exemple représentatif de la condition

ii) Carte d'élasticité (10µmx10µm et 4096 courbes de force) – Exemple représentatif de la condition

iii) Distribution des modules de Young (YM) extraits des courbes de force en fonction de leur fréquence d'apparition.

Un modèle Gaussien est appliqué pour déterminer la valeur médiane de la distribution observée.

*Pour le **groupe contrôle (0mg/kg)** le YM moyen est de 3,6 ± 1,8 kPa.*

*Pour le **groupe J3 (soit une dose injectée de 5 mg/kg),** la distribution est de type bimodal et se déconvolue en deux gaussiennes centrée respectivement sur 1,5 ± 0,7 kPaet.4,2 ± 2,6 kPa.*

*Le **groupe J28 (25 mg/kg)** présente lui un YM moyen de 4,9 ± 2,1 kPa.*

*Pour le **groupe J35 (30 mg/kg),** a distribution est de type bimodal et se déconvolue en 2 gaussiennes centrée respectivement sur6,4 ± 2,8 kPa et 3,1 ± 1,4kPa.*

*Pour le **groupe J56 (45 mg/kg),** la distribution est de type bimodal et se déconvolue en 2 gaussiennes centrée respectivement sur 12,9 ± 7,2 kPa et 2,9 ± 0,9 kPa.*

Cette similarité des différentes modifications structurales et nanomécaniques de la membrane du CM laisse penser que l'évolution vers une IC induite par une chimiothérapie à la Dox possède les mêmes mécanismes que celle d'une IC provoquée par un infarctus du myocarde. Cette étude présente la même limite de biais de sélection que l'étude précédente. Les acquisitions se font sur des CMs ayant une membrane supportant l'analyse AFM. Donc les effets globaux de détérioration de la membrane peuvent être sous-estimés. Heureusement, ce biais peut être éliminé grâce à une observation du tissu entier. Pour cette étude, nous avons mis en place en parallèle, des observations de la structure du tissu cardiaque par TEM afin de vérifier que nos observations ne sont pas le résultat d'un biais lié à la méthode utilisée. Nos premières données montrent que, dans le tissu entier, nous pouvons observer des anomalies structurales apparaissant dès la première dose J3 (5 mg/kg) de Dox. De plus, grâce au TEM, nous avons pu vérifier que les motifs élastiques sont corrélés à un bouleversement mitochondrial.

Cette étude nous a permis d'obtenir de nouvelles données dans la compréhension des mécanismes impliqués dans l'évolution vers une IC. Ces deux études nous laissent penser que les mitochondries et plus spécifiquement les SSM ont un rôle prépondérant et précoce dans le passage à l'IC. Cependant nous ne connaissons pas la fonction de cette perte précoce des SSM, et même en condition normale nous ne connaissons pas le rôle de ces mitochondries.

Ce travail ouvre de nombreuses possibilités, mais la suite la plus logique serait de vérifier que les modèles d'IC induits par les maladies chroniques les plus fréquentes telles que le diabète et l'hypertension, présentent le même modèle d'évolution au niveau de la modification de l'architecture membranaire. Par opposition, il serait intéressant d'évaluer l'effet de conditions bénéfiques sur l'organisation de la ML ; par exemple qu'induisent les médicaments prescrits pour traiter l'IC, quel est l'impact de l'exercice physique ou l'effet de l'alimentation etc…

12. Application de l'AFM pour l'étude de récepteurs transmembranaires

Après nous être intéressés aux modifications de la ML survenant lors de la phase de décompensation de l'IC, nous avons abordé la problématique de la phase compensatoire. Pendant cette phase, le cœur subit une hypertrophie que les traitements tentent de limiter. Les traitements généralement utilisés lors d'une insuffisance cardiaque ont pour but principal d'améliorer la qualité de vie, en réduisant les symptômes (essoufflement, fatigue, œdèmes...), et de maintenir l'activité de la vie quotidienne. Ces traitements permettent de prévenir/ralentir le basculement dans la phase de décompensation et ainsi réduire le nombre et la durée deshospitalisations[51,14,52,53]. Les traitements comprennent des traitements non pharmacologiques avec un régime alimentaire désodé (afin de limiter l'hypertension) et de l'exercice physique (intérêt dans le maintien musculaire et une meilleure extraction de l'oxygène). Ce type de traitement peut être accompagné par une oxygénothérapie chez les patients atteint d'une IC ventriculaire gauche aigue. En ce qui concerne les traitements médicamenteux, différentes classes de molécules sont utilisées :

- Les vasodilatateurs (réduisent la vasoconstriction veineuse et artérielle)
- Les diurétiques
- Les bêta-bloquants
- Les tonicardiaques

Ces molécules permettent toutes de diminuer le risque de fatigue du cœur qui entrainerait un basculement dans la phase décompensatoire plus rapidement. Cependant certains voient leur utilisation limitée par l'apparition d'effets secondaires handicapant, pour le patient. En effet lors d'une IC, un cocktail de ces différentes classes de molécules est souvent prescrit. Mais certaines molécules, bien que leur action soit bénéfique, présentent des effets secondaires (hypotension artérielle, bradycardie, leucopénie et thrombopénie, ect…). Les molécules qui présentent ce problème de façon importante sont les bêta-bloquants et certains vasodilatateurs[54,55]. Le lien entre ces deux types de molécules réside dans leur cible moléculaire : les récepteurs couplés aux protéines G. Il nous est donc apparu important de nous intéresser à ces récepteurs. Le paragraphe suivant présente un court état de l'art les concernant et annonce la question que nous avons soulevée. Enfin la stratégie biologique et technologique pour aborder cette question est présentée, ainsi qu'un résumé des résultats. L'ensemble des données et leur discussion constitue la deuxième partie du chapitre 2 (§ 233.)

121. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

121.1 Intérêt de ces récepteurs pour l'IC

Les molécules de la catégorie des bêta-bloquants ainsi que certains vasodilatateurs ciblent des récepteurs particuliers que sont les RCPGs. En ce qui concerne les bêta-bloquants, il s'agit de molécules utilisées pour bloquer l'action de l'adrénaline et de la noradrénaline. Ces molécules vont se fixer de façon compétitive aux récepteurs de type adrénergique (α_1, α_2, β_1, β_2, β_3), et permettre une réduction de la vasoconstriction périphérique ainsi qu'un ralentissement de la fréquence cardiaque. Ces effets induisent une diminution de la fréquence cardiaque et permettent de gagner un meilleur débit sanguin. Le cycle diastole-systole brassant alors un volume de sang plus important.

En ce qui concerne les vasodilatateurs, et plus spécifiquement les antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II, ils permettent la réduction de la vasoconstriction veineuse et artérielle. Ces molécules se fixent sur les récepteurs à l'angiotensine II, appartenant aussi à la famille des RCPGs. Ils ont le même mécanisme d'action que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion, c'est-à-dire, l'inhibition du système rénine/angiotensine. Cela induit une diminution de la dilatation ventriculaire ainsi qu'une inhibition de la rétention hydrosodée. Ces mécanismes ont pour conséquence une diminution de la tension artérielle, une fonction contractile améliorée grâce à la diminution des contraintes. Un meilleur débit sanguin est alors obtenu ce qui limite la fatigue cardiaque[54].

Cependant ces médicaments présentent de nombreux effets secondaires qui vont de l'hypotension, à des toux invalidantes et même des insuffisances rénales. Ces effets secondaires limitent grandement l'observance des traitements et donc leur efficacité. Ces molécules ciblent la famille des récepteurs couplés aux protéines G comme, d'ailleurs, beaucoup d'autres traitements sur le marché[55].

121.2 Importance de l'architecture oligomérique à la surface membranaire des cellules

Ces récepteurs sont la cible de plus de 30 % des molécules thérapeutiques sur le marché[56]. Ceci représente donc un intérêt majeur en pharmacologie[57]. Cependant leur utilisation est souvent limitée par leurs effets secondaires trop importants. La recherche dans le domaine des RCPGs est actuellement très active : plus de 10 000 publications scientifiques rien qu'en 2015, 1 prix Nobel en Chimie décerné en 2012 pour la mise en évidence de la structure tridimensionnelle d'un de ces récepteurs[58] et 7 autres prix Nobel ont un lien avec ces protéines. Il faut comprendre que ces récepteurs ont une implication quasi générale dans l'organisme, ils composent une des plus grandes familles de récepteurs et sont codés par plus de 800 gènes[59]. Leur grand nombre (826 connus chez l'Homme), leur répartition ubiquitaire, et l'hétérogénéité des stimuli reconnus

(sensoriels, hormonaux, neurotransmetteurs, facteurs de croissance, …) font des RCPGs les acteurs d'une grande variété de processus physiologiques et par conséquent une cible privilégiée en pharmacologie[60,61]. Et grâce aux recherches de ces dernières années, de nombreux points ont été résolus :

- les fonctions physiologiques des différents récepteurs,[62]
- la structure tridimensionnelle du monomère[63,64]
- les mécanismes de transduction du signal.[56]

Des indices sur l'explication des effets secondaires[60,65,66]ont aussi été apportés. Par exemple, une étude de 2012 faite par l'équipe de B. Kobilka[67] a permis de mettre en évidence un lien entre : activation des récepteurs, dimérisation et effets secondaires. Dans ces travaux les auteurs décrivent le cas précis de la morphine, le récepteur μ-opiacé, liant la morphine, qui est dans une conformation spatiale différente de celle prise par le récepteur liant l'endorphine (molécule endogène de la morphine) ; il apparaît en effet, que le récepteur liant l'endorphine est sous forme dimérique[64] pendant que celui liant la morphine est tout autant sur forme monomérique qu'oligomérique. La fixation de l'endorphine se fait spécifiquement à un résidu accessible seulement après dimérisation alors que la fixation de la molécule de morphine ne nécessite pas la modification conformationnelle induite par la dimérisation. Toutefois plusieurs questions restent encore ouvertes et controversées comme la question de l'architecture des RCPGs à la surface de la membrane. Est-ce que les RCPGs ont une activité régulée par leur organisation oligomérique comme semble sous-entendre l'exemple de la morphine[67] ? De plus dans la plupart des autres récepteurs membranaires, tels que les récepteurs tyrosine kinase, les récepteurs aux cytokines ou même les récepteurs aux facteurs de croissance, le processus d'activation nécessite leur dimérisation[68]. Ce constat sous-entend l'importance de la dimérisation voire de l'oligomérisation dans le comportement des RCPGs. Pour tenter de comprendre ce phénomène nous avons utilisé l'AFM, en mode spectroscopie de force, pour une étude à l'échelle des récepteurs. Nous avons étudié l'influence de différentes conditions (densité de récepteurs sur la membrane, stimulation par des agonistes…) sur l'organisation oligomérique des RCPGs.

122. La Spectroscopie de Force à l'échelle de la Molécule Unique

122.1 Mode spécifique de l'AFM pour une étude à l'échelle de la protéine

La Spectroscopie de Force à l'échelle de la Molécule Unique (SMFS)[69–73] s'est développée ces dernières années avec les progrès en chimie de surface. Dans cette technologie de SMFS, les pointes AFM interagissent avec des biomolécules immobilisées sur des substrats ou des biomembranes artificielles ou même présentes à la surface de cellules vivantes afin d'en étudier les interactions intra et inter-moléculaires[74,75]. Pour rendre l'interaction entre la pointe et la molécule étudiée spécifique, il est nécessaire de fonctionnaliser la pointe[70,76–79] (**Fig. 16**).

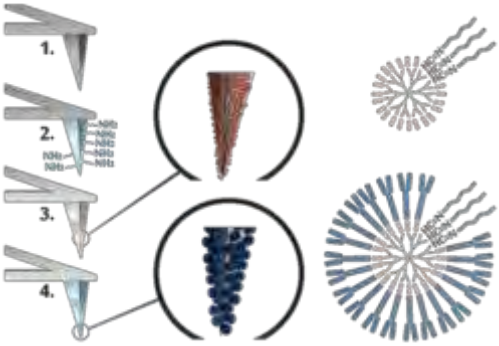


Figure 16 : ***Fonctionnalisation de la pointe AFM par un anticorps selon le procédé breveté[80,81] Dendritip*** *: **1)** Pointe AFM en nitrure de silicium **2)** Ajout d'une fonction amine par incubation dans l'éthanolamine**3)** Fonctionnalisation de la pointe NH_2 avec un dendrimère phosphoré-aldhéhyde de quatrième génération présentant 96 fonctions aldéhydes libres **4)** Liaison covalente (base de Shiff) des anticorps anti HA à la dendritip.*

La fonctionnalisation consiste à lier à la pointe un anticorps spécifique ciblant la protéine d'intérêt, cependant il peut être difficile d'obtenir l'anticorps reconnaissant la protéine membranaire native avec une spécificité assez élevée ce qui limite l'utilisation de cette méthode. Pour contourner cette difficulté, les biologistes ont développé une stratégie génétique consistant à marquer leurs protéines d'intérêts en N- ou C-terminal avec de petites « étiquettes » spécifiques. La pointe AFM est donc fonctionnalisée par un anticorps dirigé contre ces « étiquettes ». En général, les plus utilisés sont des épitopes tels que Human influenza hemagglutinin (HA) (YPYDVPDYA), tag FLAG (DYKDDDDK) ou tag myc (EQKLISEEDL)[82–86]. Ces épitopes, une fois fusionnés à une protéine membranaire d'intérêt pourront être détectés par la sonde AFM préalablement fonctionnalisée. Cette détection permettra l'analyse d'interaction entre la pointe et la protéine, mais aussi de cartographier la présence de cette protéine sur la surface d'un substrat ou d'une cellule vivante et, dans le cas de cette thèse, l'étude de l'architecture oligomérique de récepteurs membranaires sur la surface d'une cellule.

122.2 Application à l'étude des RCPGs

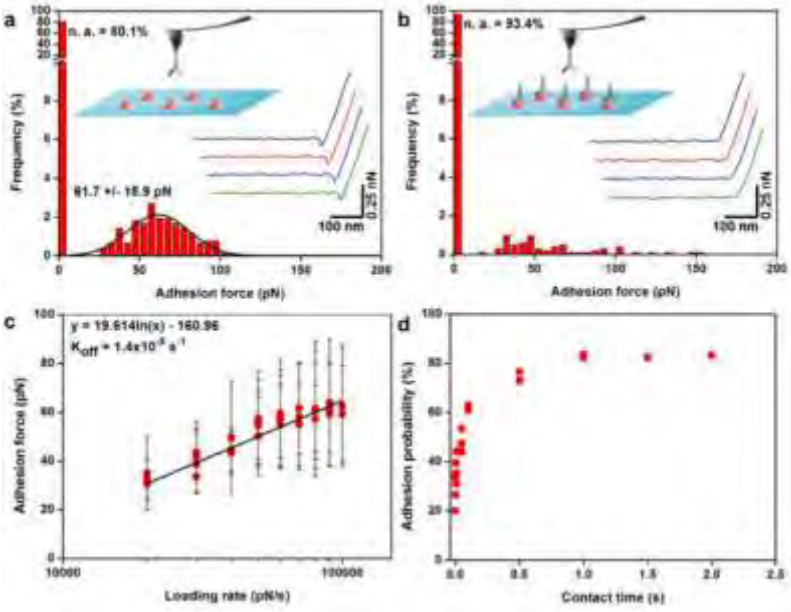
L'étude des RCPGs par AFM a fait récemment l'objet de deux publications[87,88]. Cette approche a été pour la première fois utilisée dans ce domaine. Ces articles s'intéressent à l'énergie d'interaction entre un ligand et un RCPG, plus particulièrement le récepteur humain de la protéase activée 1 (PAR1) impliqué dans une cascade de signalisation initiant des réponses cellulaires qui contribuent à orchestrer l'hémostasie, la thrombose, l'inflammation et éventuellement la réparation des tissus. [89,90]. Dans leur première étude,[87], ils ont introduit une nouvelle approche de SMFS couplée à une bifonctionnalisation de la pointe de l' AFM avec deux ligands, afin d'obtenir des images par AFM à haute résolution et cartographier simultanément deux molécules différentes sur la surface cellulaire. La seconde étude utilise une technologie particulière de l'AFM, la SMFS pour quantifier les paramètres cinétiques et thermodynamiques de la liaison de PAR1 avec des ligands natifs et synthétiques. Pour cela, l'analyse des CFs permet d'obtenir des paramètres tels que l'adhésion, la force, la déformation de l'échantillon sous les impacts de la pointe, la dissipation d'énergie et le module de Young. La topographie à haute résolution du protéoliposomes où PAR1 est détecté et simultanément quantifié la force de liaison entre le récepteur avec différents ligands. Cette méthode d'analyse par AFM a pu montrer une différence dans les propriétés physiques dans l'interaction entre PAR1 et un ligand synthétique ou naturel. Ces travaux ont ouvert une nouvelle approche du domaine des RCPGs et de leur comportement face à la nature des ligands, et où peuvent s'inscrire mes travaux de thèse.

Pour cette étude, nous nous sommes proposés d'observer l'architecture oligomérique des RCPGs sous différentes conditions, après stimulation de différents agonistes et la densité de récepteurs exprimés sur la membrane. Grâce à la SMFS, les RCPGs d'intérêts (B2-AR AT1, et mGlu3) fusionnés en N-terminal par l'épitope HA vont être détectés par la pointe AFM préalablement fonctionnalisée avec un anticorps anti-HA. Lorsque aura lieu une interaction entre la pointe et la molécule, les courbes de retrait décrivent un événement adhésif spécifique du RCPG, qui se caractérise par la force de rupture et la distance de rupture entre la pointe et la surface. L'utilisation de la SMFS permet une approche innovante pour l'étude de l'architecture oligomérique des RCPGs par l'analyse de ces distances de rupture des interactions entre la pointe et le récepteur. Ces expériences ont été faites sur des cellules vivantes (CHO) et sous différentes conditions (densité de récepteurs sur la membrane, effet d'un ligand etc).

123. Projet de thèse : Etude par AFM de l'architecture oligomérique des RCPGs sur la membrane cellulaire

123.1 Validation de notre protocole

Néanmoins, avant de pouvoir analyser les distances de rupture afin d'obtenir des renseignements sur l'architecture de l'oligomérisation des RCPGs, il a fallu valider le système « HA / Anti-HA ». Pour cela des surfaces modèles ont été fonctionnalisées avec l'épitope HA, (**Fig.17**) et différentes conditions expérimentales ont été testées. Un blocage des épitopes a été effectué afin de vérifier la spécificité de notre interaction, puis des expériences de loading rate ont déterminé le profil énergétique de la liaison entre l'épitope HA et son anticorps[91]. De plus l'influence du temps de contact, entre la pointe fonctionnalisée et la surface HA, a été testée. Le résultat montre que la probabilité d'adhésion augmente avec le temps de contact ce qui est un argument de plus pour prouver la spécificité de l'interaction.



<u>Figure 17 :</u> *Spectroscopie de Force à l'échelle de la molécule unique associé au système HA fusionné au RCPG et anticorps Anti-HA* *fonctionnalisé sur la pointe AFM.* ***a)*** *Interactions entre les molécules peptidique HA immobilisées sur lame de verre époxy, et les anticorps Anti-HA immobilisés sur une pointe d'AFM, avec un loading rate de 70 nN/s.* ***b)*** *Blocage des épitopes HA par des anticorps Anti-HA.* ***c)*** *Loading rate dépendance et* ***d)*** *Probabilité d'adhésion en fonction du temps de contact (d'après[82])*

Une fois cette validation faite sur surface modèle, l'interaction entre l'épitope et la pointe fonctionnalisée a été testée et validée dans un système cellulaire. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication présentée au chapitre II : «Mapping HA-tagged protein at the surface of living cells by atomic force microscopy » [82]. Grâce à cette validation du système « HA / Anti-HA » nous avons pu utiliser les données de distance de rupture entre les récepteurs membranaires tagués HA et la pointe AFM anti HA, pour analyser l'architecture oligomérique à la surface d'une cellule vivante.

123.2 Spectroscopie de Force à l'échelle de la molécule unique appliquée aux RCPGs taggés

Dans cette étude nous nous sommes intéressés dans un premier temps, à l'analyse de nos courbes de force afin d'observer la distribution des distances de déploiements, et de vérifier si ce pattern de distributions est reproductible chez tous nos RCPGs étudiés (HA-AT1, HA- ARβ2 HA-mGlu3).

- Puis grâce à une protéine chimérique, le récepteur AT1 fusionné en son C-term à une protéine G qui aura un rôle d'ancrage, nous chercherons à vérifier que l'on accroche spécifiquement un récepteur.
- Une fois ces paramètres validés, nous chercherons à observer l'effet de la densité de récepteurs présents sur la surface membranaire sur le degré d'oligomérisation des RCPGs. Pour ce faire, nous avons transfecté des quantités de plasmides, codant les RCPG, croissantes (0,01µg/0,1µg/1µg)
- Enfin nous avons évalué l'impact de différents ligands synthétiques et endogènes (Angiotensine II pour AT1, Isoprotérenol/Epinephrine/Norepinephrine pour ARβ2) sur l'architecture de ces récepteurs dans la membrane.

Nos résultats ont montré que les RCPGs présentent une architecture particulière à la surface de la cellule. En effet, les récepteurs de la famille A (AT1 et ARβ2) tout comme les récepteurs de la famille C (mGlu3) présentent une organisation oligomérique, plus particulièrement en dimères et tétramères dans la condition définie comme basale (c'est-à-dire transfectée avec une quantité de 1µg de plasmide codant). Ces états d'oligomérisation ont pu être déterminés d'après les populations majeures de distances de rupture entre le dendritip Anti-HA et le tag HA fusionné en N-term du RCPG étudié. La population de distance la plus représentée chez les récepteurs de la famille A est de 500 nm (+/-50), cette longueur représenterait celle d'un tétramère. Cette donnée pourrait confirmer l'idée que la forme tétramérique des RCPG-A est la plus stable et donc la forme prédominante[92]. Cette étude de B. Kobilka[92]par FRET a été faite sur ARβ2 exprimée sur bicouche lipidique et montre que la forme tetramérique serait la forme oligomérique la plus stable au vu de sa prédominance dans les conditions d'analyse. Cependant cette organisation serait un équilibre entre les différents degrés d'oligomérisation (monomère/dimère/tétramère/hexamère/…). De plus il ne faut pas oublier que c'est un phénomène très dynamique, les récepteurs s'associent et se dissocient en permanence. Une autre étude de 2013[93] faite par SNAP-Tag couplée à la microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRFm) a permis le suivi de récepteurs dans le temps est a pu déterminer le temps de d'association lors d'une interaction dimérique de RCPG qui est d'environ 5 secondes (± 0,20s). Ce temps montre bien le caractère transitoire d'une forme oligomérique.

Cependant lors d'une stimulation par agoniste des RCPG-A cette architecture oligomérique sur la surface membranaire est modifiée. Nous avons pu constater le mécanisme d'internalisation avec la diminution du nombre de récepteurs présents à la surface cellulaire, illustré par l'augmentation du nombre de courbes ne présentant aucun motif adhésion. En plus de cette diminution quantitative du nombre de récepteurs nous avons pu observer une modification qualitative des populations oligomériques résiduelles. Les populations de dimères, tétramères et hexamères avec des distances de déploiements respectivement de 250, 500 et 750 nm, qui étaient majoritaires avant la stimulation, disparaissent. Les récepteurs restant sur la membrane sont sous forme de monomères, caractérisés par des déploiements de 180 nm (± 25 nm). D'après nous pouvons formuler l'hypothèse suivante : lorsque l'agoniste va se lier à son récepteur, préférentiellement à des récepteurs oligomères, le complexe va être internalisé, puis le RCPG internalisé est par la suite recyclé afin de retourner sur la membrane, et sera alors sous forme monomérique. Cette forme monomérique pourrait être une forme inactive de lu récepteur, ce qui permettrait à la cellule d'être dans une phase de désensibilisation. Ce phénomène permettrait un contrôle de la durée d'activation de la cellule afin de moduler, réguler la transduction du signal[94]. Ces résultats peuvent confirmer une étude faite par la méthode de complémentation de fluorescence bimoléculaire (BiFC), chez les récepteurs à la dopamine appartenant à la famille A. En effet, dans ces travaux, les auteurs fournissent les premières démonstrations de l'influence de l'oligomérisation des RCPGs sur la modulation de l'effet des drogues[95].

Toutefois, nos résultats peuvent aussi être considérés comme contradictoires avec d'autres études qui ne démontrent pas l'impact de la stimulation d'agonistes sur l'oligomérisation des RCPGs. Par exemple les travaux de Calebiro et al. par TIRFm ne montrent aucun effet, l'isoprotérénol 10µM, sur l'organisation des ARβ2[93]. Cependant, dans cette étude, les auteurs ne décrivent pas, non plus, de phénomènes d'internalisation. Peut-être que leur stratégie expérimentale, basée sur le suivi des RCPGs par un SNAP-Tag fluorescent est en cause. La fixation du SNAP-Tag sur le RCPG d'intérêt pourrait induire un encombrement stérique qui empêche la stimulation des RCPGs, ou du moins limite l'accès de l'agoniste sur son site actif.

Dans la littérature il est reconnu qu'il y a une différence dans le mécanisme d'internalisation selon la nature de l'agoniste : qu'il soit synthétique ou naturel. Le taux d'internalisation des récepteurs differents[96]. Nous avons pu confirmer ce résultat en observant une différence de comportement dans l'oligomérisation après une stimulation avec un agoniste synthétique ou endogène (**Fig. 18D**). Lors de la stimulation avec l'isoproterenol, l'agoniste synthétique, il y a une perte de toutes les populations oligomériques, que ce soient les dimères, les tétramères ou les hexamères. Alors qu'avec une stimulation avec l'Epinephrine et Norepinephrine, les molécules vont préférentiellement faire internaliser les récepteurs oligomérisés en tétramères. Il semble que les agonistes endogènes ciblent plus spécifiquement une population d'oligomère. Cette

caractéristique des agonistes endogènes pourrait expliquer le fait que les agonistes dits synthétiques ont la plupart du temps des effets secondaires notables car il est très probable qu'il y ait une régulation des voies de signalisations liée au degré d'oligomérisation des récepteurs activés. Les récepteurs en fonction de leur degré d'oligomérisation pourraient présenter des différences mineures dans leur conformation spatiale. De sorte que l'affinité pour tel ou tel ligand s'en trouverait modifiée. Il en résulterait l'activation d'une voie de signalisation spécifique, sans déclencher les autres, qui pourrait être délétère et responsable d'effets non désirés. Un agoniste synthétique, développé pour maximiser son affinité pour ses récepteurs, ne pourra pas détecter ces fines différences et probablement activera toutes les voies de signalisation. Cette hypothèse a été développée dans la littérature dans les articles suivants[67,97–99].

Pour visualiser les modifications des populations oligomériques dans les différentes conditions que nous avons testées (quantité croissante de plasmide transfecté **Fig. 18A** et **18B,** effet d'un agoniste **Fig. 17C** et **17D**, effet différentiel des ligands naturels ou synthétiques **Fig. 18D**) nous avons synthétisé les résultats sous la forme d'un histogramme (**Fig. 18**). Sur cet histogramme de distributions des différentes populations, nous pouvons constater que lors d'une stimulation par un agoniste, ce sont les tétramères qui semblent diminuer le plus fortement, puis les dimères (**Fig. 18A** et **B**). Cependant l'apparition des monomères après stimulation sur la surface membranaire, pourrait avoir comme fonction la désensibilisation de la cellule comme précédemment développé (**Fig. 18 C** et **D**). La différence entre une stimulation par un agoniste synthétique ou naturel se fait, semble-t-il, au niveau de l'internalisation de certaines populations oligomériques. En effet, les agonistes synthétiques font internaliser tous les oligomères, alors que les agonistes naturels semblent cibler préférentiellement les dimères avec plus ou moins d'efficacité selon l'affinité de l'agoniste pour le récepteur.

Cependant toutes ces hypothèses doivent être pondérées par les limites de notre approche. En ce qui concerne ces limites, elles sont de 2 types : les limites « biologiques » et les limites « techniques ». Au niveau biologique, notre biais le plus important est celui de la surexpression des récepteurs. En effet, la dose de transfection appliquée dans nos conditions basales sont supérieures à la quantité physiologique. Donc la formation d'oligomères peut avoir été forcée en raison du grand nombre de récepteurs sur la membrane. Cependant l'observation d'effets différents selon les conditions de stimulations montre que même si ces oligomères ont été induits par une surexpression ils présentent une activité modulée selon leurs degrés, ce qui corrobore certaines étude de la littérature[97].

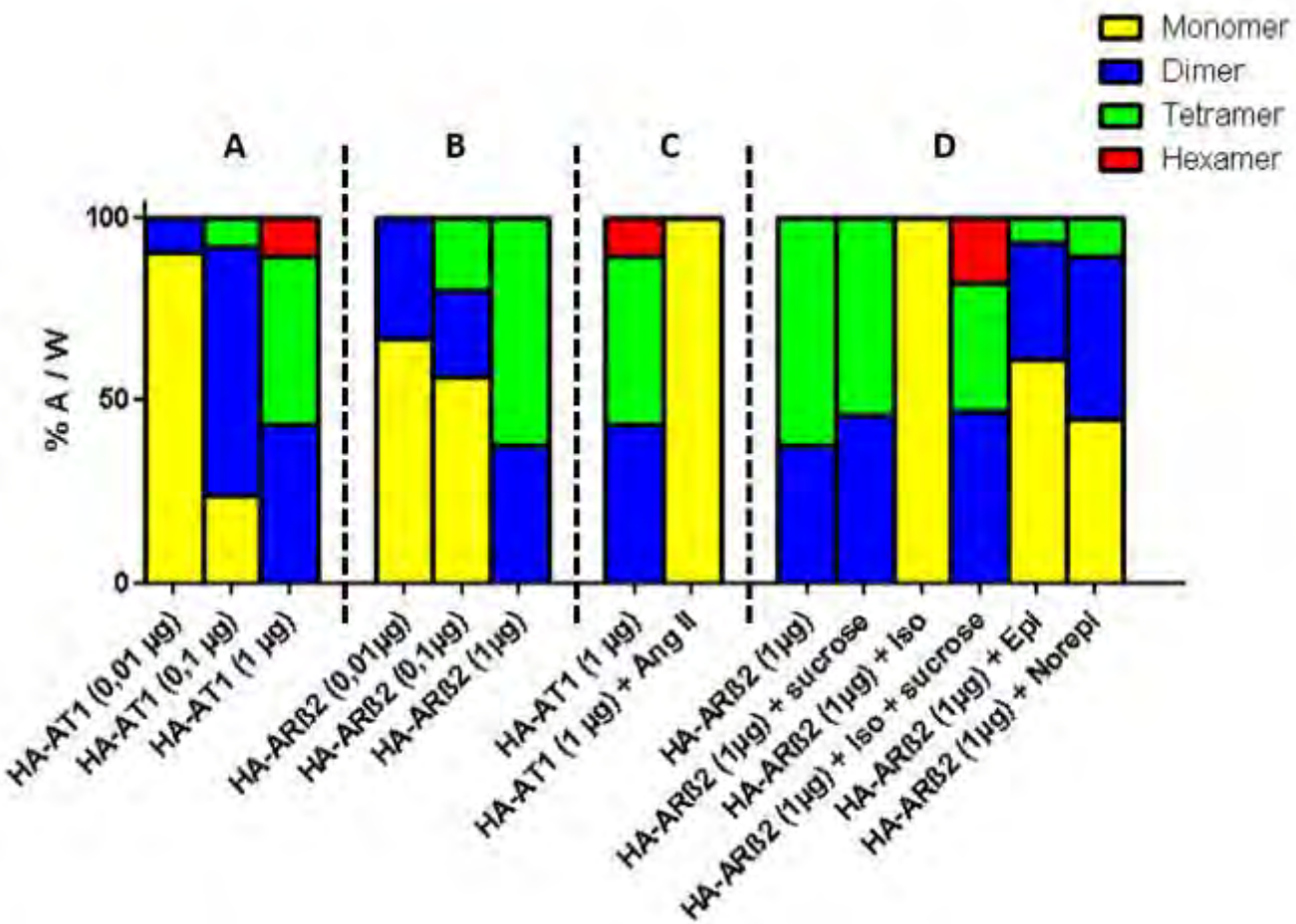


*Figure 18***Répartition des différentes populations oligomérique selon les conditions**.
Chaque population oligomérique est représentée par l'aire sous la courbe gaussienne associée à cette dernière pondérée par la largeur à i hauteur afin de tenir compte de la largeur de la distribution. Les valeurs obtenues ont été mis sous forme de pourcentage en divisant par l'aire totale de la courbe de la distribution des distances de rupture de la condition. **A**) Répartition des différentes population oligomérique selon les **différentes densités de plasmide codant pour HA-AT1**transfectée dans la cellule **B**) Répartition des différentes population oligomérique selon les **différentes densités de plasmide codant pour HA-ARβ2**transfectée. C)Répartition des différentes populations du récepteur **HA-AT1 1µg avant et après stimulation par son agoniste** Angiotensine II (10µM, 20minutes) **D)** Répartition des différentes populations du récepteur **HA-ARβ2 1µg avant et après stimulation par un agoniste** synthétique, l'Isoprotérénol (10µM , 20 minutes), par 2 agoniste naturels, la Ephrine et la Norepinephrine (10 µM, 20 minutes), avec contrôle de blocage de l'internalisation avec incubation préalable du sucrose (200µM, 1 heure)

Mon travail basé sur une approche novatrice dans l'étude de l'oligomérisation des RCPGs par spectroscopie de force a permis de montrer l'importance de l'activité oligomérique de ces récepteurs lors d'une stimulation de leur agoniste. Cependant l'utilisation de l'AFM dans une étude sur les RCPGs a déjà été faite, les auteurs ont développé une méthode d'analyses des courbes forces-distances générées par AFM[87,88] pour quantifier la différence de force d'interaction dynamique entre un RCPG, ici PAR1 (protease activated receptor-1), et un ligand natif (SFLLRN) ou synthétique (TRAPs). Mais nous avons été les premiers à utiliser l'AFM pour étudier le comportement des RCPGs à la surface de cellules vivantes, ce qui a généré plusieurs difficultés. En travaillant sur des cellules vivantes nous sommes confrontés à la complexité de la membrane cellulaire. Les RCPGs, dans une membrane cellulaire, sont en interaction avec de nombreuses autres protéines, lipides ou sucres. Cette réalité biologique a un impact sur nos mesures et notamment les déploiements. En effet, associé aux HA-RCPGs nous allons potentiellement déplier d'autres molécules et surement des nanotubes de membranes[100,101]. Cette complexité est la raison du bruit observé sur nos distributions. Elle explique ainsi que lors du dépliement d'un monomère, nous ne trouvions pas la distance théorique mais souvent une distance un peu plus longue. Nous pouvons exclure que nos déploiements de longues distances (attribués à des oligomères de RCPGs) soient exclusivement des nanotubes de membrane car, ces derniers disparaissent avec l'internalisation des récepteurs après stimulation par un agoniste. De plus lorsque la densité de récepteur sur la membrane diminue, quelques déploiements à grande distance persistent. Certes avec la diminution du nombre de récepteurs sur la membrane, la formation de nanotubes est plus difficile car il y a nécessité d'une interaction entre la pointe fonctionnalisée et une protéine pour former un nanotube de membrane. Cependant le fait que nous avons la capacité de mettre en évidence des populations distinctes de distances de rupture, montre l'existence de ces déploiements de RCPGs plus ou moins oligomérés. Si cela n'était que des déploiements de nanotubes de membranes il n'y aurait que des distances aléatoires sans mise en évidence de populations particulières.

Notre étude a permis, malgré les limites évoquées ci-dessus, d'étudier l'organisation des RCPGs ainsi que le rôle de l'oligomérisation dans l'activité de ces derniers. Ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives dans le domaine des RCPGs. La compréhension de l'activation différentielle pourrait potentiellement conduire à limiter les effets secondaires des nombreux médicaments ciblant les RCPGs. Augmenter la spécificité des molécules thérapeutiques, permettrait de cibler une certaine population oligomérique et donc d'activer finement une voie spécifique de transduction du signal voulu et non pas toutes (y compris celles responsables d'effets non désirés). La connaissance fine des cibles (ici les RCPGs plus ou moins oligomérisés)

pourra être utilisée pour la synthèse de nouvelles molécules thérapeutiques (drug design) ayant cette capacité. C'est une nouvelle piste pour la lutte contre les cardiopathologies. L'étude de l'architecture de l'oligomérisation pour les récepteurs cible des molécules pouvant traiter l'IC, et permettrait de synthétiser de nouvelles molécules plus sensibles, plus spécifiques et de limiter leurs effets secondaires, voire les supprimer.

13. Discussion

Ces travaux de thèse ont permis de mettre en avant une technologie issue des nanosciences, l'AFM, dans des domaines qui ont été très longtemps restreints au monde de la biologie stricte. En effet, dans mon premier chapitre « Application de l'AFM en cardiologie », nous avons pu étudier l'évolution de la ML lors de l'installation de l'IC avec une approche biophysique. Ces différentes études ont permis la mise en évidence d'effet précoce sur la ML, dans les toutes premières phases de l'évolution d'une IC. Des anomalies élastiques apparaissent, associées à des changements morphologiques de la surface membranaire. Ces modifications nanomécaniques comme topographiques sont dues à des bouleversements mitochondriaux et plus particulièrement, dans un premier temps, à une perte des SSM et dans un temps plus tardif une désorganisation des IFM. Ces effets sont observables lors d'une IC provoquée par un infarctus du myocarde mais aussi lors de l'installation d'une IC à la suite d'une toxicité d'une chimiothérapie basée sur la molécule anticancéreuse de Dox. Ces premières observations et découvertes ouvrent le champ à de nouvelles questions en cardiologie qui pourront être abordées avec l'AFM, telle que la reproductibilité des phénomènes membranaires chez toutes les IC, quel que soit le facteur responsable du développement de cette pathologie ou étudier le potentiel réversible de ces modifications membranaires.

En parallèle de ces études, nous avons développé une nouvelle approche pour comprendre l'architecture oligomérique d'une famille de récepteurs, très ciblés en pharmacologie, les RCPGs. Cette approche est basée sur l'AFM dans le mode de spectroscopie de force à l'échelle de la molécule unique. Nos résultats ont permis de montrer une distribution oligomérique des RCPGs qui est spécifique selon les conditions appliquées. Nous avons pu observer des différences dans les proportions des populations oligomériques lors de stimulation avec des ligands endogènes ou artificiels. La mise en évidence de ce phénomène est une avancée majeure dans le domaine des RCPGs et pourrait aider à comprendre la cause des effets secondaires et pourquoi pas dans l'avenir y remédier.

131. Avantages de l'AFM dans notre étude

L'AFM a été utilisée, dans ces travaux de thèse, comme un outil pouvant répondre à différentes questions biologiques en proposant de nouvelles approches. Grâce à l'AFM nous avons pu analyser par spectroscopie de force à la fois l'élasticité de la surface mais aussi sa topographie et même l'architecture oligomérique de protéines membranaires d'intérêt. De plus l'un des avantages les plus importants de cette technique est la possibilité de faire ces mesures dans une atmosphère proche des conditions physiologiques et donc sur des cellules vivantes. Dans notre cas, cela a été rendu possible par l'utilisation du module *PetriDishHeater*© de JPK. Ce module permet de contrôler et maintenir une température constante de 37°C pour les expériences sur cellules

vivantes avec une atmosphère contenant 5% de CO_2 pour l'étude des CMs. C'est un réel avantage par rapport au reste des techniques de microscopies utilisées dans les domaines que nous avons explorés, ce qui rend nos résultats originaux et peut être plus proches de ce qui se déroule *in vivo*. L'AFM m'a offert la possibilité de développer une vision interdisciplinaire, et donc peu commune, de questions non résolues de la cardiologie.

132. Limites technologiques et biologiques à nos travaux

Mais comme toutes techniques, l'AFM présente des limites. Sa principale limite dans le domaine de la cardiologie est la nécessité d'étudier le CM en tant que cellule isolée. Ce qui entraine des biais dans notre travail :

- la perte de l'environnement 3D du CM, altère probablement son intégrité. En effet le CM est une cellule avec une structure tridimensionnelle très complexe, donc l'isoler de son tissu le modifie certainement.
- biais de sélection lors de la mesure AFM : pour effectuer un enregistrement des données mécaniques de la surface, le CM est soumis à une pression provoquée par le contact de la pointe sur la ML, ce qui oblige à choisir un CM dont l'intégrité de la ML est suffisante pour supporter la mesure.
- Une autre limite de l'AFM dans l'étude du CM est le temps d'acquisition, en effet pour obtenir nos cartes de 100 μm^2 avec 4096 CF il faut environ 12 min, c'est une durée limite compte tenu de la rapidité de dédifférenciation de cette cellule.

Néanmoins, nous avons pu palier à ces limites grâce à des observations faites en parallèle au TEM sur tissu cardiaque. Les potentiels biais engendrés par l'AFM ne semblent pas avoir affecté les données obtenues, les observations réalisées à l'AFM corrèlent avec celles faites sur les CMs dans son tissu et montre les mêmes caractéristiques morphologiques.

D'autres limites liées à la biologie sont aussi à prendre en compte, telle que la limite du modèle d'étude utilisé. En effet nous avons utilisé un modèle murin qui pose aussi ses limites quant à la transposition des résultats chez l'Homme. Malgré des différences flagrantes entre ces deux espèces, les caractéristiques morphologiques des CMs restent semblables. Cependant les CMs de souris ne sont pas soumis à la même tension pariétale induite par la fonction contractile. Ces différences peuvent jouer sur la rapidité et l'intensité des anomalies qui apparaissent lors de l'installation d'une IC. A la différence des biais issus de la technique, les limites biologiques ne peuvent être écartées par un couplage avec une autre méthode d'observation. Ces limites doivent être prises en compte lors de l'exploitation de nos résultats qui peuvent être restreints au modèle murin, la transposition chez l'Homme étant très délicate.

En ce qui concerne notre utilisation de l'AFM dans l'étude de l'architecture oligomérique des RCPGs, la plus grande limite est de ne pas savoir réellement ce que nous déployons. En travaillant sur cellules vivantes nous sommes confrontés à des données de distances de rupture qui ne peuvent être « propres », car nos RCPGs sont dans une membrane cellulaire et donc en interaction avec de nombreuses autres protéines, lipides ou sucres. Ce paramètre va impacter sur nos déploiements, en effet associé aux HA-RCPGs nous allons potentiellement déplier aussi d'autres substances et même des nanotubes de membranes[99,100]. Afin de tenter d'exclure un maximum ces potentiels artefacts, nous avons multiplié les contrôles en effectuant, notamment, des tests ELISA. Ce test est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps. Les RCPGs exprimés à la membrane ont été ciblés par des anticorps qui sont par la suite marqués par les antigènes. Cette technique permet de détecter par colorimétrie la présence de ces protéines sur la surface membranaire. Mais nous n'avons pas de preuves directes que ce que nous observons correspond bien à des RCPGs. De plus, notre étude possède des limites liées à la biologie comme par exemple la surexpression des RCPGs à la surface des cellules. En effet, c'est cette surexpression qui pourrait forcer la formation des oligomères de hauts degrés. Néanmoins ce biais peut être pondéré par l'observation d'écarts entre les différentes conditions et plus précisément après stimulation de ligand. Les populations d'oligomères de hauts degrés, même si elles sont surestimées en raison de la surexpression des récepteurs, sont impactées après stimulation de ligands.

Cependant ces limites techniques peuvent être diminuées par l'utilisation d'autres méthodes d'observations en parallèle. Chaque technique possède ses limites donc en multipliant les approches nous pouvons palier au maximum les biais et les limites. C'est ce que nous avons fait en utilisant le TEM pour l'étude sur CM et les tests ELISA pour les travaux sur les RCPGs. Les limites biologiques sont plus difficiles à outrepasser.

133. Perspectives (diagnostic, dépistage…)

L'utilisation de l'AFM ouvre de belles perspectives dans les domaines que j'ai abordés au cours de ma thèse. L'approche biophysique sur ces questions biologiques a permis d'aborder les problèmes d'une façon originale. Au cours de ma thèse, les nouveaux modes multiparamétriques d'AFM ont émergé.[27,102]. Ces nouveaux modes permettent en un seul balayage d'obtenir des données nanomécaniques ainsi que topographiques et d'adhésion ; tout comme le mode spectroscopie de force mais avec une vitesse et donc une résolution plus importante. Notre équipe a commencé à appliquer ce nouveau mode à l'étude des CMs ce qui a donné lieu à une publication soumise à Journal of Structural Biology. Dans ce travail nous comparons les données obtenues sur la ML de

CM dans un mode classique de force volume et dans un mode multiparamétrique (Cf § 32.). Ce nouveau mode permettrait de palier à la limite évoquée précédemment concernant le temps d'acquisition et le risque de dédifférenciation, de plus avec l'augmentation de la résolution nous pourrions observer des anomalies encore plus fines, lors de l'installation de l'IC. La prochaine étape est d'utiliser l'AFM sur tissu pour éviter les biais issus de l'étape d'isolement des CMs. Cette amélioration ne semble pas impossible et demande seulement de la mise en point. Au cours de ma dernière année de thèse nous avions commencé à tester cette approche. Le problème auquel je me suis confrontée est la difficulté d'obtenir un morceau de tissu avec une surface de 3 x 3 mm présentant une rugosité supérieure à 50 µm. En effet, le débattement maximum de la céramique piézoélectrique de l'AFM que j'utilisais est de 24 µm. Une solution consisterait à augmenter le débattement en Z, en utilisant par exemple le module CellHesion de JPK instrument. Ce module possède un jeu de piezo assurant un débattement en Z jusque 100 µm. Cette distance permettrait sans doute d'obtenir une cartographie des propriétés mécaniques et adhésives d'une coupe de tissu cardiaque.

Dans un avenir plus lointain, l'AFM pourrait alors être utilisé dans un domaine encore plus appliqué : le diagnostic. Avec une biopsie il serait possible de déceler des anomalies précoces dans la structure et les propriétés nanomécaniques du tissu. Ces anomalies sont actuellement, recherchées en utilisant les méthodes de colorations histologiques. Par exemple dans le dépistage d'un rejet de greffes d'organes, des biopsies sont réalisées très régulièrement dans les premiers mois. En cas de rejet, les tissus subissent des modifications de leurs propriétés, avec notamment une augmentation de l'élasticité en raison d'une augmentation de la densité des tissus collageneux[103]. Les premiers signes du rejet pourraient être dépistés par un AFM, qui serait à usage médical, et donc permettrait de mettre en place, plus rapidement, l'adaptation du traitement immunosuppresseur ; pour éviter un rejet total de l'organe nouvellement greffé.

Conclusion

Ce projet doctoral avait pour objectif d'étudier les propriétés biophysiques des cardiomyocytes vivants en condition physio/physiopathologique et l'architecture des récepteurs couplés aux protéines G explorée par microscopie à force atomique. Pour cela, il a fallu mettre en place une stratégie interdisciplinaire, à l'interface de la physique, de la chimie et de la médecine, ce qui a permis de répondre à des questions originales par une approche innovante dans deux sujets du domaine biologique de fort intérêt :

- Les effets précoces de l'insuffisance cardiaque (IC) sur le cardiomyocyte (CM)
- L'impact de l'oligomérisation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sur leur activité.

Pour ces deux études nous avons utilisé une technologie issue des nanosciences, la microscopie à force atomique (AFM), dans des domaines qui ont été très longtemps restreints au monde de la biologie stricte.

En ce qui concerne ma première étude nous nous sommes donc intéressés aux étapes précoces de l'installation de l'IC et leurs impacts sur la membrane latérale (ML) de l'unité contractile du cœur : le CM. Comme nous l'avons précédemment décrit, l'IC est définie au niveau cellulaire par une nécrose des CMs, et nous savons que ce phénomène de mort cellulaire est induit à la suite d'un mécanisme de rupture mécanique de la membrane plasmique des cellules. Cette nécrose est donc caractérisée par une fragilité préalable de la ML des CMs amenant à sa rupture. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons observé les modifications topographiques et mécaniques précoces de la ML pouvant être initiatrices de cette fragilité membranaire, à long terme. Puis nous avons cherché à déterminer si ces potentielles anomalies de la ML sont un phénomène commun aux IC de différentes origines. Pour répondre à ces interrogations, l'AFM a été un outil de choix et plus précisément le mode spectroscopie de force (SF). Des données topographiques et sur l'élasticité ont ainsi été obtenues sur CMs vivants et en atmosphère contrôlée (5% de CO_2, 37°C). Ces résultats ont mis en évidence des effets précoces, de l'IC provoquée par un infarctus, sur la ML. Des anomalies élastiques apparaissent, associées à des changements morphologiques de la surface membranaire. Afin de comprendre la cause de ces anomalies nous avons couplé nos acquisitions AFM avec des observations en microscopie électronique à transmission pour observer les modifications intracellulaires. Nous avons pu constater que ces anomalies nanomécaniques comme topographiques sont dues à des bouleversements mitochondriaux et plus particulièrement, dans un premier temps à une perte des SSM et dans un temps plus tardif une désorganisation des IFM. La suite de notre étude a été

de vérifier si ces résultats pouvaient être communs à des ICs d'origines différentes. Pour cela nous avons cherché à observer si les mêmes anomalies étaient présentes lors d'une IC apparue à la suite d'une toxicité d'une chimiothérapie basée sur la molécule anticancéreuse de Dox. J'ai montré que dans ce modèle d'IC, d'installation lente, les mêmes anomalies mécaniques et topographiques apparaissent au cours du temps.
Mes travaux montrent une modification très précoce de la ML au cours de l'évolution vers l'IC : au niveau de la structure topographique et de l'élasticité. Ces premières observations et découvertes ouvrent le champ à de nouvelles questions en cardiologie qui pourront être abordées avec l'AFM tel que la reproductibilité de ces phénomènes membranaires chez toutes les IC quelles que soit l'origine de cette pathologie et/ou d'étudier le potentiel réversible de ces modifications, ainsi que l'observation des effets d'une activité physique et/ou de l'alimentation (ex : Omega 3) sur les propriétés de la ML des CMs.

En parallèle de ces travaux, nous avons développé une nouvelle approche pour comprendre l'architecture oligomérique d'une famille de récepteurs, très ciblés en pharmacologie, les RCPGs. Ces récepteurs sont la cible de plus de 30 % des molécules thérapeutiques sur le marché. Certains sont utilisés pour traiter l'IC comme, par exemple, les bêta-bloquants et les vasodilatateurs. Cependant leur utilisation est souvent limitée par leurs effets secondaires invalidants. De nombreuses études ont été conduites pour tenter de limiter ces effets indésirables, rendre les traitements plus spécifiques, et, mieux comprendre les mécanismes responsables des effets secondaires. Le but étant de les diminuer, et si possible, de les supprimer. Des recherches précédentes ont révélé certains aspects controversés et mis en évidence des points encore inconnus qui pourrait être la clef de la compréhension de ces effets non désirés. Les résultats montrent que les RCPGs forment des oligomères qui pourraient avoir un rôle dans la régulation de l'activité de ces récepteurs. En effet, une étude récente a montré un lien entre l'oligomérisation des RCPGs et les effets secondaires induits par une molécule synthétique par rapport à son homologue naturelle. C'est dans ce contexte que nous nous sommes proposés d'observer l'architecture oligomérique des RCPGs dans différentes conditions, (après stimulation de différents agonistes, densité de récepteurs exprimés sur la membrane croissante) par AFM. Cette approche est basée sur une technologie AFM : la spectroscopie de force à l'échelle de la molécule unique. Les récepteurs sont marqués par un Tag HA en N-terminal qui est détecté, spécifiquement, par une pointe AFM, fonctionnalisée par un anticorps anti-HA. Mes résultats montrent une distribution oligomérique des RCPGs qui est spécifique des conditions appliquées. Nous avons pu observer des différences dans les proportions des populations oligomériques lors de stimulation avec des ligands endogènes ou artificiels. Nos résultats montrent qu'après une stimulation par un ligand artificiel toutes les populations oligomériques des RCPGs vont être

activées puis internalisées, alors qu'une stimulation par un ligand naturel cible préférentiellement certaines populations oligomériques, les tétramères. La mise en évidence de ce phénomène est une avancée majeure dans le domaine des RCPGs et pourrait aider à comprendre la cause des effets secondaires et permettre, peut-être, dans l'avenir de trouver un moyen de les supprimer.

L'utilisation de l'AFM ouvre de belles perspectives dans les domaines que j'ai abordés au cours de ma thèse. L'approche biophysique sur ces questions biologiques a permis d'aborder les problèmes d'une façon originale. L'interdisciplinarité de ma thèse a été un moyen de mettre en connexions plusieurs « mondes » qui n'interagissaient pas particulièrement dans ces domaines. Ce qui a été à la fois une belle opportunité au niveau scientifique avec l'obtention de résultats uniques et novateurs mais aussi s'est révélé un challenge dans la communication et la mise en place du projet. Etre à l'interface de de la biologie et de la physique a demandé, sur le plan matériel, de mettre en place un dispositif expérimentale alliant la biologie animale, avec la purification des CMs ou la culture cellulaire pour les RCPGs, et un outil issu de la physique, l'AFM. De plus cette position a demandé d'acquérir des connaissances à la fois en biologie cardiaque, des RCPGs mais aussi en culture cellulaire et expérimentation animale, et en biophysique avec l'utilisation et la compréhension de l'AFM. Mais le plus difficile, pour moi, a été de pouvoir communiquer mon travail avec des interlocuteurs d'une discipline, ou de l'autre, en étant perçu comme légitime. Malgré ces difficultés, les résultats obtenus grâce à cette approche en cardiologie et dans le domaine des RCPGs sont novateurs et ouvrent de nouvelles perspectives dans ces thématiques. De nos jours, l'interconnexion entre plusieurs disciplines scientifiques se développe de plus en plus et permet l'émergence de nouveaux domaines interdisciplinaires qui seront probablement porteurs découvertes scientifiques futures.

En ce qui concerne mon projet, l'analyse des propriétés biophysiques des CMs vivants en condition physio/physiopathologique et l'architecture des RCPGs explorée par AFM, l'interdisciplinarité a permis la mise en évidence d'anomalies précoces au niveau de la ML des CMs lors de l'installation de l'IC, et l'impact de différentes conditions sur l'oligomérisation des récepteurs. Mes résultats sont des bases dans ces domaines de recherches et laissent entrevoir la mise en place de futur projet

Références bibliographiques

1. Bounhoure, J.-P. Histoire de la cardiologie: des hommes, des découvertes, des techniques. (Privat, 2004).
2. World Health Organization.OMS | Maladies cardiovasculaires. (2015).
3. Mozaffarian, D. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update A Report From the American Heart Association. Circulation CIR.0000000000000350 (2015). doi:10.1161/CIR.0000000000000350
4. Katz, A. M. Physiology of the Heart.(Lippincott Williams & Wilkins, 2010).
5. Woodcock, E. A. &Matkovich, S. J. Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies. Int. J. Biochem. Cell Biol. 37, 1746–1751 (2005).
6. Leu, M., Ehler, E. &Perriard, J.-C.Characterisation of postnatal growth of the murine heart.Anat. Embryol. (Berl.)204, 217–224 (2001).
7. Belke, D. D., Larsen, T. S., Gibbs, E. M. & Severson, D. L. Altered metabolism causes cardiac dysfunction in perfused hearts from diabetic (db/db) mice. Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.279, E1104–E1113 (2000).
8. Sowers, J. R., Epstein, M. &Frohlich, E. D. Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease An Update. Hypertension 37, 1053–1059 (2001).
9. Gorelik, J. et al.A novel Z-groove index characterizing myocardial surface structure.Cardiovasc.Res. 72, 422–429 (2006).
10. Lyon, A. R. et al. Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart. Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 6854–6859 (2009).
11. Dague, E. et al. Atomic force and electron microscopic-based study of sarcolemmal surface of living cardiomyocytes unveils unexpected mitochondrial shift in heart failure. J. Mol. Cell. Cardiol.74, 162–172 (2014).
12. Bui, A. L., Horwich, T. B. &Fonarow, G. C. Epidemiology and risk profile of heart failure. Nat. Rev. Cardiol. 8, 30–41 (2011).
13. Dhalla, N. S., Heyliger, C. E., Beamish, R. E. & Innes, I. R. Pathophysiological aspects of myocardial hypertrophy. Can. J. Cardiol.3, 183–196 (1987).
14. Mann, D. L. & Bristow, M. R. Mechanisms and Models in Heart Failure The Biomechanical Model and Beyond. Circulation 111, 2837–2849 (2005).
15. Harvey, P. A. &Leinwand, L. A. Cellular mechanisms of cardiomyopathy. J. Cell Biol. 194, 355–365 (2011).
16. Silver MD, Gotlieb MD & Schoen.Cardiovascular Pathology, 3e. (Churchill Lingstone, 2001).
17. Virchow, R. L. K. Cellular pathology as based upon physiological and pathological histology ... / by Rudolf Virchow. Translated from the 2d ed. of the original by Frank Chance. With notes and numerous emendations, principally from MS. notes of the author. (J. B. Lippincott, 1863).
18. Majno, G. &Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis.An overview of cell death.Am. J. Pathol. 146, 3–15 (1995).
19. Sperandio, S., Belle, I. de &Bredesen, D. E. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 14376–14381 (2000).
20. DAVID H. BARKLA, P. R. G.The Fate of Epithelial Cells in the Human Large Intestine.Pathology (Phila.) 31, 230–238 (1999).
21. Golstein, P. & Kroemer, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition.Trends Biochem.Sci. 32, 37–43 (2007).
22. Galluzzi, L., Kepp, O., Krautwald, S., Kroemer, G. &Linkermann, A. Molecular mechanisms of regulated necrosis. Semin. Cell Dev. Biol. 35, 24–32 (2014).
23. Lipshultz, S. E., Alvarez, J. A. & Scully, R. E. Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. Heart 94, 525–533 (2008).
24. Kumar, S., Marfatia, R., Tannenbaum, S., Yang, C. &Avelar, E. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy 17 Years after Chemotherapy. Tex. Heart Inst. J. 39, 424–427 (2012).
25. VON HOFF, D. D. et al. Risk Factors for Doxorubicin-lnduced Congestive Heart Failure. Ann. Intern. Med. 91, 710–717 (1979).
26. Chatterjee, K., Zhang, J., Honbo, N. &Karliner, J. S. Doxorubicin Cardiomyopathy.Cardiology 115, 155–162 (2010).
27. Dufrêne, Y. F., Martínez-Martín, D., Medalsy, I., Alsteens, D. & Müller, D. J. Multiparametric imaging of biological systems by force-distance curve-based AFM.Nat. Methods 10, 847–854 (2013).
28. Hoh, J. H. &Hansma, P. K. Atomic force microscopy for high-resolution imaging in cell biology. Trends Cell Biol. 2, 208–213 (1992).

29. Lehenkari, P. P., Charras, G. T., Nykänen, A. & Horton, M. A. Adapting atomic force microscopy for cell biology.Ultramicroscopy 82, 289–295 (2000).
30. BP Jena & JKH Horber.Atomic Force Microscopy in Cell Biology.68, (Academic Press, 2002).
31. Müller, D. J. &Dufrêne, Y. F. Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface. Trends Cell Biol. 21, 461–469 (2011).
32. Pillet, F., Chopinet, L., Formosa, C. &Dague, É. Atomic Force Microscopy and pharmacology: From microbiology to cancerology. Biochim.Biophys.Acta BBA - Gen. Subj. 1840, 1028–1050 (2014).
33. Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, C. Atomic Force Microscope. Phys. Rev. Lett. 56, 930–933 (1986).
34. Liu, S. & Wang, Y. Application of AFM in microbiology: a review.Scanning 32, 61–73 (2010).
35. Vinckier, A. &Semenza, G. Measuring elasticity of biological materials by atomic force microscopy. FEBS Lett.430, 12–16 (1998).
36. Kuznetsova, T. G., Starodubtseva, M. N., Yegorenkov, N. I., Chizhik, S. A. & Zhdanov, R. I. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. Micron 38, 824–833 (2007).
37. Broadley, K. J. The Langendorff heart preparation—Reappraisal of its role as a research and teaching model for coronary vasoactive drugs. J. Pharmacol. Methods 2, 143–156 (1979).
38. Louch, W. E., Sheehan, K. A. &Wolska, B. M. Methods in Cardiomyocyte Isolation, Culture, and Gene Transfer.J. Mol. Cell. Cardiol.51, 288–298 (2011).
39. Johannes Kindt& Ben Ohler. Enabling Long-Duration Live Cell Studies with Atomic Force Microscopy | Microscopy and Analysis. (2010).
40. Koch, M. B., Davidsen, M., Andersen, L. V., Juel, K. & Jensen, G. B. Increasing prevalence despite decreasing incidence of ischaemic heart disease and myocardial infarction. A national register based perspective in Denmark, 1980–2009. Eur. J. Prev. Cardiol. 22, 189–195 (2015).
41. Porter, W. T. On the Results of Ligation of the Coronary Arteries.J. Physiol. 15, 121–248.1 (1893).
42. Palmer, J. W., Tandler, B. &Hoppel, C. L. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. J. Biol. Chem. 252, 8731–8739 (1977).
43. Rosca, M. G. &Hoppel, C. L. Mitochondrial dysfunction in heart failure. Heart Fail. Rev. 18, (2013).
44. Lesnefsky, E. J. et al. Myocardial ischemia decreases oxidative phosphorylation through cytochrome oxidase in subsarcolemmal mitochondria. Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol. 273, H1544–H1554 (1997).
45. Zhang, Y.-W., Shi, J., Li, Y.-J.& Wei, L. Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity.Arch. Immunol. Ther.Exp. (Warsz.) 57, 435–445 (2009).
46. Thorn, C. F. et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects.Pharmacogenet.Genomics 21, 440–446 (2011).
47. Volkova, M. & Russell, R. Anthracycline Cardiotoxicity: Prevalence, Pathogenesis and Treatment.Curr.Cardiol.Rev. 7, 214–220 (2011).
48. Lipshultz, S. E. et al. Late Cardiac Effects of Doxorubicin Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia in Childhood.N. Engl. J. Med. 324, 808–815 (1991).
49. Montaigne, D., Hurt, C. &Neviere, R. Mitochondria death/survival signaling pathways in cardiotoxicity induced by anthracyclines and anticancer-targeted therapies. Biochem.Res. Int. 2012, 951539 (2012).
50. Todaro, M. C. et al. Cardioncology: state of the heart.Int. J. Cardiol. 168, 680–687 (2013).
51. Foody J, Farrell MH &Krumholz HM. B-blocker therapy in heart failure: Scientific review.JAMA 287, 883–889 (2002).
52. Dickstein, K. et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008‡. Eur. J. Heart Fail. 10, 933–989 (2008).
53. McMurray, J. J. V. et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. Eur. J. Heart Fail. 14, 803–869 (2012).
54. Pettinger, W. A. & Mitchell, H. C. Side effects of vasodilator therapy.Hypertension 11, II34-36 (1988).
55. McAinsh, J. & Cruickshank, J. M. Beta-blockers and central nervous system side effects.Pharmacol.Ther.46, 163–197 (1990).
56. González-Maeso, J. GPCR oligomers in pharmacology and signaling.Mol. Brain 4, 20 (2011).
57. Wise, A., Gearing, K. & Rees, S. Target validation of G-protein coupled receptors. Drug Discov. Today 7, 235–246 (2002).
58. The Nobel Prize in Chemistry 2012.Available at: https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2012/. (Accessed: 10th July 2016)
59. Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L.-G.&Schiöth, H. B. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. Mol. Pharmacol. 63, 1256–1272 (2003).
60. Hill, S. J. G-protein-coupled receptors: past, present and future. Br. J. Pharmacol. 147Suppl 1, S27-37 (2006).

61. Schiöth, H. B. &Fredriksson, R. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. Gen. Comp. Endocrinol. 142, 94–101 (2005).
62. Parmentier, M.-L., Prézeau, L., Bockaert, J. & Pin, J.-P.A model for the functioning of family 3 GPCRs. Trends Pharmacol.Sci. 23, 268–274 (2002).
63. Cordomí, A., Navarro, G., Aymerich, M. S. & Franco, R. Structures for G-Protein-Coupled Receptor Tetramers in Complex with G Proteins.Trends Biochem.Sci. 40, 548–551 (2015).
64. Granier, S. et al. Structure of the δ-opioid receptor bound to naltrindole. Nature 485, 400–404 (2012).
65. Rasmussen, S. G. F. et al. Crystal structure of the β2 adrenergic receptor-Gs protein complex.Nature 477, 549–555 (2011).
66. Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F. &Kobilka, B. K.The structure and function of G-protein-coupled receptors.Nature 459, 356–363 (2009).
67. Manglik, A. et al. Crystal structure of the μ-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. Nature 485, 321–326 (2012).
68. Heldin, C.-H.Dimerization of cell surface receptors in signal transduction.Cell 80, 213–223 (1995).
69. Bonanni, B. et al. Single molecule recognition between cytochrome C 551 and gold-immobilized azurin by force spectroscopy.Biophys.J. 89, 2783–2791 (2005).
70. Kienberger, F., Kada, G., Mueller, H. &Hinterdorfer, P. Single molecule studies of antibody-antigen interaction strength versus intra-molecular antigen stability.J. Mol. Biol. 347, 597–606 (2005).
71. Puntheeranurak, T. et al. Substrate specificity of sugar transport by rabbit SGLT1: single-molecule atomic force microscopy versus transport studies. Biochemistry (Mosc.) 46, 2797–2804 (2007).
72. Tang, J. et al. Atomic force microscopy imaging and single molecule recognition force spectroscopy of coat proteins on the surface of Bacillus subtilis spore. J. Mol. Recognit. JMR 20, 483–489 (2007).
73. Tang, J. et al. Detection of metal binding sites on functional S-layer nanoarrays using single molecule force spectroscopy. J. Struct. Biol. 168, 217–222 (2009).
74. Dufrêne, Y. F. et al. Five challenges to bringing single-molecule force spectroscopy into living cells. Nat. Methods 8, 123–127 (2011).
75. Müller, D. J., Helenius, J., Alsteens, D. &Dufrêne, Y. F. Force probing surfaces of living cells to molecular resolution.Nat. Chem. Biol. 5, 383–390 (2009).
76. Ebner, A. et al. A new, simple method for linking of antibodies to atomic force microscopy tips. Bioconjug.Chem. 18, 1176–1184 (2007).
77. Ebner, A., Hinterdorfer, P. & Gruber, H. J. Comparison of different aminofunctionalization strategies for attachment of single antibodies to AFM cantilevers. Ultramicroscopy 107, 922–927 (2007).
78. Verbelen, C., Gruber, H. J. &Dufrêne, Y. F. The NTA-His6 bond is strong enough for AFM single-molecular recognition studies. J. Mol. Recognit. JMR 20, 490–494 (2007).
79. Kamruzzahan, A. S. M. et al. Antibody linking to atomic force microscope tips via disulfide bond formation. Bioconjug. Chem. 17, 1473–1481 (2006).
80. E. Dague, Trevisiol, E. &Jauvert, E. Pointe de microscope à force atomique modifiée et biomodifiée. (2010).
81. Jauvert, E. et al. Probing single molecule interactions by AFM using bio-functionalized dendritips.Sens. Actuators B Chem. 168, 436–441 (2012).
82. Formosa, C. et al. Mapping HA-tagged protein at the surface of living cells by atomic force microscopy. J. Mol. Recognit. 28, 1–9 (2015).
83. Nonaka, H., Fujishima, S., Uchinomiya, S., Ojida, A. & Hamachi, I. Selective Covalent Labeling of Tag-Fused GPCR Proteins on Live Cell Surface with a Synthetic Probe for Their Functional Analysis. J. Am. Chem. Soc. 132, 9301–9309 (2010).
84. Schembri, L. et al. The HA tag is cleaved and loses immunoreactivity during apoptosis. Nat. Methods 4, 107–108 (2007).
85. Hopp, T. P. et al. A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification. Nat. Biotechnol. 6, 1204–1210 (1988).
86. Einhauer, A. &Jungbauer, A.The FLAGTM peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. J. Biochem. Biophys.Methods 49, 455–465 (2001).
87. Alsteens, D. et al. Imaging G protein-coupled receptors while quantifying their ligand-binding free-energy landscape. Nat. Methods 12, 845–851 (2015).
88. Pfreundschuh, M. et al. Identifying and quantifying two ligand-binding sites while imaging native human membrane receptors by AFM. Nat. Commun. 6, 8857 (2015).
89. Coughlin, S. R. Thrombin signalling and protease-activated receptors.Nature 407, 258–264 (2000).
90. Coughlin, S. R. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. J. Thromb. Haemost.3, 1800–1814 (2005).

91. Merkel, R., Nassoy, P., Leung, A., Ritchie, K. & Evans, E. Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. Nature 397, 50–53 (1999).
92. Fung, J. J. et al. Ligand-regulated oligomerization of β2-adrenoceptors in a model lipid bilayer.EMBO J. 28, 3315–3328 (2009).
93. Calebiro, D. et al. Single-molecule analysis of fluorescently labeled G-protein–coupled receptors reveals complexes with distinct dynamics and organization. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 743–748 (2013).
94. Kelly, E., Bailey, C. P. & Henderson, G. Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. Br. J. Pharmacol. 153, S379–S388 (2008).
95. Vidi, P.-A., Chemel, B. R., Hu, C.-D.& Watts, V. J. Ligand-Dependent Oligomerization of Dopamine D2 and Adenosine A2A Receptors in Living Neuronal Cells. Mol. Pharmacol. 74, 544–551 (2008).
96. Reiner, S., Ambrosio, M., Hoffmann, C. & Lohse, M. J. Differential Signaling of the Endogenous Agonists at the β2-Adrenergic Receptor.J. Biol. Chem. 285, 36188–36198 (2010).
97. Gether, U. &Kobilka, B. K. G Protein-coupled Receptors II.MECHANISM OF AGONIST ACTIVATION.J. Biol. Chem. 273, 17979–17982 (1998).
98. Rios, C. D., Jordan, B. A., Gomes, I. & Devi, L. A. G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function.Pharmacol.Ther.92, 71–87 (2001).
99. Breitwieser, G. E. G Protein–Coupled Receptor Oligomerization Implications for G Protein Activation and Cell Signaling. Circ. Res. 94, 17–27 (2004).
100. Sun, M. et al. Multiple Membrane Tethers Probed by Atomic Force Microscopy. Biophys.J. 89, 4320–4329 (2005).
101. Frederix, P. L. T. M., Bosshart, P. D. & Engel, A. Atomic Force Microscopy of Biological Membranes. Biophys.J. 96, 329–338 (2009).
102. Formosa, C. et al. Multiparametric imaging of adhesive nanodomains at the surface of Candida albicans by atomic force microscopy.Nanomedicine Nanotechnol.Biol. Med. 11, 57–65 (2015).
103. Radio, S. et al. Allograft vascular disease: comparison of heart and other grafted organs. Transplant. Proc. 28, 496–499 (1996).

Chapitre 2: Articles Présentation détaillée

21. Revue bibliographique

22. Caractérisation des propriétés nanomécaniques de la membrane des cardiomyocytes en condition d'insuffisance cardiaque

23. Etude par AFM de l'architecture oligomérique des RCPGs sur membrane cellulaire

21. Revue bibliographique

211. Introduction

L'étude des cardiopathies affectant la fonction contractile du cœur, le CM est au cœur de la problématique. En effet, étant l'unité contractile, il est le premier potentiellement touché. Ces anomalies peuvent être métaboliques[1–3] et/ou structurales[4–6]. Afin de pouvoir observer ces anomalies responsables du trouble contractile, différentes techniques dites classiques sont à disposition telle que la microscopie optique couplée à des méthodes de coloration et à la fluorescence, la microscopie électronique. Mais d'autres techniques moins utilisées, commencent à être utilisées dans l'observation du cardiomyocyte comme les microscopies à sondes locales, qui comptent, entre autres la microscopie à conductances ionique et la microscopie à force atomique. Dans cette étude bibliographique nous avons répertorié les principales méthodes d'analyses des CMs en condition physiologique ainsi que physiopathologique, en nous focalisant principalement sur les études faites par AFM. Dans l'article nous avons décrit les différents travaux réalisés par AFM en comparant les conditions de préparation de l'échantillon ainsi que les modes utilisés. Après cette analyse bibliographique de l'état de l'art des études en cardiologie faites sur AFM nous avons constaté du faible nombre d'articles, mais aussi de la variété importante des conditions d'acquisitions appliquées, comme par exemple :

- Le type cellulaire (embryonnaire / neo natale / adulte)
- Préparation de l'échantillon (fixé / vivant / battant /non-battant…)
- L'espèce animale (souris / rats / poulet …)
- Atmosphère contrôlée ou non (température / CO_2).
- Type d'observation (topographie / nanomecanique / rythme de contraction)
- Mode AFM utilisées (contact / Tapping / Spectroscopie de force…)

L'étude de ces différents travaux a montré l'importance de ces conditions d'acquisitions et l'impact sur l'observation décrite.

1. Francis, G. S. Pathophysiology of chronic heart failure.Am. J. Med. 110, 37–46 (2001).
2. Bui, A. L., Horwich, T. B. &Fonarow, G. C. Epidemiology and risk profile of heart failure. Nat. Rev. Cardiol. 8, 30–41 (2011).
3. Crespo-Leiro, M. G. et al. European Society of Cardiology Heart Failure Long-Term Registry (ESC-HF-LT): 1-year follow-up outcomes and differences across regions. Eur. J. Heart Fail. 18, 613–625 (2016).
4. Gorelik, J. et al.A novel Z-groove index characterizing myocardial surface structure.Cardiovasc.Res. 72, 422–429 (2006).
5. Lyon, A. R. et al. Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart. Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 6854–6859 (2009).
6. Dague, E. et al. Atomic force and electron microscopic-based study of sarcolemmal surface of living cardiomyocytes unveils unexpected mitochondrial shift in heart failure. J. Mol. Cell. Cardiol.74, 162–172 (2014).

212. AFM, une technologie innovante pour étudier la surface membranaire du CM en condition physio / physiopathologique

Lachaize V, Formosa C, Smolyakov G, Guilbeau-Frugier C, Galés C, Dague E

"Atomic Force Microscopy: an innovative technology to explore cardiomyocyte cell surface in cardiac physio/pathology"

(publié en 2015 dans *Letters in appliedNanoBioSciences*, *4. 321-334*)

Volume 4, Issue 4, 2015, 321-334 ISSN 2284-6808

Letters in Applied NanoBioScience

www.NanoBioLetters.com

Review Article Open Access Journal

Received: 25.08.2015 / Revised: 30.09.2015 / Accepted: 25.11.2015 / Published on-line: 30.11.2015

Atomic Force Microscopy: an innovative technology to explore cardiomyocyte cell surface in cardiac physio/pathophysiology

Véronique Lachaize [1,2,3,4], Cécile Formosa [2,3], Georgiy Smolyakov [1], Céline Guilbeau-Frugier [4,5,6], Céline Galés [2,4], Etienne Dague [1,2,3]

[1] CNRS, ITAV-USR3505 ; F-31100 Toulouse, France
[2] CNRS, LAAS, 7 avenue du colonel Roche, F-31400 Toulouse, France
[3] Université de Toulouse, UPS, ITAV, LAAS, F-31000 Toulouse, France
[4] Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, INSERM UMR 1048, Toulouse, France
[5] INSERM Department of Histopathology, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, 31432 Toulouse, France
[6] Centre de Microscopie Électronique Appliquée à la Biologie, Faculté de Médecine Rangueil, 31062 Toulouse, France

*corresponding author e-mail address: ***edague@laas.fr***

ABSTRACT

Atomic Force Microscopy (AFM) has emerged these recent years as a multifunctional toolbox for studying biological samples in physiological conditions. Although its use has spread among biologists community, cardiology remains a scientific field where AFM has not been extensively used yet. Heart diseases are nowadays a major human threat, and cause the death of millions of people each year. A convergent point to all heart diseases seems to be related to the defect of the cardiomyocyte, the contractile unit of the heart. For this reason, many scientists got interested in this cell type. However, very few studies use a technology such as AFM and its derivatives (force spectroscopy, multiparametric imaging) to explore this cell. The aim of this review is thus to give a comprehensive analysis of the interest of the biophysical approach made possible by AFM studies. We will show how AFM has been and can be used to study fixed or living cardiomyocytes, and, how combined with other types of microscopy, it can help getting a better understanding of the effects of pathologies or drugs. This review is the first dedicated to the use of AFM technics in cardiology, and gives new insights into the fundamental questions surrounding cardiomyocytes, that can be answered using such a technology.

Keywords: *Atomic Force Microscopy, Imaging, Force Spectroscopy, Heart diseases, Cardiomyocyte.*

1. INTRODUCTION

Cardiovascular diseases are a major health issue, and cause each year the death of 17.5 million people worldwide, with no distinction between men and women. Among these deaths, 8.5 million originate from heart diseases (Figure 1) [1] and statistics indicate that Heart Failure (HF) has a prevalence of over 23 million worldwide [2]. HF is a clinical syndrome characterized by the impairment of the contractile function of the heart occurring as a consequence of cardiac injuries. It is the convergent evolution of many heart diseases such as coronary diseases or myocardial infarction (MI) [3]. Although significant therapeutic options are now available for HF management, HF still remains the leading cause of morbidity and mortality in industrialized countries, and the number of patients suffering from HF increases over time. Indeed, many of the pharmacological therapies efficiently slow down the progression of HF, but do not stop it, suggesting that there is still an incomplete understanding of the molecular basis underlying the onset of HF. Thus, there is an urgent need for new treatment strategies that would improve the clinical outcomes of HF; but for that, identifying novel targets is mandatory.

Progression towards HF is a two steps process. The first step, called the compensation step, relies on the adaptative response of the heart to maintain a physiological cardiac output. It is characterized by the progressive hypertrophy of the heart muscle related to the increase in size of the contractile cells, cardiomyocytes (CM), which ultimately evolves towards the second step, called the decompensation step. During this second step, CMs death leads to the loss of the heart function and to the onset of HF [4]. Nowadays, pharmacological therapies recommended for HF management target essentially the events taking place during the compensation step and only delay the progression towards the decompensation step. Indeed, the molecular mechanisms responsible for the transition of the heart from the compensatory to the decompensatory step are still unknown. However, histological observations indicate that changes in CMs morphology (wavy CMs) but also CMs necrosis are key features of the decompensation step in human patients with end-stage HF [5]. Necrosis is a mechanism of cell death characterized by the rupture of the cell plasma membrane and the liberation of the cell content in the surrounding tissues that leads to an inflammatory reaction [6]. It thus follows that defects of the CM plasma membrane could participate to the onset of HF. However, this aspect was never thoroughly explored, most probably because of the lack of techniques that would allow the accurate exploration of the CM plasma membrane.

In this review, we will first present an overview of the structure/function of the CM. Then we will discuss on the different microscopic approaches that were used to study this cell. A next part of the review will be dedicated to the use of Atomic Force Microscopy (AFM) to study the CM plasma membrane and finally we will present the interest of such technology to unravel CMs structure and function in physio- and pathophysiological condition.

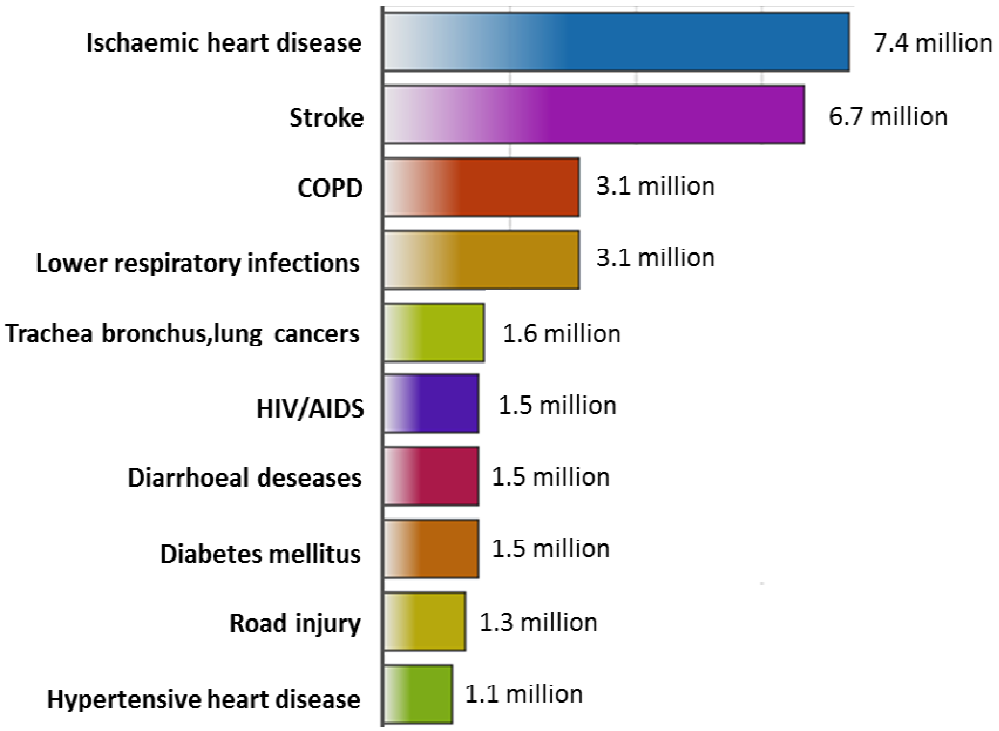


Figure 1. The 10 leading causes of death in the world (2012), A total of about 8.5 millions death is caused by cardiac diseases. Reprinted from WHOFact-sheet n°310.

2. STRUCTURE AND FUNCTION OF THE CARDIOMYOCYTE

The adult CM is a highly differentiated cell characterized by a typical "rod shape" (Figure 2A). CMs are relatively large cells with conserved size in all animal species ranging from 100-150 µm in length and 10-20 µm in width [7], but this size is an average and eg cardiomyocyte isolated from left ventricle, 2 months old mouse, were described to be 66±8.9 µm in length [7]. Actually CMs size depends on their location in the heart, (ie CMs form right ventricle are longer than CMs from left ventricle [7]). However, before becoming a highly differentiated and structured cell, the CM morphology evolves through a long postnatal maturation process [7]. Indeed, during embryonic development, the heart is subjected to low blood pressure, which dramatically increases at birth due to the onset of the pulmonary respiration. During this postnatal period allowing the heart growth (Figure 2B), the cardiac tissue architecture undergoes deep changes allowing the heart to adapt to its new hemodynamic conditions. At the cellular level, postnatal growth of the rodent heart begins with a first phase of hyperplasia (~until postnatal day 5) characterized by the proliferation of neonatal CMs. This first phase is then followed by a second phase of hypertrophy (from postnatal day 5 to 20) during which CMs stop their proliferation but increase their cellular mass (Figure 2B). From a morphological view, the maturation of the CM involves the differentiation of an immature neonatal contractile cell with a fibroblastic-like morphology into a mature adult cell characterized by a rod shape (Figure 2B). From a structural point of view, the adult mature CM is composed of (Figure 2A):

* The lateral membrane (LM, or sarcolemma) which plays a key role in connecting the extracellular matrix (ECM) to the intracellular contractile machinery and guarantees the 3D organization of the cardiac tissue. In addition, the LM of adult CMs is characterized by the presence of multiple intracellular tubular invaginations called T-Tubules (Transverse Tubules) making an intricate network around the myofibrils. T-Tubules structures are responsible for the excitation-contraction coupling of the CM, as well as for the in-depth transmission of the action potential allowing a homogeneous contraction across the CM.
* The Intercalated Disc (ID), localized at the longitudinal end of CMs and allowing them to directly and tightly interact with each other's. These direct interconnections between CMs ensure the synchronization of contraction between two adjacent CMs.
* The myofibrils play an important role in the architecture and function of CMs as they provide its basic contractile activity. Myofibrils also contribute to the spatial organization of other cytoplasmic components such as the interfibrillar mitochondria (IFM) providing the energy supply necessary for the contraction of CMs. Each myofibril is divided in several contractile units called sarcomeres, composed of actin and myosin filaments and delimited by two Z lines.

Examination of CM morphology is classically used in human pathology to detect anomalies in the cardiac tissue, and therefore to diagnose heart diseases [8]. For example, in HF, CMs undergo deep morphological changes, such as hypertrophy during the compensatory step and nuclei rounding or loss of the plasma membrane integrity promoted by necrosis programming during the

decompensation step [5]. Thus, the microscopy field including classical microscopy techniques (light, fluorescence, or electron microscopy) as well as more recent and developing ones (Scanning Ion Conductance Microscopy and Atomic Force Microscopy) to study the CM morphology and structure is of great importance in cardiopathology and clinical cardiology. The next sections of this review will therefore focus on how these technologies are used to visualize the intra- and extra-cellular structure of the CMs.

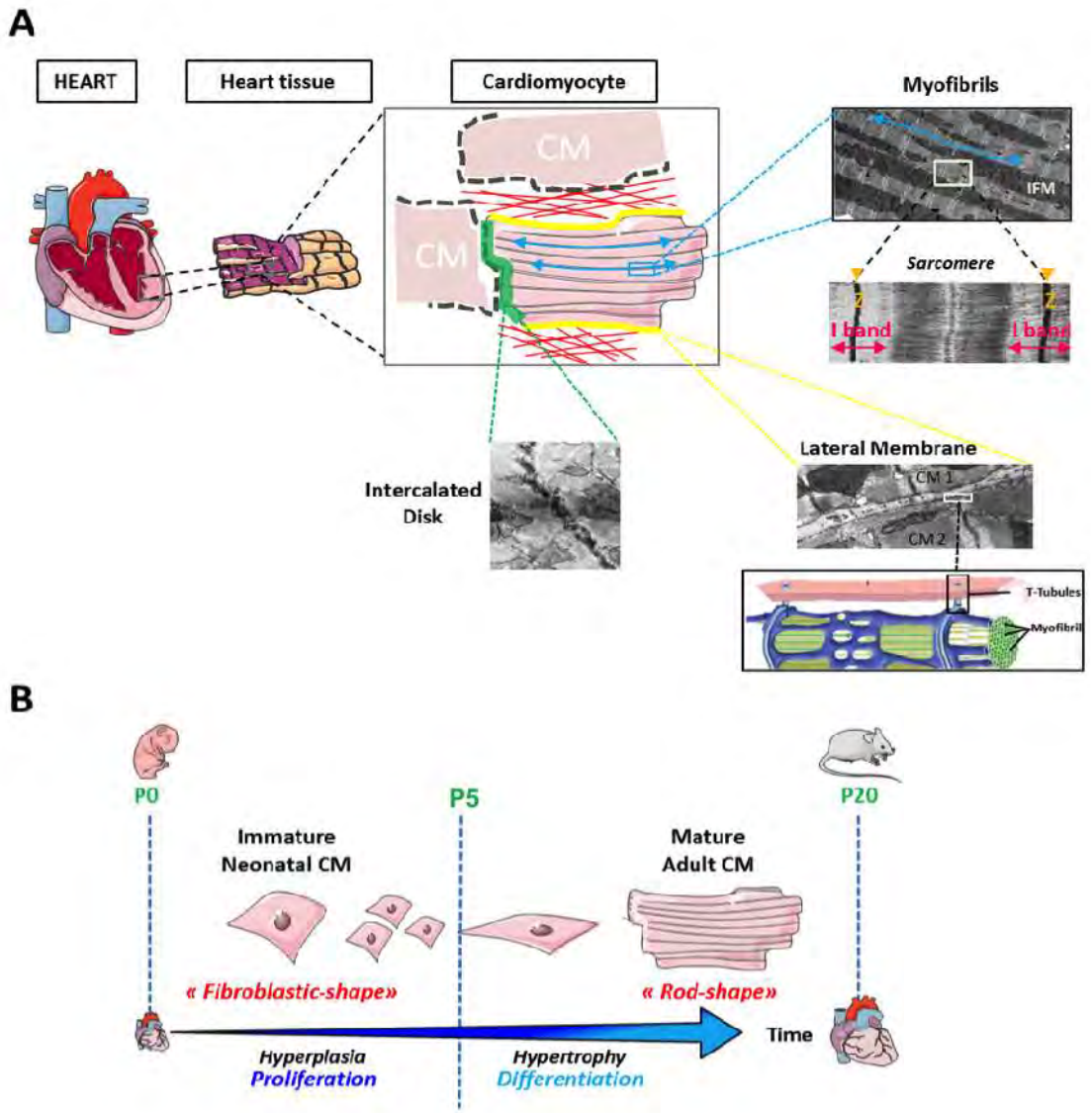


Figure 2. (A) Overview of the cardiomyocyte.CM = cardiomyocyte; Red = Extra Cellular Matrix; Green band = Intercalated Disk; Yellow band = lateral membrane; Blue arrows: Myofibrills; IFM = Interfibrillar Mitochondria; Z= Z-line. Electron microscopy images of some corresponding specialized domains are shown. (B) Cardiomyocyte maturation. CM maturation occurs after birth and duration varies from one species to another, occurring during the first postnatal 20 days (P20) in rodents. The postnatal cardiac maturation is associated with an increase of the cardiac mass and involves two consecutive steps : a 1st step of hyperplasia associated with the neonatal CM proliferation (P0 to P5) followed by the hypertrophy step (P5 to p20) during which CM proliferation stops and the CM increases in size and undergoes a differentiation process leading to the conversion of its fibroblastic-like morphology toits typical mature rod-shape.

3. MICROSCOPY TECHNIQUES USED TO STUDY CARDIOMYOCYTES

Optical microscopy techniques as well as electron microscopy have been now used for several years to visualize the CM structure and organization. More recently, Scanning Ion Conductance Microscopy (SICM) was developed to image the surface of living CMs at high resolution and helped refining the general understanding of the CM structure and function in cardiac diseases. In this section, we will discuss the interest of each type of microscopy for the exploration of CMs.

3.1. Classical microscopy techniques.

3.1.1. Optical microscopy coupled to colorimetric assays.

Given the large size of the CM, it is possible to visualize the cells with standard light microscopy. It allows analyzing

architecture of myocardium and some cellular details with a resolution down to the micrometer scale [9]–[14]. This kind of microscopy is routinely used in pathological diagnosis in clinical context. Although its microscale resolution is too low to distinguish the different organites within the cells, the association of colorimetric methods helps visualizing them. For example, the use of hematoxylin and eosine (HE) stain, the gold standard in pathological diagnosis, allows coloring the cell nucleus in deep-blue and the cell cytoplasm in pink (Figure 3A). This coloration method therefore allows depicting cell's nucleus morphology or architecture defects (wavy CMs), as well as identifying necrotic CMs within a cardiac tissue biopsy [15], a key feature in HF. Colorimetric methods also allows detecting myocardial fibrosis (Masson's trichrome stain), an important factor contributing to the onset of HF, characterized by the increase of collagen fibers within the cardiac tissue [16]. Other staining techniques, not described here, can also be used to detect apoptotic (TUNEL staining) [17] or ischemic CMs (Hematoxylin-basic fuchsin-picric acid) [18]. However, while histomorphology analysis gives the possibility to analyze the different cellular components of the whole cardiac tissue, fluorescence microscopy offers better possibilities to go further into the structure of CMs and of their intracellular components by focusing on the analysis of specific components of the CM.

3.1.2. Optical microscopy coupled to fluorescence.

Compared to visible light microscopy that only allows a global appreciation of the CM morphology, fluorescence microscopy is a useful technique to detect more specific anomalies. Different fluorescent dyes are classically used to study the CM structure; among them, fluorescent wheat-germ agglutinin (WGA) staining helps delineating the CM plasma membrane (Figure 3B; IF microscopy) and thus allows to accurately measure the CM area and quantify CM hypertrophy, a critical HF precursor [19, 20]. Immunofluorescence methods using specific antibodies against different proteins of the CM, and their visualization through a secondary fluorescent antibody are more widespread within the scientific community. For instance, antibodies targeting α-actinin, a cytoskeletal actin-binding protein localized at the Z-line of sarcomeres, are useful to outline the sarcomeres state of CMs (Figure 2A). Immunolocalization of connexin-43, one of the specific components of sarcomeres, can reveal defects in IDs. Another example of fluorescent dyes used to explore the structure/function of CMs is the Di-8-Anepps (ANEP), a fast-response molecule fluorescing in response to electrical potential changes at the CM plasma membrane. Thus, ANEP-fluorescence microscopy allows depicting Ca^{2+} exchanges taking place between sarcolemmal and sarcoplasmic reticulum calcium channels at the T-tubules level and which are necessary for the CM contraction. Thanks to this technique, it is therefore possible, to show the organization of the T-tubules network or its disorganization in cardiac failing conditions [21]. Although fluorescence microscopy brings us a step further into the extra- and intra-cellular architecture of CMs, its resolution does not exceed 200-350 nm and it is thus not suitable to depict macromolecular structures in the nanometer range.

3.2. Electron Microscopy.

Alternative to the optical microscopy is the electron microscopy which principle relies on beams of energetic electrons bombarded over the sample surface and allowing a resolution up to the nanoscale (up to 50 pm at maximum in specific conditions [22]). Electron microscopy can be declined into Transmission Electron Microscopy (TEM) or Scanning Electron Microscopy (SEM), which are two complementary techniques. Indeed, while TEM allows visualizing the ultrastructure of CMs at high resolution, SEM is better suited to study their 3D morphology.

The first type of electron microscopy, TEM, emerged in 1959 thanks to the work of Knoll and Kuger [23]. TEM uses ultra-thin sample sections and beams of electrons that scatter the sample in depth and allows the visualization of the intracellular components organization. To this end, samples are first fixed, embedded in a resin and then cut into 60 to 90 nm sections, which finally undergo different negative staining treatments. Thus, this sample conditioning does not allow working on living cells and TEM observations are always performed on fixed cells. However, TEM-based imaging of a biological sample such as the CM allows visualization of the intracellular organites, such as mitochondria, as well as myofilaments or the lateral membrane structure, with a very high resolution [24] (Figure 3C). Another advantage of such technique is that it can be used on isolated CMs, but also on the whole cardiac tissue, therefore allowing the accurate localization of CMs anomalies with its surrounding tissue environment [25].

Now, although TEM is a powerful technique to visualize CMs ultrastructure at high resolution, it only gives a restricted view from the interior of the CM. Thus, appreciation of the global ultrastructure of the whole CM needs analysis of several successive sample layers, a procedure that is time-consuming. In order to observe the exterior of CMs and to visualize their 3D morphology, SEM is a better suited methodology and provides complementary information to the TEM.

The second type of electron microscopy, SEM, developed in 1938 by von Ardenne [26, 27], allows an observation of samples and of their surface in 3D (Figure 3C). As for TEM, SEM requires CMs samples fixation. Then, a specific solution containing metal ions is vaporized on these samples and finally beamed electrons are scanned all over. In the case of SEM, the detected signals come principally from either the Back-Scattered Electrons (BSE) reflected from the sample's vaporized surface with metal ions, or from the Secondary Electrons (SE) resulting from the interaction of the electron beam with atoms at or near the surface of the sample. Depending on the type of detectors, SE or BSE can be used as signals to produce images of samples surface; in the case of SE, the resolution of images is higher (up to 1 nm [28] instead of 10 with BSE), and in the case of BSE, chemical contrasts on the surface are better detected. Thus, SEM allows an observation of the whole surface of the CM when compared to TEM, and therefore can provide information on their global extracellular morphology. However, the intracellular visualization of the CM is impossible with SEM. To circumvent these problems, an evolution of the SEM combined to a cryofracture method, called cryo-SEM [29], was developed. It consists in cryo-fixing biological samples by plunging them into sub-cooled nitrogen and fracturing them. While still allowing the 3D

observation of CMs similarly to SEM, this method presents the advantage to visualize their intracellular content at the level of the fractures (Figure 3C) [30].

Despite the high resolution and complementarity of SEM and TEM techniques, these methods are still limited by the sample preparation that always requires a fixation step, which can impact the structure of biological samples thus leading to misinterpretations of physiological/pathophysiological cell structures. Today, a novel electron microscopy emerges, the environmental scanning electron microscopy (ESEM) [31]. It is a SEM based technique but the sample can stay in a "wet" environment. ESEM allows observation of live samples, and prevent from fixing. However, there is not yet any study on cardiomyocytes using this instrument. In this context, it is naturally that researchers have evolved toward microscopy techniques allowing the imaging of living CMs such as SICM as developed in the next paragraph.

3.3. SICM to study living cardiomyocytes.

Living CMs structure can be explored through the use of SICM, a near-field microscopy technique [32]. This microscopy method consists in a probe electrically charged with an electrolyte solution, approached to the surface of the sample (which is non-conductive to ions) in an electrolyte bath of the opposite charge. When the tip nears the surface of the sample the ionic conductance decreases, which is reflected by a decrease of the current. These current variations are measured thanks to an amplifier and are used as a feedback to adjust the distance between the tip and the sample. Therefore, the trajectory of the tip follows the ionic heterogeneities of the interface, which allows reconstructing a 3D image of the surface of the sample. This method has been used to observe living CMs [33] at a nanoscale resolution (up to 20 nm) [34], corresponding to the probe size [35]. Recent studies, performed by Gorelik *et al.*, used SICM to visualize the topography of living CMs from healthy and failing hearts [21], [36]. In their first study performed in 2009 [21], the authors showed that the surface of healthy living CMs exhibits a periodic alternation of area more or less conductive to ions (Figure 3D) that is lost in failing hearts and seems to correlate with lower T-tubules density as shown by fluorescent staining. Although this technique presents a great interest for studying living CMs, the deduced topography of the CM surface obtained using SICM is indirect, since the probe and the sample do not physically interact. Thus, the subsequent topography images may not reflect the "true" topography of the sample, but more likely the ionic heterogeneity of the CM interface [37]. Moreover, CMs exhibit a high ionic heterogeneity at their cell surface, making SICM an inappropriate method to study their topography. In this context, AFM, an imaging and a force technology, offers many advantages. It can be operated in liquid, at controlled temperature, on living cells, and can reveal the surface topography by the use of a sharp tip directly interacting with the sample. Moreover, the specific advantage of AFM over SICM relies on the possibility to measure nanomechanical properties of cell membranes and underlying cellular components. In the next section, we will focus on the use of this technique for the study of CMs.

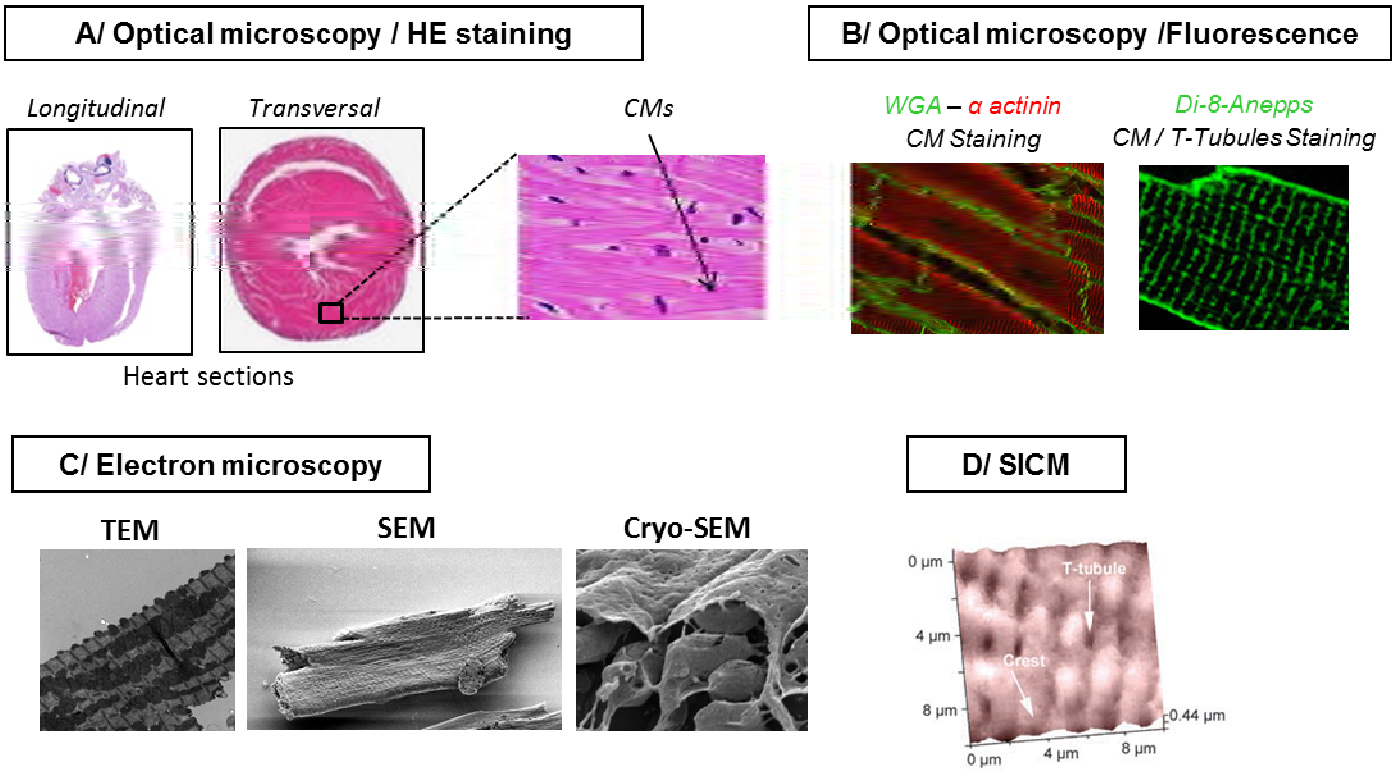


Figure 3. Microscopy techniques for cardiomyocytes imaging. (A) CM morphology and global components organization detected by visible light microscopy coupled with Hematoxylin and Eosine (HE) staining or (B) Fluorescence. (C) Electron microscopy given access to: ultrastructural details of the CM using Transmission Electron microscopy (TEM), CM 3D relief by Scanning Electron Microscopy (SEM) or both ultrastructural and 3D details of the CM by Cryo-SEM. (D) Topography of the lateral membrane of the CM deduced by Scanning Ion-Conductance Microscopy analysis.

4. ATOMIC FORCE MICROSCOPY: FROM THE CM PREPARATION TO THE EXPERIMENT

The AFM invented by Binnig, Quate and Gerber in 1986 [38] has been used in many studies for visualizing biological structures, for measuring the cell's nanomechanical properties, and for studying biological systems at the single cell or the single molecule level [39–44]. This technique belongs to the category of Scanning Probe Microscopy (SPM). The principle of the first SPM was to measure the tunneling current [45] between a sharp tip and a conductive surface [46]. By adjusting the tip position, the current was kept constant and a topographical image was reconstructed. In the case of the AFM, the feedback is not on the tunneling current but on the force applied by the tip on the sample, or on the amplitude/frequency of oscillations on the AFM tip, in vacuum, air or liquid. An AFM is a valuable imaging tool that can be operated in contact mode, in Tapping® mode, or in advanced force curve based modes (like Quantitative Imaging™, from JPK instruments or PeakForce QNM from Bruker [42, 47]). But more than an imaging tool, an AFM is also a force machine able to measure forces in the pN range. In the force spectroscopy mode, forces *versus* distance curves are recorded and give access to the sample nanomechanical and adhesive properties [48–51]. Moreover, the advantage of this microscopy is that acquisitions can be performed in liquid, on living cells. To this end, cells should be immobilized firmly enough in order to withstand lateral frictions induced by the tip while scanning the surface, but without denaturing them [52]. If this point is critical in microbiology, it is usually not a big issue for mammalian cells analysis as they tend to spread on surfaces or can be easily immobilized on matrix proteins coated surfaces (fibronectin, laminin, collagen etc.) [53, 54]. However, in the case of CMs, immobilization of the cells is not the only prerequisite for AFM experiments; CMs are indeed delicate cells that rapidly dedifferentiate when extracted from their physiological environment, and should therefore follow good practice preparation. Sample preparation is therefore a pertinent issue that needs to be carefully addressed; this is the subject of the next section.

4.1. Nature and conditioning of samples for AFM experiments. Sample conditioning (*i. e.* living or fixed cells) as well as AFM experimental conditions (temperature and CO_2) (Table 1) are key steps in the process of acquiring reliable AFM data. However, the most important parameter that will influence AFM results relies on the nature of the CMs used; CMs obtained from embryonic/neonatal hearts [55], or CMs isolated from adult animals [56] (Table 1). Indeed, CMs coming from adult animals exhibit a differentiated rod-shape with a highly structured plasma membrane, while embryonic cells adopt a fibroblastic-like shape with a less-organized surface. These two CMs types and their purification, as well as the conditioning procedures for AFM experiments will be described in the next paragraphs.

4.1.1. Sample nature: embryonic/neonatal or adult cardiomyocytes.

In 1994, Riehle and coworkers worked on CMs coming from embryos that were 20-30 µm long and 5-10 µm wide, so 7 times smaller than CMs from adult animals [55, 57]. These cells were obtained following extraction from 6 to 9-days-old embryonic hearts directly after cardiac tissue slicing and enzymatic digestion. The extracted cells are then incubated in their culture medium and among them, only CMs will adhere to the culture plastic flask. Finally, after washing away non- adherent cells, the embryonic CMs sample is ready for AFM experiments.

This preparation can be achieved quite easily and AFM acquisition on fibroblastic-like shaped CMs is not limited by the time, as these cells easily proliferate and do not undergo rapid dedifferentiation that can modify their structural surface [55, 58] (Figure 4B).

The procedure used to purify CMs from adult animals is trickier and accordingly, few AFM or SPM studies have been conducted on adult CMs. Basically, adult CMs purification relies on the Langendorff method [59]. In this method, hearts are first extracted from rodents, typically a 2 months-old adult mouse or rat, and are then canulated on the Langendorff system via the aorta, but it is possible to use other animals than mice or rats, such as rabbits and guinea pig. The only differences are the cannula size, the perfusion times and the viability of the myocytes. Hearts are then perfused with different solutions containing different component (such as Na^+, K^+, Hepes, Taurine, butaneidone monoxime (BDM), etc…) in order to increase CMs viability. Each component influence the cells viability as well as the coating of the petri dish (see [61] for a valuable discussion on this subject). Moreover CMs isolation is a tricky question and many researchers are still working to improve the viability of the isolated CMs. These perfused solutions are composed of a washing solution, a decalcifying solution (inhibition of CMs contraction during the procedure) and a specific enzymatic solution allowing detachment of the CMs from the ECM. Following digestion, hearts are dissected and CMs separated by mechanical dissociation. After this step, CMs were separated from the debris by gravity filtration through nylon gauze (with 250µm a mesh), and the CMs sediment can be recuperated (Figure 4A). A supplementary step should be done for the restoration of Ca^{2+} allowing increasing the CMs viability. The CMs are kept alive in MEM solution modified with or without a contractile inhibitor such as BDM or blebbistatine as a function of the measured parameter [61]. Although the isolation of adult CMs needs more practice than for embryonic/neonatal CMs, the use of such adult CMs is more relevant to understand the adult pathologies while the study of embryonic or neonatal cells can lead to misinterpretations. There is thus a major interest in working with adult CMs to understand the adult physio/pathophysiology. In literature, we can found a third procedure: the isolation of adult CMs from human heart[7, 62].

The CMs are extracted from atrial and ventricular tissues those were obtained from patients undergoing corrective cardiac surgery. These hearts pieces were placed in decalcifying solution followed by incubation in enzymatic solution; afterwards the steps are similar to the methods described above.

However, due to their mature state, these cells require that AFM data are acquired quite quickly after their purification (2-3 hours). Indeed, adults rod-shaped CMs are fragile cells, unable to proliferate and that start to spontaneously dedifferentiate into more

fibroblastic-shaped morphology [63] as soon as they are removed from their natural 3D cardiac tissue environment. This dedifferentiation process obliviously impacts the structural organization of the surface of healthy CMs thus needing a rapid examination of these cells. In literature we can found the experiments done on the CMs 6-8 hours and even after 24 hours after extraction[64], after this time, the contractile capacity and the macroscopic morphology are maintained. Therefore, it is possible to use these CMs for experiments such as electrophysiology, but it seems difficult to use CMs for an observation on ultrastructure of cell membrane 6-8 hours after extraction.

It is then clear that the nature of CMs, either it is embryonic/neonatal or adult will lead to different AFM results (Table 1). However, whatever the CMs nature, the cells conditioning can also lead to differences in the AFM results.

Table 1. AFM experiments conditions found in the literature

Nature of CMs	Beating CMs	Conditioning for AFM	AFM mode	T° and CO2	Reference
Chicken embryo CMs	+	Living cells	Mechanosensor	XX	Riehlen*et al.*, 1994
Chicken embryo CMs	+	Living cells	Mechanosensor	37°C, 5% CO2	Domke*et al.*, 1999
Mice adult CMs	-	Living cells	Force Spectroscopy	37°C, 5% CO2	Genet *et al.*, 2012
Rats adult CMs	+	Living cells	Mechanosensor	XX	Liu *et al.*, 2012
Rats adult CMs	+	Living cells	Mechanosensor	XX	Mizutani Y *et al.*, 2012
Rat adult CMs	n/a	Living cells	Force Spectroscopy	RT, no CO2	Sumita Yoshikawa *et al.*, 2013
Mice adult CMs	-	Fixed cells	Force Spectroscopy	RT, no CO2	Benech*et al.*, 2014
Mice adult CMs	-	Living cells	Force Spectroscopy	37°C, 5% CO2	Dague *et al.*, 2014
Rabbit adult CMs	-	Living cells	Force Spectroscopy	XX	Mathur *et al.*, 2001

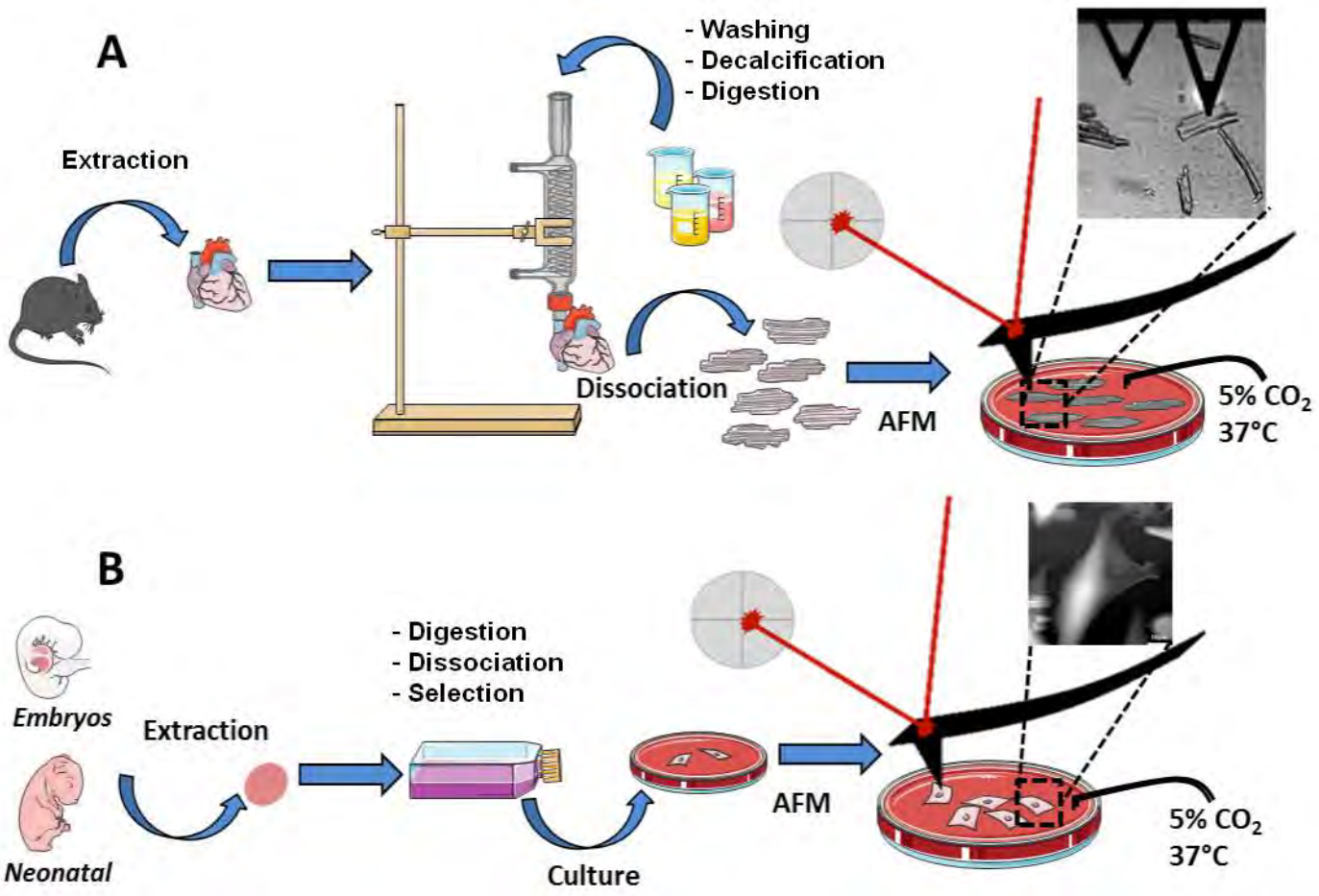


Figure 4. (A) Adult cardiomyocyte purification.Step 1: heart extraction, step 2: heart canulation on a Langerhoff system and washing /digestion with different solutions-step 3: mechanical dissociation, step 4: AFM acquisition on non beating CMs kept alive at 37° C in their cuture medium all along experiment using the perfusing cell; (B) Neonatal/Embyonic cardiomyocyte purification step 1: embryonic heart or neonatal heart extraction, step 2: washing/ digestion with different solutions and direct CMs selection by adhesion to the flask, step 3: Culture during 1-2 days for maturation, step 4: AFM acquisition on beating CMs kept alive at 37° C all along experiment using the perfusing.

4.1.2. Cardiomyocytes conditioning.

Once isolated either from embryos or adults animals, CMs must be immobilized in order to perform AFM experiments. Two different technics are found in the literature; the first one consists in fixing the cells using Paraformaldehyde or Glutaraldehyde [65] (Table 1). In this case, AFM experiments can be performed quite easily as no temperature control, nor CO_2 perfusion will be needed. Another interest of such technic is that experiments are not limited by the time, since fixed cells do not evolve over time. However, no data on the contractility of cells can be generated using this immobilization method. Moreover, fixation procedure can modify the natural structure/morphology of cells.

The second technic consists in the culture of CMs immediately after their isolation in a specific culture medium on laminin-coated plates, a major component of the basement membrane of the adult CM in the cardiac tissue reinforcing their adhesion. Such method can maintain them in living conditions as long as they are cultured at 37°C in 5% CO_2; AFM acquisitions are thus performed in similar conditions in liquid condition and in the presence or not of CM contraction inhibitors (depending on the study purpose) (Table 1). This allows acquiring topographic images or nanomechanical maps of the CMs cell surface [54, 66, 67], as well as evaluating CMs contractility [55, 58, 68, 69].

As already stated above, AFM was originally developed for nanoscale imaging and nanomechanical measurement; the description of imaging modes (paragraph 4.2), force spectroscopy mode (paragraph 4.3) as well as the description of advanced modes (paragraphs 4.4 and 4.5) will be presented in the next paragraphs.

4.2. Imaging samples with Atomic Force Microscopy.

The imaging mode allows obtaining sample's topography using three main modes; contact imaging, Tapping® mode and force spectroscopy mode [70].

4.2.1. Contact imaging.

The principle mode of operation of AFM is called contact mode, where the tip is brought into stable contact with the sample. In this mode, the tip-sample normal force is maintained at a constant value. While scanning the sample, the cantilever undergoes deflections, resulting in displacements of the laser on the photodiode. The variations of the position of the laser are treated, in real time, to reconstruct the topography of the sample. This mode, although used in many studies [71, 72], presents an important limitation for living CMs studies as the lateral forces exerted by the tip deform the surface of the membrane. Indeed, as it can be seen on Figure 5C, the CM topography is distorted by the lateral force, which results it the alteration of the hollow/crests organization of the sarcolemma.

4.2.2. Tapping® mode imaging.

In order to avoid lateral forces exerted by the AFM tip, and to keep a high resolution, AFM can be used in Tapping® or oscillating mode. In this mode, the tip is oscillated near the surface with amplitude of 20 to 100 nm and a frequency close to the cantilevers resonance frequency. In this case, the root-mean-square value of the amplitude is used as the feedback parameter. When the tip is oscillated on a higher surface, its amplitude is then reduced; the variation in the amplitude across the sample is recorded to generate a topographic image. A main advantage of oscillating mode is that lateral forces between the tip and the sample are significantly reduced, which avoids the sample damaging associated with contact-imaging. However, in buffer solutions used in biological studies, where the electrolyte concentration is high, interactions with low-range forces can influence the amplitude of the AFM tip; therefore, the contact between the tip and the sample cannot be avoided, which also leads to deformation of the sample (Figure 5D). Another problem of Tapping® mode is that for oscillating, stiff cantilevers must be used, which is not well suited for experiments on soft and fragile samples such as CMs. Moreover, Tapping® mode, as well as contact mode, is only imaging methods; the third mode, force spectroscopy, gives access to the sample topography, but also to its nanomechanical/adhesive properties.

4.2.3. Height cartography.

In force spectroscopy mode, the AFM probe is repeatedly brought towards the surface and then retracted, which allows producing force curves [53]. Several force curves can be recorded over a matrix of points across the sample (Force Volume mode); by measuring the position of the contact point between the tip and the surface on each curve, a height image of the sample can be reconstructed (Figure 5E). The main advantage of this mode is that there is much information that can be extracted from the force curves. Indeed, the indentation part of the force curve can be analyzed to measure the nanomechanical properties (elasticity, stiffness, next section 4.3) of the sample; the retract part of the force curve gives information on the adhesion between the tip and the surface.

4.3. Probing the nanomechanical and adhesive properties of live cells.

Approach curves can be converted into indentation curves (representing only the deformation of the cell) and fitted to theoretical models. Up to now the Hertz or Sneddon models have been used in a vast majority of articles devoted to the measurement of Young's modulus of cells [72–77]. The Hertz model describes the case of elastic deformation of two perfectly homogeneous smooth bodies touching under load. The Young modulus value obtained provides information on the elasticity of the cell surface and also on its deformation. If the Young modulus value decreases, the deformation of the membrane and of the underlying cellular components (depending on the indentation depth chosen for analysis) is more important, and thus the elasticity is lower. For example, the average Young modulus (YM) value of *E. coli* is in the range of 500 kPa [53], whereas the one of a mammalian cell, such as the living CM [54], is in the range of 20 kPa. This difference in the YM is mainly related to the presence of a cell wall in the case of bacteria. In a different disease condition, such as heart failure, the Young modulus value of CMs increases to 40 kPa [54]. However, the reader must understand that YM values are mainly relative and that absolute comparison is hazardous. Indeed, in other papers, the YM of normal living mammalian cardiomyocytes has been measured in the range 35-43 kPa [78] or around 100 kPa [78]. The experimental conditions

(both for AFM measurements and for CMs conditioning) are never the same between two groups. The applied force is different, the model chosen for the force curve analysis is different, the indentation segment analyzed is different, the method used to determine the contact point is different [79]. As a consequence, the results can hardly be compared and only relative comparison between YM measured in the same conditions are valuable

When retracting the tip from the surface, a retract force curve is recorded and can provide information on the adhesion between the tip and the sample. If the experiment is conducted with a functionalized probe, a chemical or a biochemical adhesion can be recorded (depending on the functionalization). For example, hydrophobic probes can be fabricated by functionalizing the tips with hydrophobic alkanthiol [80, 81]; and single molecule interactions can be recorded by functionalizing the tips with antibodies [82, 83].

Force spectroscopy mode is thus very interesting for the study of CMs, because it provides new information on the cell topography but also on new parameters such as adhesion and elasticity of the cell membrane probed. However, a major drawback of this method is the acquisition time as it is time consuming to record individual force curves according to a matrix of points all over the sample. In order to circumvent this issue, new AFM modes were developed; they are called multiparametric imaging modes.

4.4. Multiparametric imaging modes.

Multiparametric imaging modes are recent operating modes based on force curve acquisition. Theses modes are developed to connect simultaneously all the benefits of the AFM technology: high acquisition speed, nanoscale resolution and investigation of the nanomechanical/adhesive properties of the cells, without altering them. HarmoniX and PeakForce QNM are multiparametric acquisition modes developed by the AFM manufacturer Bruker. HarmoniX mode was first created in order to increase the acquisition speed. It was then replaced by the manufacturers by PeakForce QNM technology where a high number of force curves are acquired at high speed all over the sample. The equivalent mode developed by JPK Instruments is called Quantitative Imaging (QI™) mode, and relies on the same principle, although QI™ offers a longer force curve ramp and a lower z-scan rate, better suited for probing single molecule interactions. Each one of these new advanced acquisition modes have been used for the characterization of numerous cell types, such as eukaryotic cells, yeast or microorganisms [84, 85] and biomolecular systems under physiological conditions. Because multiparametric imaging modes give the opportunity to probe the nanomechanical/adhesive properties of living cell in a short period of time, this technology is more suited for short life sample studies. For example, the topography of CMs is rapidly modified during the dedifferentiation period; indeed, its lateral membrane structure and organization can be altered during long experimental procedure. Therefore, multiparametric imaging modes could allow a rapid analysis of living CMs after their extraction.

4.5. Cantilevers used as nanomechanical sensors.

In heart studies, AFM can also be used differently, by recording the time series of beating heart cells using the constant force mode. In this mode the sample height is adjusted so that the cantilever deflection stays constant, using an electronic feedback loop. Therefore, when the CM contracts, the tip, in contact with its surface, undergoes a deflection that is recorded. Using this method, the frequency of the cell beats as well as their forces can be monitored over time and under certain conditions, such as the addition of a pharmaceutical agent [58]. Such results, combined with data obtained in other AFM modes, can give access to new information and create new paradigms in fundamental questions concerning CMs, and their contractile properties. Altogether, AFM technics bring many possibilities to explore isolated cardiomyocyte in disease conditions or submitted to treatments. Examples of such studies will be described in the next section.

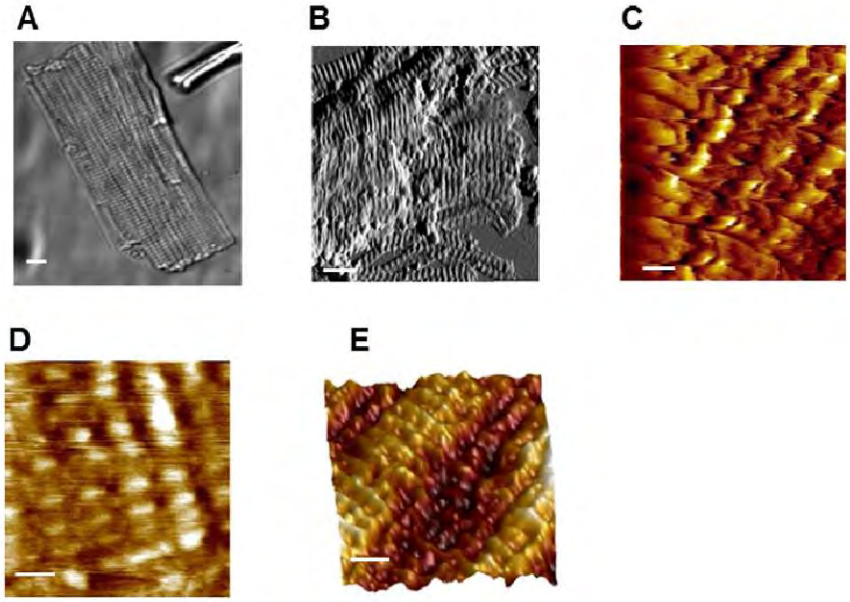


Figure 5. Cell surface topography of living CMs obtained by AFM. CMs were isolated from 2-months old mice hearts (A) observation by optical microscopy. Representative images of CMs surface were obtained using: (B) contact mode in liquid on fixed CM, (C) contact mode in liquid on living CM, (D) Tapping mode in liquid on living CM and (E) Force spectroscopy mode in liquid on living CM. Scale bars: 2 µm. Images reprinted from [54].

5. AFM USED TO EXPLORE ISOLATED CARDIOMYOCYTE IN PATHOPHYSIOLOGICAL CONDITIONS

Only few studies in the literature, have studied the CM in physiological condition by AFM [86] and even less have probed the impact of cardiac diseases conditions on CMs using AFM. Among them are studies on HF [54], on diabetes [65], on the effects of an antiarrhythmic on the contraction of CMs [68] and on CMs lacking an essential component of the LM necessary for the stability of their adult rod shape [66].

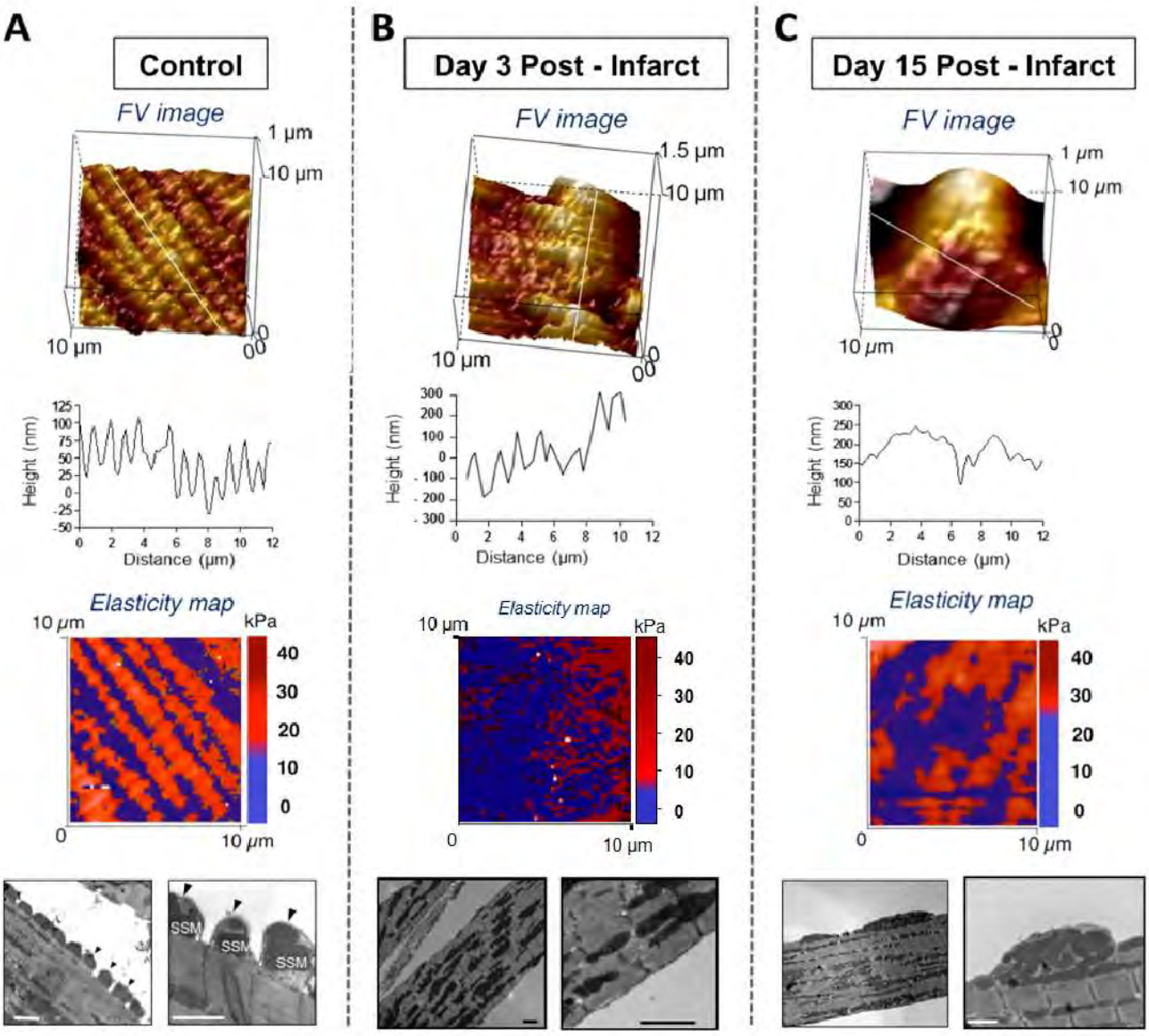


Figure 6. Comparison between topography and biophysical properties of healthy mice CMs and failing CMs. Representative images of a 3D topography (upper panels) and associated elasticity maps of CM surface obtained by AFM force volume (FV) mode analysis. The height variations along the solid line (CM long axis) in FV image are represented in the graphs below. In Elasticity maps from control CM, Young's modulus values ≤ 18 kPa (median value of Young's modulus values measured on the overall CM surface) are depicted in blue while values ≥ 18 kPa are in red. In CMs from 3 and 15 days post-MI failing mice, Young's modulus values ≤ 28 kPa (median value of Young's modulus values measured on the overall CM surface) are depicted in blue while values ≥ 28 kPa are in red. Lower panels represent electron micrograph of isolated CMs in each conditions and showing: periodic organization of crests at the cell surface filled with subsarcolemmal mitochondria (SSM) in control CMs, complete loss of crests and associated SSM in 3 days post-MI CMs, alternation of area with flat surface and mitochondria heaps.. Reprinted from [54].

5.1. AFM used to study living CMs in heart failure.

A recent study by Dague *et al.* [24] showed how AFM can be used to follow the morphological/nanomechanical changes in the LM structure of 2 months-old adult living CMs from failing mice (permanent coronary ligation /experimental infarct model). To this end, non-beating adult CMs isolated and immobilized by laminin were analyzed at 3 (initial IC) and 15 days (advanced IC) post-infarct using force spectroscopy measurements in a controlled atmosphere (37°C, 5% CO_2) with an applied force of 2nN and analyzed with the Hertz model, in order to follow the kinetics of CM structural evolution during HF. In healthy conditions (non-failing mice), the surface topography of the CM presents a highly structured organization with a periodic alternation of crests and hollows (Figure 6A), a feature already observed with SICM at lower resolution [21, 36]. However, compared to SICM, nanomechanical properties (elasticity map) of the surface could also be probed, and indicated that crests were stiffer compared to hollows (Figure 6A). Further TEM and AFM stiffness tomography

(elasticity in-depth in the sample) [51] analysis demonstrated that this increase in stiffness at the crest level, was in fact related to the presence of subsarcolemmal mitochondria (SSM) located beneath the LM. Interestingly, at 3 days post-infarct, the LM of CMs lost their periodic crests/hollows topography and exhibited a flat structure (Figure 6B), correlating with a decreased Young modulus at the surface as well as in depth as shown by force spectroscopy experiments.. TEM observations performed in 3 days post-infarct CMs revealed that the loss of crests and the decreased Young modulus were in fact related to the loss of the SSM population. Fifteen days post-infarct, further modifications of the structure of the LM could be observed; topography/force spectroscopy analysis indicated the presence of new higher stiff heaps (Figure 6C) but presenting a heterogeneous distribution at the CM surface. Correlating TEM images showed that cell surface heaps were formed by the accumulation of interfibrillar mitochondria (IFM), which have migrated from the interior of the CM to the cell surface. Therefore, it appears that the organization of mitochondria populations is responsible for the modifications of the Young modulus of the LM of the CMs probed. This study was the first to combine TEM and AFM observations on living adult CMs and helped to get further insights into the molecular mechanisms underlying HF in mice.

5.2. Use of AFM to study the CMs membrane in diabetes.

Another study by Benech *et al.* [65] focused on the consequences of type 1 diabetes on the nanomechanical properties of CMs. In this work, type 1 diabetes was induced in mice by a single administration of Streptozotocin, a molecule promoting the selective necrosis of pancreatic cells. CMs used for AFM experiments were then purified from primary culture 3 months following the Streptozotocin injection. Imaging acquisition was performed using contact mode on paraformaldehyde fixed CMs ,and individual force curves were recorded using Force spectroscopy mode ("Point and Shoot") on top of the adult CMs isolated and plated on polylysine. This method allowed the authors to measure an increase of the stiffness of the cell membrane of diabetic CMs, compared to healthy CMs. A particular interest of this study is the combined analysis by confocal microscopy, which made possible to explore the cytoskeleton simultaneously. Thus, diabetic CMs have been shown to harbor a diffuse and irregular actin organization, compared to healthy cells that present well-defined and ordered actin filaments. The authors then concluded that the cytoskeleton disorganization could be responsible for the increase in stiffness of the CMs cell surface.

5.3. Using AFM to probe the role of ephrin-B1 in the cardiomyocyte architecture.

In another recent study conducted by Genet *et al*. [66], AFM was used to explore the role of ephrin-B1, a transmembrane protein localized at the LM of adult CMs. Combining different fluorescence and electron microscopy imaging together with *in vivo* experiments, the authors of this study demonstrated that this protein plays a key role in the stabilization of the adult CM rod-shape, thus allowing the cohesion of the cardiac tissue. To support their conclusions, AFM was used as a complementary method to study non-beating living CMs purified from 2-3 months old mice deleted or not for the gene encoding for ephrin-B1 protein (*efnb1*$^{-/-}$ Knock-out KO), to probe the elasticity of the LM of CMs. Force spectroscopy experiments performed on adult isolated CMs, immobilized on laminin coated dishes in a controlled atmosphere (37°C with 5% CO_2) with an applied force limited to 2nN and analyzed with Hertz model, have shown that the absence of ephrin-B1 impacted the elasticity of the CM lateral membrane, with a 3-fold increase of the Young modulus in CMs isolated from *efnb1* KO mice compared to control CMs (Figure 7A).

5.4. Probing the effects of ibutilide on the heart contraction using AFM.

Finally in a study conducted by Liu *et al.* [68], the authors did not use AFM as an imaging tool nor as a force machine, but as a nanomechanical sensor. This strategy, used for the first time by Radmacher *et al.* in 1994 [87], allowed the authors to monitor the cell's beats frequency and force, as presented in Figure 7B, in the absence or presence of ibutilide, an antiarrhythmic agent indicated for atrial fibrillation and dysfunction of the sinus rhythm. The results obtained by the authors demonstrated that this molecule induced a decrease in the contraction force, and an increase in the beating frequency (from 0.59 Hz to 0.83 Hz). The authors could thus conclude that ibutilide could prevent ventricular arrhythmias by decreasing the contraction force of the CMs. This opens new perspectives for using AFM as a tool to screen for molecules efficiency potentially useful for the treatment of cardiac pathologies.

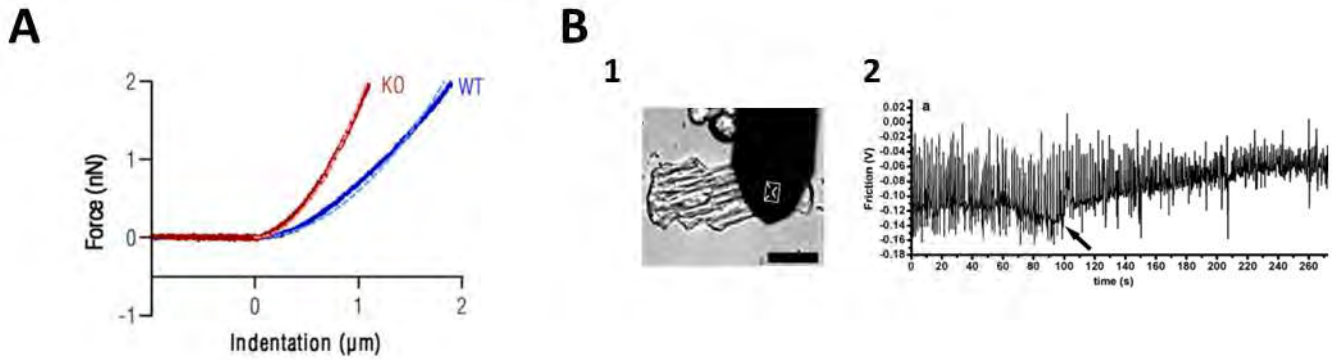


Figure 7. (A) Ephrin B1 stabilizes the stiffness of the CM. Representative single indentation curve (*plain line*) from AFM studies performed on wild type (*blue*) or KO (*red*) Eprin B1 living CMs. In both cases, the Hertz Model (*dotted line*) fitted quite well with experiment. (B) The cantilever torsional force is used to measure the CM contractions (1). Record of a CM contractions performed by a system based on the cantilever sensitivity, before and after (arrow) the addition of an arrythmic agent (2).

6. CONCLUSIONS

These recent years AFM nanotechnology has evolved into a multifunctional tool that opens new possibilities for studying CMs from a different angle. Combining this technology with preexisting microscopies imaging (confocal, fluorescence, TEM/SEM), has allowed generating new information on the structure of the membrane of CMs, as well as on their nanomechanical properties. AFM technics using the cantilever as a mechanosensor also provided a useful tool for studying the contraction of these cells. However, the number of research articles using AFM still remains very low, and we present here the first review dedicated to its use in cardiology. There are therefore many open possibilities to explore this field and AFM studies should be extensively applied to many different cardiac pathophysiological states to explore modifications of the surface of the CM. The recent advances proposed by AFM manufacturers, such as multiparametric imaging modes will allow acquiring data on living cells in a reasonable time, and at high resolution. This way studies performed on living cells will be easier to perform, and therefore the fundamental knowledge generated on cells close to their physiological conditions will increase. Multiparametric imaging will also be of great use to probe the adhesive properties of the cardiomyocytes; this has never been explored, and combining this approach with AFM tips functionalization strategies with biomolecules will bring valuable results to the field. Indeed, using this method, mapping of specific proteins at the surface of cardiomyocytes in different conditions or submitted to treatments will be possible. This way the knowledge on the functions and roles of specific protein (such as ephrins) will be deciphered. Altogether, developing existing AFM approaches and using advanced techniques such as multiparametric imaging with functionalized AFM tips is of great interest in a field such as cardiology. The molecular architecture of cardiomyocytes can be probed using these technics, and, combined with electronic or optical microscopies giving access to the “inside” of cells, light will be shed on the mechanisms underlying public-health pathologies, such as heart failure and other heart diseases.

7. REFERENCES

[1] D. Lloyd-Jones, R. J. Adams, T. M. Brown, M. Carnethon, S. Dai, G. De Simone, T. B. Ferguson, E. Ford, K. Furie, C. Gillespie, A. Go, K. Greenlund, N. Haase, S. Hailpern, P. M. Ho, V. Howard, B. Kissela, S. Kittner, D. Lackland, L. Lisabeth, A. Marelli, M. M. McDermott, J. Meigs, D. Mozaffarian, M. Mussolino, G. Nichol, V. L. Roger, W. Rosamond, R. Sacco, P. Sorlie, V. L. Roger, R. Stafford, T. Thom, S. Wasserthiel-Smoller, N. D. Wong, J. Wylie-Rosett, Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association , *Circulation*, 121, 7, e46‑e215, **2010**.

[2] A. L. Bui, T. B. Horwich, G. C. Fonarow, Epidemiology and risk profile of heart failure , *Nat. Rev. Cardiol.*,. 8, 1, 30‑41, **2011**.

[3] G. S. Francis, Pathophysiology of chronic heart failure , *Am. J. Med.*, 110, 7, Suppl. 1, 37‑46, **2001**.

[4] J. A. Hill, E. N. Olson, Cardiac plasticity , *N. Engl. J. Med.*, 358, 13, 1370‑1380, **2008**.

[5] Gallo P,d’Amati G., Cardiomyopathies, In : Silver MD, Gotlieb Al, Schoen FJ, editors. *Cardiovascular pathology*, Chapter 10, **2001**.

[6] A. K. Biala, L. A. Kirshenbaum, The interplay between cell death signaling pathways in the heart , *Trends in Cardiovascular Medicine*, **2014**.

[7] M. Leu, E. Ehler, J. C. Perriard, Characterisation of postnatal growth of the murine heart , *Anat. Embryol. (Berl.)*, 204, 3, 217‑224, **2001**.

[8] D. V. Miller, M. P. Revelo Diagnostic Pathology: Cardiovascular, Published by Amirsys®, **2014**.

[9] Y.-Y. Zhou, S.-Q. Wang, W.-Z. Zhu, A. Chruscinski, B. K. Kobilka, B. Ziman, S. Wang, E. G. Lakatta, H. Cheng, et R.-P. Xiao, Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes: methods for cellular genetic physiology , *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.*, 279, 1, H429‑H436, **2000**.

[10] C. F. Deschepper, S. Picard, G. Thibault, R. Touyz, et J.-L. Rouleau, Characterization of myocardium, isolated cardiomyocytes, and blood pressure in WKHA and WKY rats , *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.*, 282, 1, H149‑H155, **2002**.

[11] M. Zheng, R. Hou, et R.-P. Xiao, Acidosis-induced p38 MAPK activation and its implication in regulation of cardiac contractility, *Acta Pharmacol. Sin.*, 25, 10, 1299‑1305, **2004**.

[12] H. K. Saini et N. S. Dhalla, Defective calcium handling in cardiomyocytes isolated from hearts subjected to ischemia-reperfusion, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 288, 5, H2260‑2270, **2005**.

[13] Z. Kabaeva, M. Zhao, et D. E. Michele, Blebbistatin extends culture life of adult mouse cardiac myocytes and allows efficient and stable transgene expression , *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 294, 4, H1667‑1674, **2008**.

[14] A. Gartner, T. Pereira, R. Gomes, A. Lucia, M. Lacueva, S. Geuna, P. Armada-da-Silva, et A. Colette, Mesenchymal Stem Cells from Extra-Embryonic Tissues for Tissue Engineering – Regeneration of the Peripheral Nerve , in *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications*, R. Pignatello, Éd. InTech, **2013**.

[15] A. Cohen, Coeur et médecine interne, published by De Boeck Secundair, **2002.**

[16] B. Maisch, E. Bauer, G. Hufnagel, et R. Rohkamm, The use of endomyocardial biopsy in heart failure , *Eur. Heart J.*, 9, suppl H, 59‑71, **1988**.

[17] A. Saraste, K. Pulkki, M. Kallajoki, P. Heikkilä, P. Laine, S. Mattila, M. S. Nieminen, M. Parvinen, et L. M. Voipio-Pulkki, Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation, *Eur. J. Clin. Invest.*, 29, 5, 380‑386, **1999**.

[18] J. Rajs, Histological diagsis of myocardial injury. Comparison of hematoxylin-basic fuchsin-picric acid (HBFP)-stained sections obtained during autopsy with isolated viable rat cardiac myocytes exposed to anoxia, *Acta Pathol. Microbiol. Scand. [A]*, 87A, 4, 289‑297, **1979**.

[19] S. Jovanovic, A. J. Grantham, J. E. Tarara, J. C. Burnett, A. Jovanovic, et A. Terzic, Increased number of cardiomyocytes in cross-sections from tachycardia-induced cardiomyopathic hearts., *Int. J. Mol. Med.*, **1999**.

[20] O. R. Coelho-Filho, R. V. Shah, R. Mitchell, T. G. Neilan, H. Moreno, B. Simonson, R. Kwong, A. Rosenzweig, S. Das, et M. Jerosch-Herold, Quantification of Cardiomyocyte Hypertrophy by Cardiac Magnetic Resonance Implications for Early Cardiac Remodeling, *Circulation*, 128, 11, 1225‑1233, **2013**.

[21] A. R. Lyon, K. T. MacLeod, Y. Zhang, E. Garcia, G. K. Kanda, M. J. Lab, Y. E. Korchev, S. E. Harding, et J. Gorelik, Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 106, 16, 6854‑6859, **2009**.

[22] H. Sawada, F. Hosokawa, T. Kaneyama, T. Tomita, Y. Kondo, T. Tanaka, Y. Oshima, Y. Tanishiro, N. Yamamoto, et K. Takayanagi, Performance of R005 Microscope and Aberration Correction System, in *EMC 2008 14th European Microscopy Congress 1–5 September 2008, Aachen, Germany*, M. Luysberg, K. Tillmann, et T. Weirich, Éd. Springer Berlin Heidelberg, 47‑48, **2008**.

[23] M. Knoll et J. Kugler, Subjective Light Pattern Spectroscopy in the Encephalographic Frequency Range, *Nature*, 184, 4701, 1823‑1824, **1959**.

[24] E. Dague, G. Genet, V. Lachaize, C. Guilbeau-Frugier, J. Fauconnier, C. Mias, B. Payré, L. Chopinet, D. Alsteens, S. Kasas, C. Severac, J. Thireau, C. Heymes, B. Honton, A. Lacampagne, A. Pathak, J.-M. Sénard, et C. Galés, Atomic force and electron microscopic-based study of sarcolemmal surface of living cardiomyocytes unveils

unexpected mitochondrial shift in heart failure, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 74, 162‑172, **2014**.
[25] D. Chang, Z. Wen, Y. Wang, W. Cai, M. Wani, C. Paul, T. Okano, R. W. Millard, et Y. Wang, Ultrastructural Features of Ischemic Tissue following Application of a Bio-Membrane Based Progenitor Cardiomyocyte Patch for Myocardial Infarction Repair, *PLoS ONE*, 9, 10, **2014**.
[26] D. MacMullan, Von Ardenne and the scanning electron microscope, *Proc. R. Microsc. Soc.*, 23, 283‑288, **1988**.
[27] M. von Ardenne, Die durch Elektronenstreuung im Objekt verursachten Abbildungsfehler des Elektronenmikroskops und ihr Verhältnis zueinander, *Z. Für Phys.*, 111, 3‑4, 152‑157, **1938.**
[28] F. J. Doucet, L. Maguire, et J. R. Lead, Assessment of cross-flow filtration for the size fractionation of freshwater colloids and particles, *Talanta*, 67, 1, 144‑154, **2005**.
[29] M. Adrian, J. Dubochet, J. Lepault, et A. W. McDowall, Cryo-electron microscopy of viruses, *Nature*, 308, 5954, 32‑36, **1984**.
[30] J. P. Jung, J. M. Squirrell, G. E. Lyons, K. W. Eliceiri, et B. M. Ogle, Imaging cardiac extracellular matrices: a blueprint for regeneration, *Trends Biotechnol.*, 30, 4, 233‑240, **2012**.
[31] A. Bogner, P.-H. Jouneau, G. Thollet, D. Basset, et C. Gauthier, A history of scanning electron microscopy developments: Towards "wet-STEM" imaging, *Micron*, 38, 4, 390‑401, **2007**.
[32] P. Hansma, B. Drake, O. Marti, S. Gould, et C. Prater, The scanning ion-conductance microscope, *Science*, 243, 4891, 641 ‑643, **1989**.
[33] S. Bergner, P. Vatsyayan, et F.-M. Matysik, Recent advances in high resolution scanning electrochemical microscopy of living cells – A review, *Anal. Chim. Acta*, 775, 1‑13, **2013**.
[34] P. Novak, C. Li, A. I. Shevchuk, R. Stepanyan, M. Caldwell, S. Hughes, T. G. Smart, J. Gorelik, V. P. Ostanin, M. J. Lab, G. W. J. Moss, G. I. Frolenkov, D. Klenerman, et Y. E. Korchev, Nanoscale live-cell imaging using hopping probe ion conductance microscopy, *Nat. Methods*, 6, 4, 279‑281, **2009**.
[35] M. Caldwell, S. J. L. Del Linz, T. G. Smart, et G. W. J. Moss, Method for Estimating the Tip Geometry of Scanning Ion Conductance Microscope Pipets, *Anal. Chem.*, 84, 21, 8980‑8984, **2012**.
[36] V. O. Nikolaev, A. Moshkov, A. R. Lyon, M. Miragoli, P. Novak, H. Paur, M. J. Lohse, Y. E. Korchev, S. E. Harding, et J. Gorelik, β2-Adrenergic Receptor Redistribution in Heart Failure Changes cAMP Compartmentation, *Science*, 327, 5973, 1653‑1657, **2010**.
[37] M. Miragoli, A. Moshkov, P. Novak, A. Shevchuk, V. O. Nikolaev, I. El-Hamamsy, C. M. F. Potter, P. Wright, S. H. S. A. Kadir, A. R. Lyon, J. A. Mitchell, A. H. Chester, D. Klenerman, M. J. Lab, Y. E. Korchev, S. E. Harding, et J. Gorelik, Scanning ion conductance microscopy: a convergent high-resolution technology for multi-parametric analysis of living cardiovascular cells, *J. R. Soc. Interface R. Soc.*, 8, 60, 913‑925, **2011**.
[38] S. M. Evans, D. Yelon, F. L. Conlon, et M. L. Kirby, Myocardial Lineage Development, *Circ. Res.*, 107, 12, 1428‑1444, **2010**.
[39] Y. F. Dufrêne, Application of atomic force microscopy to microbial surfaces: from reconstituted cell surface layers to living cells, *Micron Oxf. Engl. 1993*, 32, 2, 153‑165, **2001**.
[40] D. J. Müller et Y. F. Dufrêne, Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface, *Trends Cell Biol.*, 21, 8, 461‑469, **2011**.
[41] J. J. Heinisch, P. N. Lipke, A. Beaussart, S. El Kirat Chatel, V. Dupres, D. Alsteens, et Y. F. Dufrêne, Atomic force microscopy - looking at mechanosensors on the cell surface, *J. Cell Sci.*, 125, 18, 4189‑4195, **2012**.
[42] Y. F. Dufrêne, D. Martínez-Martín, I. Medalsy, D. Alsteens, et D. J. Müller, Multiparametric imaging of biological systems by force-distance curve-based AFM, *Nat. Methods*, 10, 9, 847‑854, **2013**.
[43] Y. F. Dufrêne et A. E. Pelling, Force nanoscopy of cell mechanics and cell adhesion, *Nanoscale*, 5, 10, 4094‑4104, **2013**.
[44] P. J. de Pablo et M. Carrión-Vázquez, Imaging biological samples with atomic force microscopy, *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2014, 2, 167‑177, **2014**.
[45] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, et E. Weibel, Tunneling through a controllable vacuum gap, *Appl Phys Lett*, 40, 2, 178‑180, **1982**.
[46] P. K. Hansma, V. B. Elings, O. Marti, et C. E. Bracker, Scanning tunneling microscopy and atomic force microscopy: application to biology and technology, *Science*, 242, 4876, 209‑216, **1988**.
[47] D. Alsteens, V. Dupres, S. Yunus, J.-P. Latgé, J. J. Heinisch, et Y. F. Dufrêne, High-Resolution Imaging of Chemical and Biological Sites on Living Cells Using Peak Force Tapping Atomic Force Microscopy, *Langmuir*, 28, 49, 16738‑16744, **2012**.
[48] W. F. Heinz et J. H. Hoh, Spatially resolved force spectroscopy of biological surfaces using the atomic force microscope, *Trends Biotechnol.*, 17, 4, 143‑150, **1999**.
[49] G. Longo, L. M. Rio, C. Roduit, A. Trampuz, A. Bizzini, G. Dietler, et S. Kasas, Force volume and stiffness tomography investigation on the dynamics of stiff material under bacterial membranes, *J. Mol. Recognit.*, 25, 5, 278‑284, **2012**.
[50] C. Roduit, S. Sekatski, G. Dietler, S. Catsicas, F. Lafont, et S. Kasas, Stiffness tomography by atomic force microscopy, *Biophys. J.*, 97, 2, 674‑677, **2009**.
[51] C. Roduit, B. Saha, L. Alonso-Sarduy, A. Volterra, G. Dietler, et S. Kasas, OpenFovea: open-source AFM data processing software, *Nat. Methods*, 9, 8, 774‑775, **2012**.
[52] K. El Kirat, I. Burton, V. Dupres, et Y. F. Dufrene, Sample preparation procedures for biological atomic force microscopy, *J. Microsc.*, 218, 3, 199‑207, **2005**.
[53] L. Chopinet, C. Formosa, M. P. Rols, R. E. Duval, et E. Dague, Imaging living cells surface and quantifying its properties at high resolution using AFM in QI™ mode, *Micron*, 48, 26‑33, **2013**.
[54] E. Dague, G. Genet, V. Lachaize, C. Guilbeau-Frugier, J. Fauconnier, C. Mias, B. Payré, L. Chopinet, D. Alsteens, S. Kasas, C. Severac, J. Thireau, C. Heymes, B. Honton, A. Lacampagne, A. Pathak, J.-M. Sénard, et C. Galés, Atomic force and electron microscopic-based study of sarcolemmal surface of living cardiomyocytes unveils unexpected mitochondrial shift in heart failure, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 74, 162‑172, **2014**.
[55] M. Riehle et J. Bereiter-Hahn, Ouabain and digitoxin as modulators of chick embryo cardiomyocyte energy metabolism, *Arzneimittelforschung.*, 44, 8, 943‑947, **1994**.
[56] M. J. Masse et I. Harary, Primary cultures of embryonic rat heart cells, *In Vitro*, 17, 5, 388‑392, **1981**.
[57] M. C. Denyer, M. Riehle, S. T. Britland, et A. Offenhauser, Preliminary study on the suitability of a pharmacological bio-assay based on cardiac myocytes cultured over microfabricated microelectrode arrays, *Med. Biol. Eng. Comput.*, 36, 5, 638‑644, **1998**.
[58] J. Domke, W. J. Parak, M. George, H. E. Gaub, et M. Radmacher, Mapping the mechanical pulse of single cardiomyocytes with the atomic force microscope, *Eur. Biophys. J. EBJ*, 28, 3, 179‑186, **1999**.
[59] K. J. Broadley, The Langendorff heart preparation—Reappraisal of its role as a research and teaching model for coronary vasoactive drugs, *J. Pharmacol. Methods*, 2, 2, 143‑156, **1979**.
[60] K. Broadley, The Langendorff heart preparation—Reappraisal of its role as a research and teaching model for coronary vasoactive drugs, *J. Pharmacol. Methods*, 2, 2, 143‑156, **1979**.
[61] W. E. Louch, K. A. Sheehan, et B. M. Wolska, Methods in Cardiomyocyte Isolation, Culture, and Gene Transfer, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 51, 3, 288‑298, **2011**.
[62] J. O. Bustamante, T. Watanabe, D. A. Murphy, et T. F. McDonald, Isolation of single atrial and ventricular cells from the human heart., *Can. Med. Assoc. J.*, 126, 7, 791‑793, **1982**.
[63] J. Gorelik, L. Q. Yang, Y. Zhang, M. Lab, Y. Korchev, et S. E. Harding, A novel Z-groove index characterizing myocardial surface structure, *Cardiovasc. Res.*, 72, 3, 422‑429, **2006**.
[64] Y.-Y. Zhou, S.-Q. Wang, W.-Z. Zhu, A. Chruscinski, B. K. Kobilka, B. Ziman, S. Wang, E. G. Lakatta, H. Cheng, et R.-P. Xiao, Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes: methods for cellular genetic physiology, *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.*, 279, 1, H429‑H436, **2000**.
[65] J. C. Benech, N. Benech, A. I. Zambrana, I. Rauschert, V. Bervejillo, N. Oddone, et J. P. Damián, Diabetes increases stiffness of live cardiomyocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, ajpcell.00192.2013, **2014**.
[66] G. Genet, C. Guilbeau-Frugier, B. Honton, E. Dague, M. D. Schneider, C. Coatrieux, D. Calise, C. Cardin, C. Nieto, B. Payré, C.

Dubroca, P. Marck, C. Heymes, A. Dubrac, D. Arvanitis, F. Despas, M.-F. Altié, M.-H. Seguelas, M.-B. Delisle, A. Davy, J.-M. Sénard, A. Pathak, et C. Galés, Ephrin-B1 is a novel specific component of the lateral membrane of the cardiomyocyte and is essential for the stability of cardiac tissue architecture cohesion, *Circ. Res.*, 110, 5, 688‑700, **2012**.

[67] W. Sumita Yoshikawa, K. Nakamura, D. Miura, J. Shimizu, K. Hashimoto, N. Kataoka, H. Toyota, H. Okuyama, T. Miyoshi, H. Morita, K. Fukushima Kusano, T. Matsuo, M. Takaki, F. Kajiya, N. Yagi, T. Ohe, et H. Ito, Increased passive stiffness of cardiomyocytes in the transverse direction and residual actin and myosin cross-bridge formation in hypertrophied rat hearts induced by chronic β-adrenergic stimulation, *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.*, 77, 3, 741‑748, **2013**.

[68] Y. Liu, J. Feng, L. Shi, R. Niu, Q. Sun, H. Liu, J. Li, J. Guo, J. Zhu, et D. Han, In situ mechanical analysis of cardiomyocytes at nano scales, *Nanoscale*, 4, 1, 99‑102, **2012**.

[69] Y. Mizutani, K. Kawahara, et T. Okajima, Effect of isoproterenol on local contractile behaviors of rat cardiomyocytes measured by atomic force microscopy, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 13, 14, 2599‑2603, **2012**.

[70] F. Pillet, L. Chopinet, C. Formosa, et É. Dague, Atomic Force Microscopy and pharmacology: From microbiology to cancerology, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, 1840, 3, 1028‑1050, **2014**.

[71] E. Dague, D. Alsteens, J.-P. Latgé, et Y. F. Dufrêne, High-Resolution Cell Surface Dynamics of Germinating Aspergillus fumigatus Conidia, *Biophys. J.*, 94, 2, 656‑660, **2008**.

[72] C. Formosa, M. Grare, E. Jauvert, A. Coutable, J. B. Regnouf-de-Vains, M. Mourer, R. E. Duval, et E. Dague, Nanoscale analysis of the effects of antibiotics and CX1 on a Pseudomonas aeruginosa multidrug-resistant strain, *Sci Rep*, 2, **2012**.

[73] C. Formosa, M. Grare, R. E. Duval, et E. Dague, Nanoscale effects of antibiotics on P. aeruginosa, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, 8, 1, 12‑16, **2012**.

[74] C. Formosa, M. Schiavone, H. Martin-Yken, J. M. François, R. E. Duval, et E. Dague, Nanoscale Effects of Caspofungin against Two Yeast Species, Saccharomyces cerevisiae and Candida albicans, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57, 8, 3498‑3506, **2013**.

[75] F. Pillet, S. Lemonier, M. Schiavone, C. Formosa, H. Martin-Yken, J. M. Francois, et E. Dague, Uncovering by Atomic Force Microscopy of an original circular structure at the yeast cell surface in response to heat shock, *BMC Biol.*, 12, 1, 6, **2014**.

[76] L. Chopinet, C. Roduit, M.-P. Rols, et E. Dague, Destabilization induced by electropermeabilization analyzed by atomic force microscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, 1828, 9, 2223‑2229, **2013**.

[77] A. Cerf, J.-C. Cau, C. Vieu, et E. Dague, Nanomechanical Properties of Dead or Alive Single-Patterned Bacteria, *Langmuir*, 25, 10, 5731‑5736, **2009**.

[78] A. B. Mathur, A. M. Collinsworth, W. M. Reichert, W. E. Kraus, et G. A. Truskey, Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy, *J. Biomech.*, 34, 12, 1545‑1553, **2001**.

[79] H.-J. Butt, B. Cappella, et M. Kappl, Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications, *Surf. Sci. Rep.*, 59, 1‑6, 1‑152, **2005**.

[80] E. Dague, D. Alsteens, J. P. Latge, C. Verbelen, D. Raze, A. R. Baulard, et Y. F. Dufrêne, Chemical force microscopy of single live cells, *Nano Lett*, 7, 10, 3026‑3030, **2007**.

[81] D. Alsteens, E. Dague, P. G. Rouxhet, A. R. Baulard, et Y. F. Dufrene, Direct measurement of hydrophobic forces on cell surfaces using AFM, *Langmuir*, 23, 24, 11977‑11979, **2007**.

[82] P. Hinterdorfer et Y. F. Dufrêne, Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy, *Nat. Methods*, 3, 5, 347‑355, **2006**.

[83] E. Jauvert, E. Dague, M. Severac, L. Ressier, A. M. Caminade, J. P. Majoral, et E. Trévisiol, Probing single molecule interactions by AFM using bio-functionalized dendritips, *Sens. Actuators B Chem.*, 168, 436‑441, **2012**.

[84] C. Formosa, M. Schiavone, A. Boisrame, M. L. Richard, R. E. Duval, et E. Dague, Multiparametric imaging of adhesive nanodomains at the surface of Candida albicans by atomic force microscopy, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, **2014**.

[85] D. Alsteens, H. Trabelsi, P. Soumillion, et Y. F. Dufrêne, Multiparametric atomic force microscopy imaging of single bacteriophages extruding from living bacteria, *Nat. Commun.*, 4, 2926, **2013**.

[86] S. C. Lieber, N. Aubry, J. Pain, G. Diaz, S.-J. Kim, et S. F. Vatner, Aging increases stiffness of cardiac myocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation, *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.*, 287, 2, H645‑H651, **2004**.

[87] M. Radmacher, J. P. Cleveland, M. Fritz, H. G. Hansma, et P. K. Hansma, Mapping interaction forces with the atomic force microscope, *Biophys. J.*, 66, 6, 2159‑2165, **1994**.

8. ACKNOWLEDGEMENTS

VL holds a PhD grant from Federative University of Toulouse Midi-Pyrénées and Region Midi-Pyrénées, CF and GS are postdoctoral researchers respectively at LAAS-CNRS and ITAV-CNRS. ED is a scientific researcher at CNRS, CG is a scientific researcher at INSERM. This research is supported by FRM, Grant # ING 21040129094.

© 2015 by the authors. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Caractérisation des propriétés nanomécaniques de la membrane des cardiomyocytes en condition d'insuffisance cardiaque

221. Introduction

En France, l'insuffisance cardiaque (IC) est un véritable problème de santé publique, elle est caractérisée par l'incapacité du cœur à fournir un débit suffisant à l'apport énergétique nécessaire à l'organisme. Plus d'un million de personnes en France sont atteintes d'une IC, 120 000 patients seront hospitalisés et 32 000 personnes en décèderont. Ainsi cette pathologie est la première cause d'hospitalisation chez l'adulte en France[1].

Cette pathologie est devenue une des priorités dans le monde recherche, rien qu'en 2015, 11 500 articles ont été publiés à ce sujet. Mais les mécanismes d'évolution amenant à une IC ne sont pas encore en totalité résolus. Il est connu que l'altération du fonctionnement cardiaque déclenche des mécanismes d'adaptation destinés à maintenir un débit suffisant[2,3]. Cette phase d'adaptation, asymptomatique, appelée compensation, permet de maintenir le débit cardiaque grâce à une hypertrophie de l'unité contractile du cœur, le cardiomyocyte (CM)[4]. C'est lors de cette étape que les médicaments, actuellement sur le marché, agissent afin d'augmenter la durée de cette période. Cependant le cœur va irrémédiablement basculer dans une seconde étape : la décompensation[5]. Cette étape, quant à elle, est symptomatique avec une pression artérielle augmentée, l'apparition d'une dyspnée à l'effort, d'œdèmes pulmonaires et périphériques. La décompensation est caractérisée au niveau histomorphologique par la nécrose des CMs[6,7]. La baisse de la population de ces cellules a pour conséquences l'apparition des symptômes ainsi que la déclaration de l'IC. Mais les mécanismes conduisant à la décompensation sont encore inconnus.

Lors de la décompensation, un phénomène de nécrose des CMs est observé. Cela suggère une fragilité de la membrane latérale. En effet, la nécrose est un mécanisme de mort cellulaire prématurée et non programmée de la cellule qui est causée par la rupture de la membrane cellulaire. De plus, une étude précédente a montré grâce au Scanning Ion Conductance Microscopy (SICM) que lors d'une IC, la membrane latérale (ML) perd sa structure ionique[10].

C'est dans ce contexte que s'inscrivent nos deux études présentées ci-dessous. Lors de ces travaux nous avons utilisé l'AFM afin d'observer la surface des CMs et d'obtenir les données nanomécaniques de la ML. Les acquisitions ont pu être faites sur CMs vivants isolées de cœur de souris (C57/BL6 âgées de 8 semaines) et en atmosphère contrôlée (CO_2 et 37°C).

La première, publiée en 2014[8], a permis de montrer, en couplant l'AFM et le TEM, l'impact d'un infarctus du myocarde provoqué par ligature permanente de coronaires, sur la structure et les propriétés nanomécaniques de la ML. Nos résultats démontrent un changement de la structure de la ML avant la mort du CM. Dès 3 jours post infarctus, nous avons observé une perte de la structure, caractéristique des CMs, en crêtes pour un motif structural plat et avec une élasticité plus faible, puis 15 jours post infarctus ce motif plat est remplacé par un motif de protrusions avec une

élasticité plus importante qu'en conditions normales. En parallèle, des observations en TEM ont montré que ces modifications structurales sont dues à des changements mitochondriaux. La présence de mitochondries subsarcolemmales (SSM) donne l'aspect crêtes de la ML. La mort de ces mitochondries amène un changement de motif structural en motif plat. Puis une migration d'une autre famille de mitochondries, les interfibrillaires (IFM), vers la surface membranaire provoque l'apparition de protrusions. L'ensemble des résultats mettent en évidence la disparition des crêtes des CMs. Cette disparition est liée à la perte des SSM au cours des étapes précoces de l'évolution vers l'IC, suivie de la montée des IFM à la surface cellulaire en phase terminale.

Il a été intéressant de voir, lors de notre seconde étude, si ces modifications structurelles du CM sont aussi valables pour différentes origines d'IC. Pour cela nous nous sommes servis d'un modèle d'IC induit par un traitement chimiothérapique à base de Doxorubicine (Dox) dont l'effet cardiotoxique est bien connu[9–13]. En effet, les patients ayant subi une chimiothérapie de Dox présentent, dans 2% des cas, une IC 10 après[14,15]. Pour étudier l'effet de la Dox sur la structure des CMs, un protocole (§ Annexe 1) mimant une chimiothérapie a été mise en place chez le modèle murin (souris C57/Bl6). Avec les mêmes paramètres d'AFM nous avons étudié la surface de CMs préalablement isolés sur des cœurs de souris ayant reçu chaque semaine une injection de Dox de 5mg/kg. Les observations ont été réalisées à différentes doses reçues afin d'étudier l'évolution du CM jusqu'à la mise en place de l'IC. L'observation de la topographie par AFM montre une désorganisation croissante des crêtes de la ML au cours du temps. En effet, dès la première dose, un effet sur l'organisation topographique a été observé qui s'accentue avec l'augmentation de la dose de Dox. Cette dégradation de la structure est corrélée avec une modification de l'élasticité. Avec l'augmentation de la dose nous avons pu observer une perte précoce de la structure organisée en creux/crêtes de la membrane avec une apparition d'un motif « plat », puis la formation de protrusions sur la ML. Cette similarité des différentes modifications structurales et nanomécaniques de la membrane du CM laisse penser que l'évolution vers une IC induite par une chimiothérapie à la Dox possède les mêmes mécanismes que celles d'une IC provoquée par un infarctus du myocarde.

1. F. Delahaye, G. de G. Épidémiologie de l'insuffisance cardiaque. (2001).
2. Francis, G. S. Pathophysiology of chronic heart failure.Am. J. Med. 110, 37–46 (2001).
3. Bui, A. L., Horwich, T. B. &Fonarow, G. C. Epidemiology and risk profile of heart failure. Nat. Rev. Cardiol. 8, 30–41 (2011).
4. Pepe, F. A. Structure of muscle filaments from immunohistochemical and ultrastructural studies. J. Histochem. Cytochem.23, 543–562 (1975).
5. Hill, J. A. & Olson, E. N. Cardiac Plasticity.N. Engl. J. Med. 358, 1370–1380 (2008).
6. Silver MD, Gotlieb MD & Schoen.Cardiovascular Pathology, 3e. (Churchill Lingstone, 2001).
7. Pui, C.-H.& Evans, W. E. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. N. Engl. J. Med. 354, 166–178 (2006).
8. Dague, E. et al. Atomic force and electron microscopic-based study of sarcolemmal surface of living cardiomyocytes unveils unexpected mitochondrial shift in heart failure. J. Mol. Cell. Cardiol.74, 162–172 (2014).
9. Meinardi, M. T. et al. Detection of anthracycline-induced cardiotoxicity.Cancer Treat.Rev. 25, 237–247 (1999).
10. Zhang, Y.-W., Shi, J., Li, Y.-J.& Wei, L. Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity.Arch. Immunol. Ther.Exp. (Warsz.) 57, 435–445 (2009).

11. Volkova, M. & Russell, R. Anthracycline Cardiotoxicity: Prevalence, Pathogenesis and Treatment.Curr.Cardiol.Rev. 7, 214–220 (2011).
12. Pai, V. B. &Nahata, D. M. C. Cardiotoxicity of Chemotherapeutic Agents.Drug Saf.22, 263–302 (2012).
13. Force, T. & Wang, Y. Mechanism-Based Engineering against Anthracycline Cardiotoxicity.Circulation CIRCULATIONAHA.113.003688 (2013). doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003688
14. Lipshultz, S. E. et al. Late Cardiac Effects of Doxorubicin Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia in Childhood.N. Engl. J. Med. 324, 808–815 (1991).
15. Scully, R. E. &Lipshultz, S. E. Anthracycline cardiotoxicity in long-term survivors of childhood cancer.Cardiovasc. Toxicol. 7, 122–128 (2007).

222. Etude de la membrane latérale de CM par AFM couplé à la microscopie électronique après un infarctus du myocarde.

Dague E, Genet G*, Lachaize V*, Guilbeau-Frugier C, Fauconnier F, Mias C, Payré B, Chopinet L, Alsteens D, Kasas S, Severac C, Thireau J, Heymes C, Honton B, Lacampagne L, Pathak A, Sénard JM, Galés C.*

"Atomic force and electron microscopic-based study of sarcolemmal surface of living cardiomyocytes unveils unexpected mitochondrial shift in heart failure"

(publié en 2014 dans *Journal of Molecular and Cellular Cardiology, vol. 74, p. 162-172*),

* equal contribution

Journal of Molecular and Cellular Cardiology 74 (2014) 162–172

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular and Cellular Cardiology

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

Atomic force and electron microscopic-based study of sarcolemmal surface of living cardiomyocytes unveils unexpected mitochondrial shift in heart failure

Etienne Dague [a,b,c,*,1], Gaël Genet [d,1], Véronique Lachaize [b,1], Céline Guilbeau-Frugier [d,e], Jérémy Fauconnier [f], Céline Mias [d], Bruno Payré [g], Louise Chopinet [a,h], David Alsteens [i], Sandor Kasas [j], Childerick Severac [b,c], Jérôme Thireau [f], Christophe Heymes [d], Benjamin Honton [d], Alain Lacampagne [f], Atul Pathak [d,k], Jean-Michel Sénard [d,k], Céline Galés [b,d,**]

[a] CNRS, LAAS, F-31400 Toulouse, France
[b] CNRS, ITAV-USR3505, Toulouse, France
[c] Université de Toulouse, ITAV, LAAS, F-31400 Toulouse France
[d] Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, INSERM UMR1048, Toulouse, France
[e] Department of Histopathology, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, 31432 Toulouse, France
[f] INSERM U1046, Université Montpellier 1, Université Montpellier 2, Montpellier, France
[g] Centre de Microscopie Électronique Appliquée à la Biologie, Faculté de Médecine Rangueil, 31062 Toulouse, France
[h] CNRS, IPBS-UMR5089, F-31077 Toulouse, France
[i] Institute of Life Sciences, Université Catholique de Louvain, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.
[j] Department of Cellular Biology and Morphology, Université de Lausanne, Institut de Physique des Systèmes Biologiques, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland
[k] Department of Clinical Pharmacology, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, F-31432 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 24 March 2014
Received in revised form 7 May 2014
Accepted 8 May 2014
Available online 17 May 2014

Keywords:
Cardiomyocytes
Atomic Force Microscopy
Lateral membrane
Heart failure
Subsarcolemmal mitochondria
Interfibrillar mitochondria

ABSTRACT

Loss of T-tubules (TT), sarcolemmal invaginations of cardiomyocytes (CMs), was recently identified as a general heart failure (HF) hallmark. However, whether TT per se or the overall sarcolemma is altered during HF process is still unknown. In this study, we directly examined sarcolemmal surface topography and physical properties using Atomic Force Microscopy (AFM) in living CMs from healthy and failing mice hearts. We confirmed the presence of highly organized crests and hollows along myofilaments in isolated healthy CMs. Sarcolemma topography was tightly correlated with elasticity, with crests stiffer than hollows and related to the presence of few packed subsarcolemmal mitochondria (SSM) as evidenced by electron microscopy. Three days after myocardial infarction (MI), CMs already exhibit an overall sarcolemma disorganization with general loss of crests topography thus becoming smooth and correlating with a decreased elasticity while interfibrillar mitochondria (IFM), myofilaments alignment and TT network were unaltered. End-stage post-ischemic condition (15 days post-MI) exacerbates overall sarcolemma disorganization with, in addition to general loss of crest/hollow periodicity, a significant increase of cell surface stiffness. Strikingly, electron microscopy revealed the total depletion of SSM while some IFM heaps could be visualized beneath the membrane. Accordingly, mitochondrial Ca^{2+} studies showed a heterogeneous pattern between SSM and IFM in healthy CMs which disappeared in HF. In vitro, formamide-induced sarcolemmal stress on healthy CMs phenocopied post-ischemic kinetics abnormalities and revealed initial SSM death and crest/hollow disorganization followed by IFM later disarray which moved toward the cell surface and structured heaps correlating with TT loss. This study demonstrates that the loss of crest/hollow organization of CM surface in HF occurs early and precedes disruption of the TT network. It also highlights a general stiffness increased of the CM surface most likely related to atypical IFM heaps while SSM died during HF process. Overall, these results indicate that initial sarcolemmal stress leading to SSM death could underlie subsequent TT disarray and HF setting.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Correspondence to: E. Dague, LAAS-CNRS, 7 av du colonel Roche, 31000 Toulouse, France. Tel.: +33 5 61 33 78 41.
** Correspondence to: C. Gales, Inserm U1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, I2MC, 1, avenue Jean-Poulhès — BP84225- 31432 Toulouse Cedex 4, France. Tel.: +33 5 61 32 29 21; fax: +33 5 62 17 25 54.
E-mail addresses: edague@laas.fr (E. Dague), celine.gales@inserm.fr (C. Galés).
[1] The authors contributed equally to this work.

http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.05.006
0022-2828/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Most cardiovascular diseases are characterized by important changes in the extracellular matrix (ECM) components correlating with an increase of tissue stiffness contributing to the alteration of heart function [1–5]. However, recent works indicate that, besides ECM, individual cells within the organ tissue also undergo large morphological and elasticity modifications under pathological conditions [6–8] sometimes much earlier than functional dysfunctions.

To face a pathological myocardial stress, cardiomyocytes (CM), the contractile cell entity of the heart, change their morphology [6] but also their signaling [9] and electro-mechanical properties [10,11] to stabilize their contractile function. However, for still unknown reasons, they switch over time to a maladaptation state progressively leading to CM death and thus to the onset of heart failure (HF). Recently, remodeling and loss of T-tubules (TT) were identified as a general hallmark in a broad spectrum of late stage HF models [10,12–14] and was further characterized as an early and progressive event occurring during HF development [13]. This HF phenotype was also correlated with the modifications of the β-adrenergic cAMP signaling compartmentalization taking place at the CM surface [15]. More largely, alterations in the overall CM ionic functional surface were associated with failing CM phenotype [12,15]. Collectively, these data highlight the potential involvement of architectural alterations of the CM sarcolemmal membrane in the setting of HF. However, these CM alterations were generally observed at a final HF stage with most probably some alterations appearing consequently to other ones. Thus, because TT are longitudinal invaginations of the sarcolemma occurring at the Z-line, whether TT network per se or more specific sarcolemmal alterations subsequently leading to TT disarray occur during the onset of HF is still largely ignored.

In this study, we combined Atomic Force Microscopy (AFM) and electron microscopy to directly characterize both surface topography and nanomechanical properties of sarcolemma of living CMs from healthy or failing mice hearts.

2. Materials and methods

An expanded methods section is available in the Supplementary information.

2.1. Atomic Force Microscopy (AFM) and Force Measurement

Atomic Force Microscopy experiments were conducted in CM culture medium, at 37 °C under 5% CO_2 flow, using the perfusing cell and the heater system from the Bioscope Catalyst (Bruker, Santa Barbara, CA, USA). For all imaging modes (tapping, contact, Force volume), we used the same bare MLCT AFM probes which present a pyramidal tip made of Si_3N_4, with a curvature radius of 35°, manufactured by Bruker. AFM height images were recorded both in contact or tapping mode. In contact mode the tip is scanned over the surface while applying a constant force. A feedback loop adjusts the tip height in order to keep the force constant allowing deduction of height images. In tapping mode, the cantilever is oscillated at its resonance frequency and the tip is scanned over the surface while keeping a reduction of the cantilever amplitude constant. Once again, a feedback loop is in charge of keeping the amplitude decrease constant in order to deduce height images. The cantilever spring constants were systematically measured using the thermal tune method [16] and has been found to range from 10 to 30 pN/nm. The maximal force applied to the cell has been limited to 2 nN in order to preserve the membrane integrity. The force (F) versus displacement curves were converted into indentation (δ) curves and fitted to the Hertz model [17] (Eq. (1)) using Scanning Probe Imaging Processor (SPIP from Image metrology A/S Horsholm Denmark) and taking into account a spherical tip with a curvature radius of 20 nm (α). Finally, the Poisson ratio (ν) has been arbitrary fixed to 0.5.

$$F = \frac{4E\sqrt{R}}{3(1-\nu^2)}\delta^{3/2}. \quad (1)$$

Force curves were recorded in the force volume mode according to a matrix of 64 × 64 points on areas of 10 μm^2. For each force curve, Young's modulus is calculated and represented in false colors on elasticity maps. We also deduced height images from force volume measurements. The contact point of the force curves indeed indicates the sample height. It is therefore possible to deduce height images from a resoluted force volume experiment. AFM images and elasticity maps were analyzed using SPIP. We used OpenFovea (kindly provided by Charles Roduit and Sandor Kasas: http://www.freesbi.ch/openfovea) for the in depth analysis of the force curves.

2.2. Statistical analysis

Except when specified in the text or in legends, all data represent the mean ± S.E.M.. The number of independent experiments is indicated in the text or in the legend of the figures. Statistical significance of the data was assessed using unpaired 2-tailed Student's *t* test or ANOVA for repeated measures with Bonferroni or Tukey's post-hoc test. Non-quantitative data from TEM experiments were compared using Fisher's exact test. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

3. Results

3.1. Validation of cell surface topography imaging of living CMs using AFM modes

AFM studies were performed on non-beating living CMs isolated from adult young mice hearts as described in Supporting Material and Methods section and were conducted in three different imaging modes. To bypass CM surface deformation observed in contact mode (Fig. 1A), we used tapping mode making intermittent contacts with the CM surface (Fig. 1B) and allowing high resolution and direct

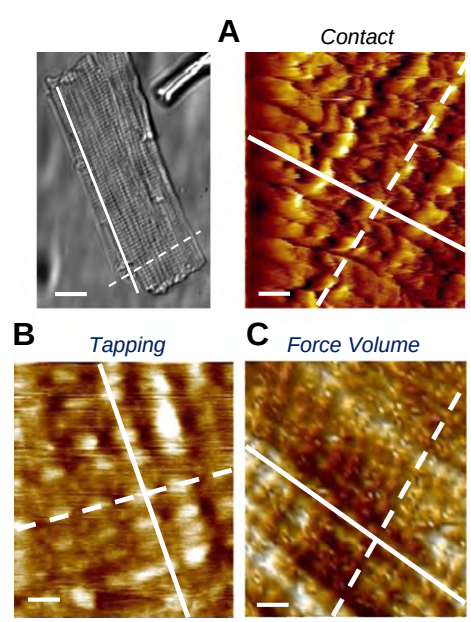


Fig. 1. Cell surface topography of living CMs obtained by AFM analysis. CMs were isolated from two-month old mice hearts. Representative images of living CMs surface were obtained using different AFM modes: contact (A), tapping (B) or force volume (C) as described in Material and Methods. Long and short CM axes are respectively depicted by the solid and dashed lines as indicated in the optical image. Bars: 2 μm.

imaging of cell surface topography where crests, hollows, myofilaments and also Z-line organization could be deduced from scanning electron microscopy (Fig. S1). Finally, CM cell surface was analyzed by force volume (FV) mode [18] measuring cell surface nanomechanical properties by basically recording force curves with spatial resolution. Moreover, relative heights can be simultaneously deduced by comparing the z position of the contact point between the tip and the cell surface of the CM, giving indirect access to cell surface imaging topography but with a lower resolution than in tapping mode (Fig. 1C). Altogether, these AFM analyses indicate that tapping and FV modes were better adapted for the exploration of the architecture of the cell surface of living CMs.

3.2. AFM–FV mode analysis of healthy CMs

Fig. 2A (upper) illustrates a 3D representation of an AFM-based FV image highlighting topography profile of the surface of CMs isolated from healthy mice hearts. Height profiles taken along the solid line (myofilaments groove) in the 3D images are presented in Fig. 2A (lower). They demonstrate the existence of a periodic succession of crests with an apparent average height of 73 ± 10 nm (15 CMs, 5 mice). The interval between two crests (~2 μm) is in agreement with the sarcomere length of quiescent CMs. These structures are present and can be easily identified in all analyzed CM surfaces. Both intra- and inter-CM dimensions of crest heights were highly variable (Table S1) in correlation with the timing of AFM imaging after CM isolation. This most probably relates to the spontaneous dedifferentiation of living CM after isolation which has already been associated with passive loss of sarcolemmal invaginations (detubulation) [19]. Such resolution for sarcolemmal structures of the CM has not been previously described in AFM observations most probably because of the cell fixation step before AFM procedure [20]. This resolution also gave access to subcellular structures such as myofilaments striations (Fig. 2A, upper). To get further insight into the biomechanical properties of the cell surface, we next measured the stiffness using similar AFM–FV mode. As described above, we extracted Young's modulus (*E*) from each 4096 registered force curve and plotted it on an elasticity map as shown in Fig. 2B (upper). The different values of *E* measured across the solid line are presented in Fig. 2B (lower). Again, the elasticity map of the CM surface exhibits periodicity but more interestingly, an outstanding correlation was evident between topography (Fig. 2A, upper) and elasticity maps (Fig. 2B, upper) of the CM surface. Structure/elasticity relationship of the CM surface was better emphasized in another but simplistic elastic map representation (Fig. 2C, upper) where pixels exhibiting *E* module higher than 18 kPa (median elastic module of the total elastic map) were depicted in red while the lower than 18 kPa were highlighted in

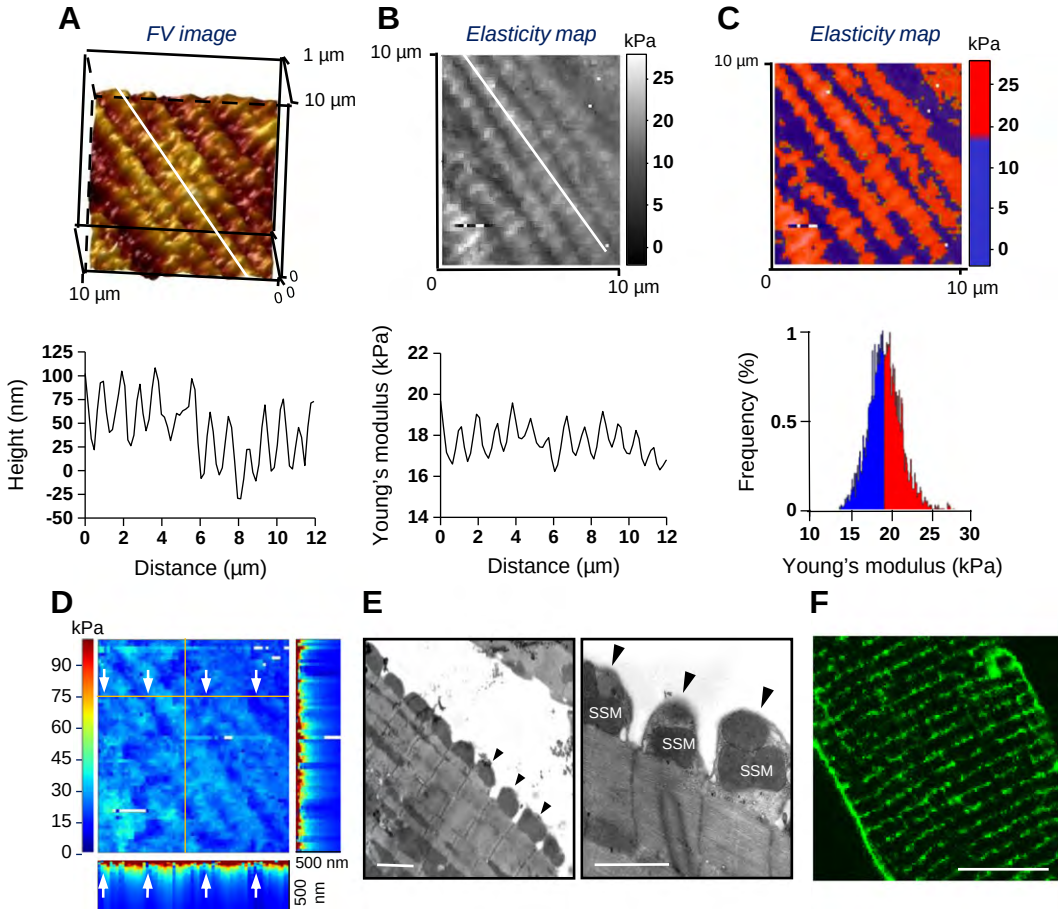


Fig. 2. Topography and biophysical properties of living CMs from healthy mice. Representative images of a 3D topography (A) and associated elasticity maps (B, C and D) of CM surface obtained by AFM force volume mode analysis. The height (A) and Young's modulus (B) variations along the solid line (CM long axis) are represented in the graphs below. (C) *Upper*: Young's modulus values ≤18 kPa (median of Young's modulus values measured on the overall CM surface) are depicted in blue while values ≥18 kPa are in red. *Lower*: Young's modulus distribution from the elasticity map image. (D) Tomographic analysis of elasticity map described in (B) showing in depth distribution of relative Young's modulus values from the CM surface. *Arrows*: sarcolemmal hollows (E) electron micrograph of isolated CM showing periodic organization of crests (*arrowheads*) at the cell surface filled with few subsarcolemmal mitochondria (SSM) and anchored at the level of each Z-line (Z) (*hollows*). Bars: 2 μm. (F) Di-8-ANEPPS fluorescent staining for T-tubules visualization in isolated CMs. Bars: 10 μm.

blue (Fig. 2C, lower). Indeed, whereas crests demonstrated Young's modulus values ranging from 18 to 25 kPa (~2048 force curves) (Fig. 2C, lower), hollows were less elastic and exhibited lower Young's modulus values ranging from 10 to 18 kPa (Fig. 2C, upper). These mechanical properties were highly reproducible among different CMs from independent mice with Young's modulus median average of 16.7 ± 7.1 kPa (Table 1, controls).

To get further insight into the structure/elasticity correlation of the living CM surface, we performed stiffness tomography analysis of FV curves, allowing in depth quantification of the elasticity module as recently described [21]. In this analysis, the indentation curve was split into 50 nm segments. Each segment was then fitted to the Hertz model, giving access to in depth elasticity analysis. When applied to the living CM, this analysis revealed periodic stiff and soft cell surfaces, correlating with crests and hollow structures as previously shown in Fig. 2B. Interestingly, each crest was clearly stiffer in depth when compared to hollows (Fig. 2D), highly suggesting that the stiffness of the probed membrane area is likely influenced by the accumulation of structures lying in the cytoplasm in close proximity of the sarcolemma.

Physical properties and particularly cell elasticity of a cell surface generally correlate with intracellular components [22]. If hollow structures observed in AFM at the CM surface are most likely attributable to sarcolemma anchorage to the Z-lines, the detection of stiff crests is more intriguing. To deal with the crest structure–elasticity relationship in depth, CMs were isolated and further subjected to Transmission Electron Microscopy (TEM) procedure to access to the subsarcolemmal ultrastructure. Observations of CM transversal sections revealed that each crest was filled by few (1 to 3) round shaped subsarcolemmal mitochondria (SSM) (Fig. 2E) clearly contrasting with large clusters of more elongated interfibrillar mitochondria (IFM). The presence of SSM highly organized in crests below the plasma membrane most probably accounts for the specific in depth weaker elasticity of these structures. Each crest was tightly organized above one sarcomere unit (~2 μm long) and delimited by membrane anchorage taking place at each Z-lines were supposedly TT longitudinal invaginations can sometimes initiate. Microscopic observation among different CM purification indicated that ~87% exhibited SSM with periodic organization at the cell surface while only 6.6% with subsarcolemmal mitochondria heaps could be reported (Table 1, controls) without modifications of IFM alignment along myofibrils and Z-lines (Fig. 2E and Fig. S2, control). In agreement with correct myofibrillar apparatus organization in control CMs, TT network is also closely aligned along Z-line structures as shown by di-8-ANEPPS fluorescent staining (Fig. 2F).

3.3. Surface topography and elasticity of CMs undergo deep alterations in 15 days post-myocardial infarction (MI) heart failure

To better understand CM alterations in HF at the level of the sarcolemma, we further examined the consequence of MI on the topography and the elasticity properties of the CM cell surface. Fifteen days after MI, CMs from failing mice were isolated and immediately analyzed in real time by AFM–FV mode as described in Fig. 2. In post-MI conditions, the landscape of the sarcolemma from failing CMs was totally disorganized with a general loss of crest/hollow structures and organization, but also lack of myofilaments groove in agreement with their disarray as classically observed in failing CMs (Fig. 3A). Moreover, the elasticity map did not display anymore correlation with the topography (Fig. 3A, B) and the overall cell surface stiffness of CMs increased considerably and heterogeneously with maximal *E* values about two-fold those measured in healthy conditions (40 kPa versus 20–25 kPa; Fig. 3C). Median Young's modulus *E* of the total elasticity map increased up to 30 kPa (10 CMs, 3 mice) and *E* values distributed around this median oscillated between 20 and 40 kPa when compared to a distribution of 10–25 kPa in healthy CMs (Fig. 2C). The phenotype of 15 days post-MI CMs is a general feature of all isolated cells since Young's modulus median average of 41.6 ± 18.8 kPa (Table 1, 15d post-MI, CI 95%: 10.3–61.6, 4 CMs/2 mice). The increase of stiffness at the cell surface of failing CMs also referred in depth as shown by tomography analysis (Fig. 3D). It is noteworthy that the surface of failing CMs was extremely sensitive to the tip contact when used with the same applying force constant to that in control CMs, with often ripping of the membrane and thus highly preventing the analysis of a large number of CMs. These observations most likely reinforced the notion that failing CMs most likely underwent deep modifications of their sarcolemmal membranes.

Unexpectedly, the heterogeneous stiffness increase of the CM surface was correlated with a dramatic disorganization of SSM and IFM as detected by TEM. Indeed, confirming AFM recordings, periodic crest/hollow structures were absent from sarcolemmal surface and some area of the membrane exhibited total absence of SSM (Fig. 3E, left and Fig. S2) which could, in part, explain the high fragility of the failing CM membrane. The presence of subsarcolemmal mitophagy/autophagy components agreed with the clearance and loss of SSM in post-MI CMs (Fig. S2). By contrast, some mitochondria tend to accumulate as large heaps beneath the membrane (Fig. 3E, right and Fig. S3), most likely correlating with the increase in surface/depth stiffness of the membrane measured in AFM. In failing CMs, IFM were also highly disorganized

Table 1
Myocardial infarction (3 and 15 days after infarction) and formamide (50 and 750 mM) induce similar alterations in mitochondria and membrane elasticity of cardiomyocytes. Interfibrillar mitochondria accumulation (Heaps) and subsarcolemmal mitochondria (SSM) death were quantified in purified cardiomyocytes using Transmission electron microscopy (TEM) and data are expressed as number (%) of cells exhibiting heaps or with total or partial SSM death. Membrane elasticity expressed as Young's modulus (mean ± SD with 95% confidence interval (95%CI)) was calculated using atomic force microscopy (AFM) and force-volume mode on purified living cardiomyocytes as described in Materials & Methods. Statistical analysis was performed using Fisher's exact test for TEM data and 1-way ANOVA with Tukey's post-hoc test for AFM data. ns, non significant; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

		Controls	Myocardial infarction		Formamide		
TEM	Cells/mice (n)	15/7	3d post-MI 19/5	15d post-MI 53/6	Cells/mice (n)	0.05 M 38/5	0.75 M 25/5
Heaps	Positive cells (%)	6.6	5.3	45.3	Positive cells (%)	5.3	64.0
	Controls vs 3d post-MI		ns		Controls vs 50 mM	ns	
	Controls vs 15d post-MI		**		Controls vs 750 mM	***	
	3d vs 15 d post-MI		**		50 mM vs 750 mM	***	
SSM partial or total death	Positive cells (%)	13.3	94.7	98.1	Positive cells (%)	100	100
	Controls vs 3d post-MI		***		Controls vs 50 mM	***	
	Controls vs 15d post-MI		***		Controls vs 750 mM	***	
	3d vs 15d post-MI		ns		50 mM vs 750 mM	ns	
AFM	Cells/mice (n)	12/4	9/3	4/2	Cells/mice (n)	5/2	6/2
Young's Modulus (kPa)	mean ± SD	16.7 ± 7.1	13.2 ± 5.2	41.6 ± 18.8	mean ± SD	13.0 ± 3.5	47.9 ± 10.8
	95% CI	12.1–21.1	9.2–17.1	10.3–61.6	95% CI	8.6–17.4	36.6–59.3
	Controls vs 3d post-MI		ns		Controls vs 3d post-MI	ns	
	Controls vs 15d post-MI		**		Controls vs 15d post-MI	**	
	3d vs 15d post-MI		**		3d vs 15d post-MI	**	

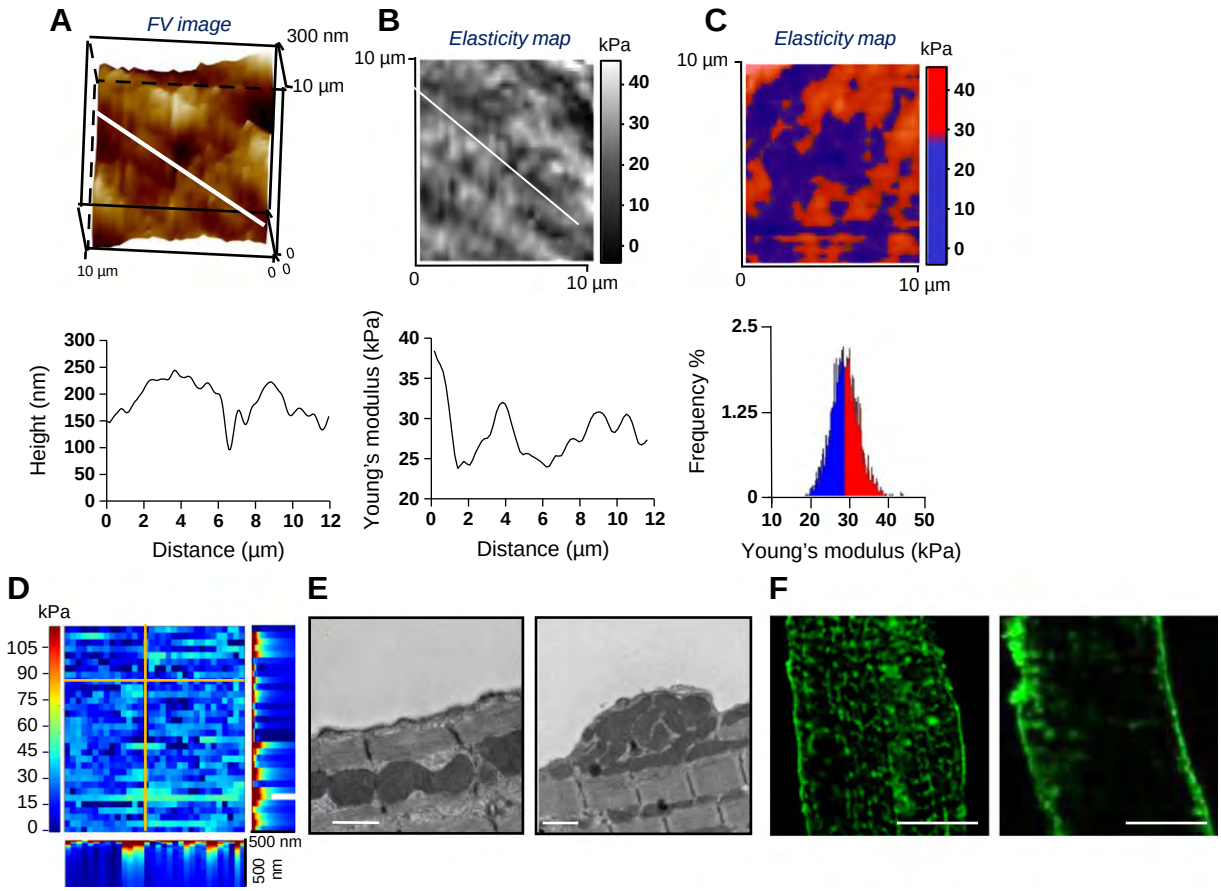


Fig. 3. Topography and biophysical properties of living CMs from 15 days post-MI failing mice. Representative images of a 3D topography (A) and associated elasticity maps (B, C and D) of CM surface obtained by AFM force volume mode analysis. The heights (A) and Young's modulus (B) variations along the solid line (CM long axis) are represented in the graphs below. (C) *Upper*: Young's modulus values ≤28 kPa (median value of Young's modulus values measured on the overall CM surface) are depicted in blue while values ≥28 kPa in red. *Lower*: Young's modulus distribution from the elasticity map image. (D) Tomographic analysis of elasticity map described in (B) showing in depth distribution of relative Young's modulus values from the CM surface. (E) Electron micrograph of isolated CM showing complete disorganization of crests/hollows of the cell surface, with some area exhibiting loss of SSM (*left*) or heaps of mitochondria (*right*). Bars: 1 µm. (F) Di-8-ANEPPS fluorescent staining for T-tubules visualization in isolated CMs. Bars: 10 µm.

around myofibrils (Fig. S3) as we also noticed dramatic TT loss as already reported for end-stage HF [11] (Fig. 3F). Now, whether mitochondria clusters beneath the membrane arise from SSM or IFM aggregation was unclear. Recently, connexin-43 was identified as a specific marker for SSM [23] and underlying particular function to these mitochondria [24,25]. Also, to discriminate between SSM and IFM populations, we performed connexin-43 TEM/immunogold labeling. As expected, in control CMs, connexin-43 positive immunolabeling was evident in inner membranes of SSM (Fig. 4A, upper, CM leading edge mitochondria) as previously described [23], while IFM did not exhibit any specific staining (Fig. 4A, IFM). However, in failing condition, mitochondria clusters beneath the membrane did not show any connexin-43 labeling, most likely suggesting that they are from IFM origin. However, we cannot totally exclude SSM which could have loss connexin-43 in failing conditions. In agreement with the alterations of architectural organization of both SSM and IFM beneath the membrane in post-MI condition, we also noticed specific modifications of mitochondrial Ca^{2+} uptake. Indeed, measurement of mitochondrial Ca^{2+} uptake with Rhod2 under whole cell patch-clamp during a ventricular action potential (AP) in isolated healthy CMs, as previously described [26,27], revealed a bell-shaped curve and that mitochondria localized on the edges, most likely SSM, were unable to take up Ca^{2+} (Fig. 4B). Specificity of mitochondrial Ca^{2+} uptake with Rhod2 was reinforced by simultaneous measurement of cytosolic Ca^{2+} transients with Fluo-4 in healthy CMs showing that heterogeneous mitochondrial transients along the short axis of the cell is not related to peak cytosolic Ca^{2+} transients (Fig. S4). By opposition, mitochondria localized inside the cell dynamically take up Ca^{2+} during AP, indicating that IFM are more prone to Ca^{2+} uptake during AP, presumably due to their proximity with TT and SR Ca^{2+} release site compared to SSM localized in sarcolemmal crests. Strikingly, in post-MI CMs, a shift of the mitochondrial Ca^{2+} movements was observed with significant Ca^{2+} transient increases during AP at the leading edges and conversely a significantly lower Ca^{2+} uptake inside the cell (Fig. 4B). Thus, although, as expected, the post-MI AP duration was increased when compared to control CM (Fig. S5), peak mitochondrial Ca^{2+} transients were significantly decreased inside the CM while they increased at the edges (Fig. 4B). Again, while these results could reflect a change of SSM and IFM Ca^{2+} receptivity in post-MI CMs, it could also be indicative of a shift in the motility of both mitochondrial populations as suggested by TEM analysis (Fig. S2).

3.4. Surface topography and elasticity of CMs already undergo mild alterations in 3 days post-myocardial infarction (MI) heart failure

Although clearly showing alterations of the CM membrane nanomechanical/topography properties correlating with specific SSM dynamics in end-stage HF post-MI (15 days), our results only provide a snapshot of a terminal state of failing CMs and did not inform about the cause/

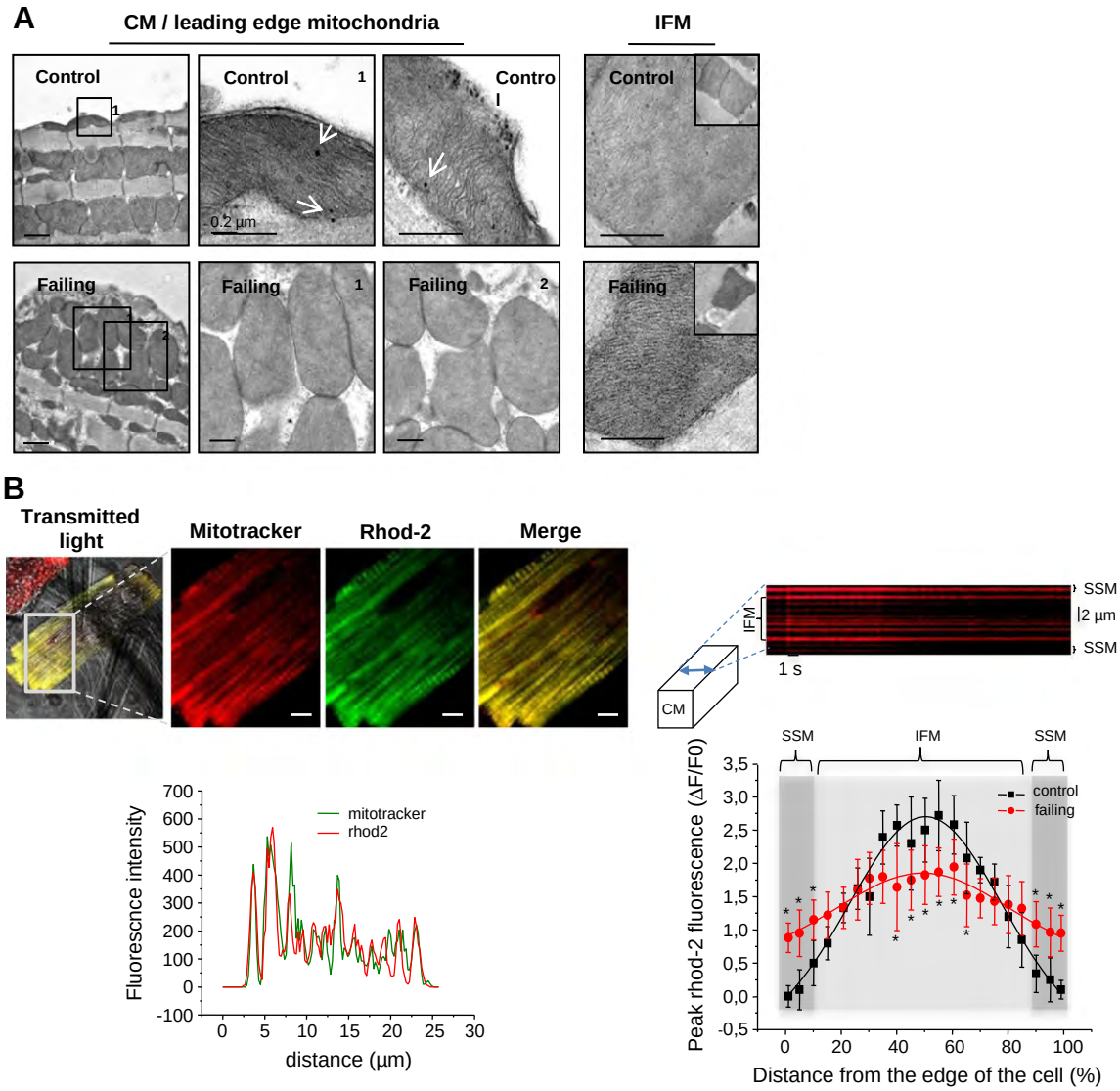


Fig. 4. Mitochondria profiling in CMs from non-failing and 15 days post-MI failing mice. (A) Representative electron micrographs of connexin-43 immunogold labeling of CMs from non-failing (control) and failing mice (failing). (B) *Left*: representative images of confocal microscopy illustrating a living CM stained with fluorescent Rhod2 (red) and mitotracker (green) in isolated CMs, showing maximal colocalization (merge). *Graph below*: The curves represent the fluorescence intensity of both probes along the scan line indicated by the arrow on the merge image. Line scan acquistion was performed along the short axis of the cell close to the patch pipette. *Right*: Mitochondrial rhod-2 signals were measured by confocal microscopy along the short axis on patch clamped non failing (black, 15 CMs/5 mice) or failing (red, 8 CMs/3 mice) CMs (*upper panel*) as indicated Peak rhod-2 fluorescence was estimated between the baseline fluorescence (F0) and the maximal fluorescence values (F) where ΔF is F-F0. Rhod-2 signals (mean ± SD) were measured from the edges to the center of each CM. To allow comparison between cells, the width was normalized to 100% from the edge of each CM. Curves were compared using ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test, $^{*}P < 0.05$. Bars: 1 µm (A, CM leading edge mitochondria, left panels), 0.5 µm (A, CM leading edge mitochondria, middle, right panels; IFM).

consequence of these events. Also, to better answer this question, exactly same experiments were performed but at an early time point (early HF), 3 days, following MI. Compared to control (Fig. 2), CMs isolated from mice 3 days after MI already displayed cell surface topography abnormalities since it became largely smooth (Fig. 5A) correlating with a general reduction of cell surface elasticity (Fig. 5B and C) (Table 1, 3d post-MI, Young's modulus median average of 13.2 ± 5.02 kPa) and also cell depth elasticity (Fig. 5D). Smooth cell surface in living CMs also correlated with ultrastructural microscopy (Fig. 5E and Table 1) highlighting almost complete loss of SSM (94.7%) while only few subsarcolemmal mitochondria heaps (5.3%) could be distinguished. These mitochondria heaps most probably refer to some SSM gathering due to the rupture of crest/hollow structures and given that, at this stage, contractile apparatus, IFM alignment (Fig. 5E, right panel) and also T-tubules network (Fig. 5 F) were still intact. It is intriguing and noteworthy that, despite infarcted area of the heart was local, we couldn't visualize any normal CMs (in AFM or MET) after 3 days post-MI following purification, thus suggesting that infarct could impact CMs at distance in the whole heart tissue.

All together, these results most likely indicate that after MI, surviving CMs throughout the heart undergo rapid and specific remodeling of their cell surface linked to SSM death while over time structural abnormalities propagate in the whole cell with the disruption of the intracellular contractile apparatus and T-tubule network associated with large IFM disorganization migrating and accumulating at CM surface. More importantly, they show for the first time that structural nanometric defects of the sarcolemma at the cell surface precede T-tubules disarray observed in all HF models, thus indicating that T-tubule modifications is an indirect consequence and not the origin of HF at least in this post-ischemic model.

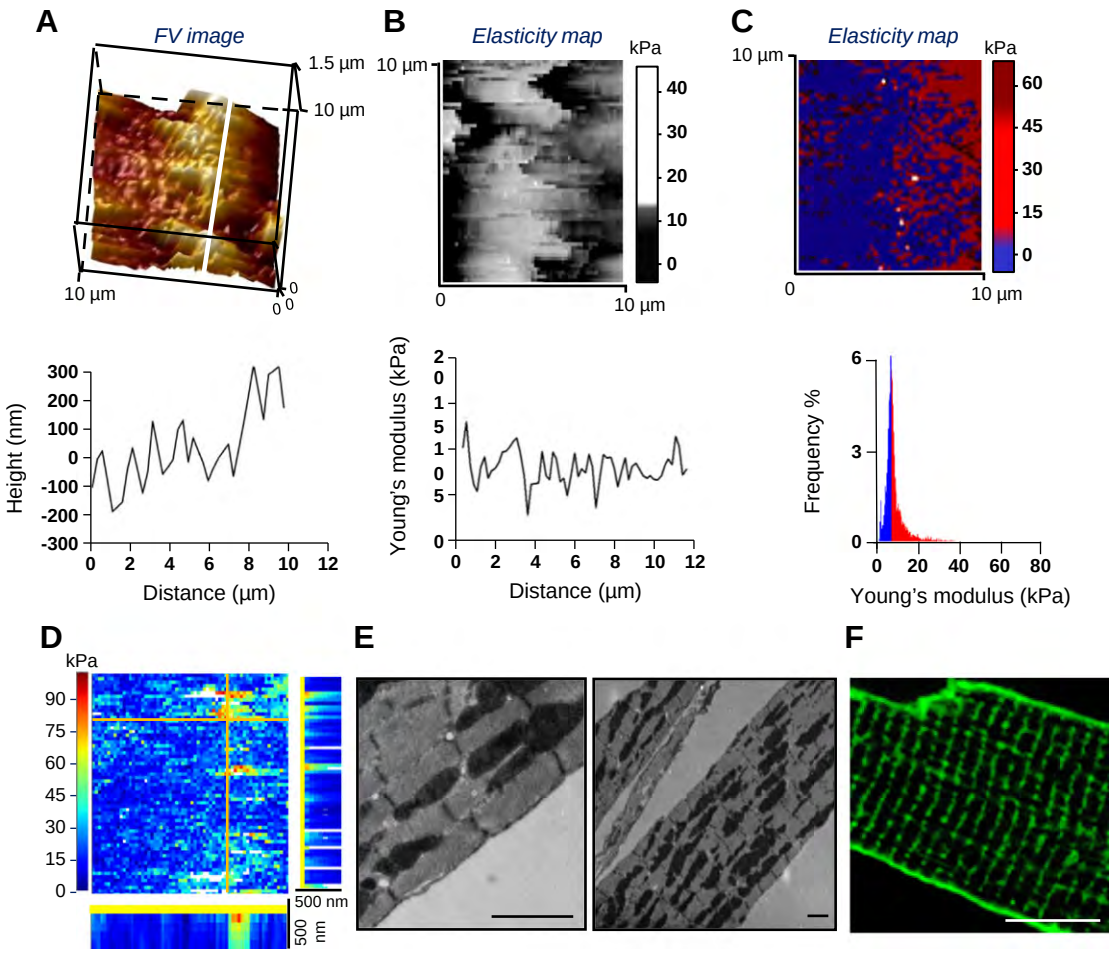


Fig. 5. Topography and biophysical properties of living CMs from 3 days post-MI failing mice. Representative images of a 3D topography (A) and associated elasticity maps (B, C and D) of CM surface obtained by AFM force volume mode analysis. The heights (A) and Young's modulus (B) variations along the solid line (CM long axis) are represented in the graphs below. (C) *Upper*: Young's modulus values ≤28 kPa (median value of Young's modulus values measured on the overall CM surface) are depicted in blue while values ≥28 kPa in red. *Lower*: Young's modulus distribution from the elasticity map image. (D) Tomographic analysis of elasticity map described in (B) showing in depth distribution of relative Young's modulus values from the CM surface. (E) Electron micrograph of isolated CM showing complete disorganization of crests/hollows of the cell surface, with some area exhibiting loss of SSM (*left*) or heaps of mitochondria (*right*). Bars: 1 µm. (F) Di-8-ANEPPS fluorescent staining for T-tubules visualization in isolated CMs. Bars: 10 µm.

3.5. Sarcolemma stress leads to SSM death and subsarcolemmal IFM clustering

Recently, early loss of T-tubules was identified as a common hallmark of HF development [10,12–14]. As failing CMs exhibit loss of crests and hollows at the sarcolemma which plays, at least in part, a key role in TT invaginations, we questioned about sarcolemma structure and mitochondrial dynamics in CMs subjected to progressive in cellulo formamide-induced detubulation as previously described [28]. Isolated healthy CMs were exposed to different concentrations of formamide, thus promoting progressive sarcolemma osmotic shock before the onset of TT network destruction. Following 0.05 M formamide treatment, isolated CM cell surface exhibited a mixed topography with some flat area exhibiting loss of normal round shape and dramatic size decrease of SSM (sometimes they totally disappeared from the surface) while other area of the membrane preserved the crest/hole periodicity as in controls (Fig. 6A; 0.05 M and Fig. S6). This is further supported by AFM measurements demonstrating both topography and elasticity heterogeneity with the loss of SSM generally correlating with Young's modulus decrease reminiscing phenotype of 3 days post-MI (Fig. 6C and Table 1, Young's modulus median average of 13.0 ± 3.5 kPa). At this stage no modification of IFM or Z-lines-adjacent T-tubules (Fig. S7) was noticed as corroborated by di-8-ANEPPS fluorescent staining (Fig. 6B, 0.05 M). Thus, at this concentration, formamide most probably primarily impacts the sarcolemma anchorage at the Z-line. The singular trophic nature of SSM was not restricted to chemically-induced sarcolemmal modifications since similar pattern was observed during the postnatal CM maturation period. Indeed, at postnatal day 5, neonatal CMs did not present well-defined cell surface crests but already exhibited large size IFM with very small SSM beneath the sarcolemma (Fig. S8, P5), highly suggesting that SSM and IFM provide distinct functions to the CM. SSM size dramatically increased during CM maturation to finally equal that of IFM at P60 (Fig. S8). At this time, SSM were packaged in well-organized sarcolemmal crests. Strikingly, when increasing the concentration of formamide to 0.25 M, the CM cell surface was characterized now by a dramatic loss of SSM and a general smooth membrane, with some residual but atrophic SSM (Fig. 6A, 0.25 M and Fig. S6). At this formamide concentration, IFM initiated irregular shape and organization and some dilation of Z-lines adjacent TT could also be visualized (Fig. S7) although di-8-ANEPPS staining was still preserved (Fig. 6B, 0.25 M) indicating preserved TT network organization. CMs treated by 0.75 M formamide phenocopied 15 days failing post-MI state (Fig. 3E) with clearly visible Z-line misalignment and huge spatial disorganization of IFM (Fig. 6A, 0.75 M and Fig. S7) and also general cell surface stiffness increase (Fig. 6C, 0.75 M and Table 1, Young's modulus median average of 47.9 ± 10.8 kPa). Interestingly and as observed in end-stage failing CMs (15 days post-MI), some IFM large heaps could be now found beneath

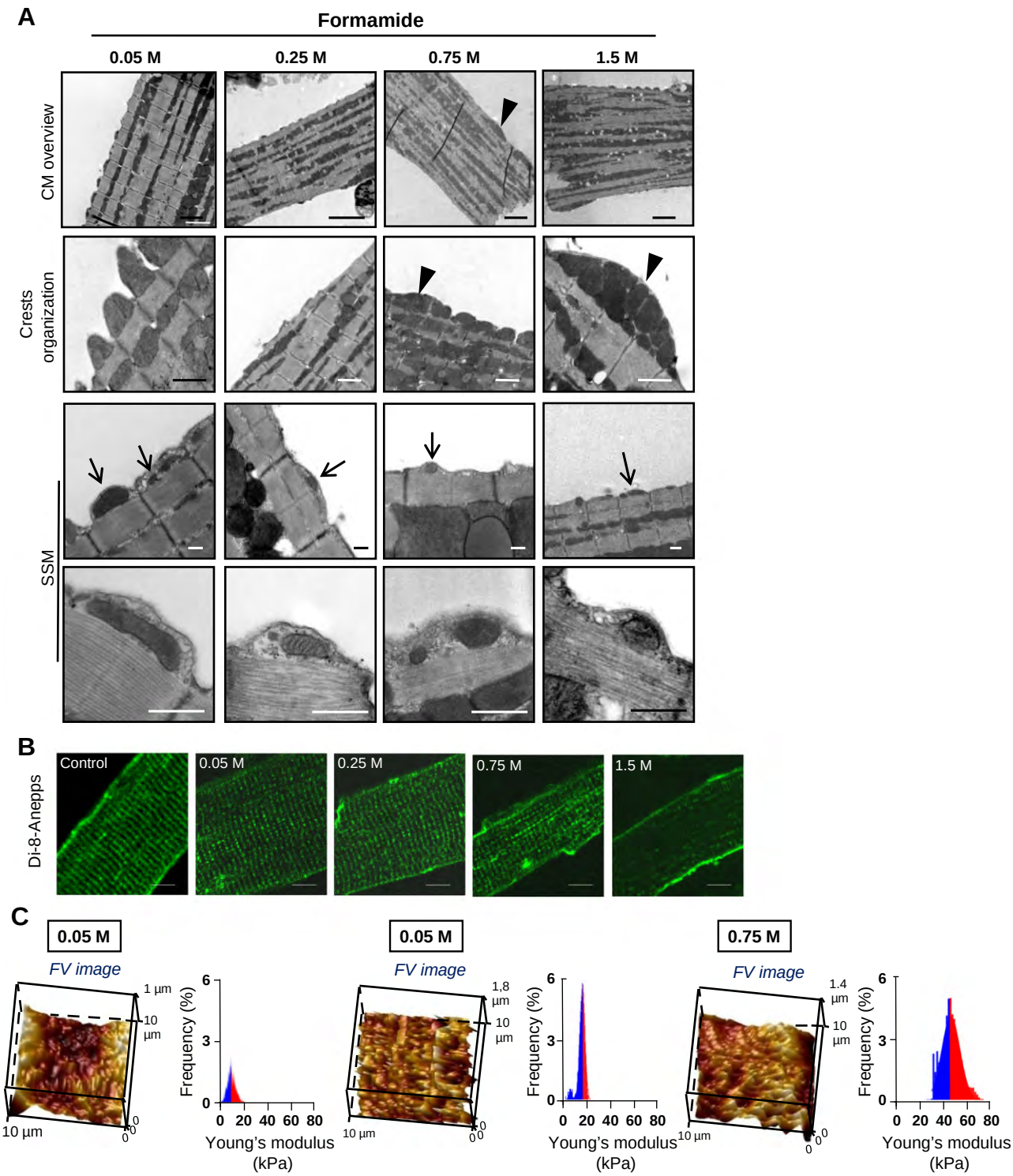


Fig. 6. Sarcolemmal stress directly impacts SSM and IFM architectural organization. Isolated CMs from healthy mice were subjected to increasing concentrations of formamide (0.05 M, 0.25 M, 0.75 M and 1.5 M) and proceeded to transmission electron microscopy observation (A) or Di-8-ANEPPS fluorescent staining for T-tubules visualization (B). In (A), note the dramatic loss of SSM (*arrows*) at lower doses of formamide (0.05 M) without modification of IFM while IFM heaps (*arrow heads*) occur only at higher formamide concentrations (0.75, 1.5 M). (B) Significant loss of T-tubules labeling is only visible at a 1.5 M formamide. Bars: 5 µm (A, CM overview), 1.5 µm (A, Crests organization), 0.5 µm (A, SSM), 6 µm (B). (C) Representative images of a 3D topography (*left panels*) and associated Young's modulus distribution (*right panels*) from the elasticity map image of living CM surface subjected to 0.05 M or 0.75 M formamide and obtained by AFM force volume mode analysis.

the sarcolemma, thus suggesting they moved toward the surface (Fig. 6A, 0.75 M and Figs. S6 and S7). IFM migration from the interior to the cell surface was exacerbated when using 1.5 M formamide (Fig. 6A, 1.5 M and Figs. S6 and S7) with IFM accumulation creating thick packed bumps, even if in this condition, myofilaments and Z-lines were highly disrupted while TT were depleted (Fig. 6B, 1.5 M and Fig. S7). Interestingly, when exposed to increasing formamide concentrations, SSM progressively lost their specific connexin-43 labeling highly correlating with their atrophy degree (Fig. S9). By contrast, clusters of large size subsarcolemmal mitochondria visualized at high

formamide concentrations were all connexin-43 negative (Fig. S9), thus further supporting IFM traffic from the interior to the subsarcolemmal cell surface.

Overall, these results highly suggest that the modifications of sarcolemmal membrane of CMs arising from formamide-based osmotic stress most likely occurred primarily, before the loss of TT network, and accounted for the dynamic shift of SSM and IFM mitochondria populations that also occurred in post-MI HF (Fig. 7). It follows that the HF trademark, i.e. TT disorganization, occurs only subsequently to more specific and early architectural alterations of the CM sarcolemma.

4. Discussion

Several recent data reported morphological changes of the CM surface at the nanoscale level in living and diseased CMs [12,15,19]. However, until now CM surface imaging has been limited to the use of Scanning Ion Conductance Microscopy (SICM) in which topographical information results from indirect and complex interplay between ion concentration and topography [29]. This is especially important for cells exhibiting ionic heterogeneity at cell surface like CMs. By opposition, AFM is not affected by ion concentrations and is directly related to the use of a sharp probe interacting directly with the sample for profiling surface [30]. Moreover, the specific advantage of AFM over SICM relies on the possibility to measure biomechanical properties of the sample and to probe forces in the pN range. We took advantage of this opportunity to correlate elasticity maps to topography maps of living CMs and showed that AFM–FV mode could be a valuable tool to evaluate both morphological or elasticity modifications of living CM cell surface. It will be interesting in the future to use the AFM–FV mode to assess topographical/biophysical parameters of CM surface in different HF models but also to screen the effects of drugs shown to favor or conversely improve HF defects. Moreover, the validation of AFM in living CM paves the way to use functionalized AFM tips to measure, to localize and map specific proteins at the cell surface and follow their organization in physio- and physio-pathological conditions [31].

Neither high resolution of crest/hollow topography nor elasticity of these specific structures of the living CM surface was ever reported using AFM. Only one study reported an increase in stiffness of left ventricle tissue sections during CM development and in post-MI [32]. Another one, performed in living CMs but in uncontrolled CO_2 atmosphere conditions, measured similar stiffness increase during aging but did not provide topographic details [33]. In agreement with these studies, we found that CMs underwent dramatic and general increase in stiffness in end-stage failing post-MI. Interestingly, MI is associated with an important remodeling of the CM surface topography with a general loss of both crests and hollows, in agreement with loss of TT network reported in several HF models [12,15]. The outstanding observation is the specific depletion of SSM beneath the crests in early post-MI model. Its correlation with crest structures loss questions about the origin of TT network disorganization playing a critical role in excitation/coupling of the CM and that is a common feature of failing CMs. Are the defects of SSM and associated sarcolemmal crests at the origin of TT disorganization in end-stage HF? Time course of abnormalities identified in post-MI using electron microscopy imaging and AFM experiments combined with di-8-ANEPPS labeling or dosage-dependant formamide-induced sarcolemmal stress most likely argued in favor of the first hypothesis since major structural alterations of sarcolemma and SSM occurred earlier before the extinction of TT staining. Thus, an initial sarcolemma stress could underlie the onset of post-MI HF. Another intriguing result of our study relies on the traffic of IFM from the interior to the subsarcolemmal CM surface in failing CMs. Indeed, in healthy CMs, IFM form large clusters highly stabilized around myofibrils where they establish close contacts with the ER to control Ca^{2+} uptake and contraction [34]. Although IFM disorganization in failing hearts was previously known [35], their presence at subsarcolemmal level is more intriguing and most likely suggests the disruption of ER connections in post-MI failing CMs. Given that these results were obtained in CMs surviving to ischemia, it will be thus interesting in the future to extend the study to other HF models to establish whether similar alterations of sarcolemma architecture and associated SSM/IFM shifts could be a general feature of HF.

Understanding molecular mechanisms accounting for SSM alterations in HF will represent an important task for the future HF research. One may wonder about the impact of SSM functional defects when compared to those reported previously in IFM. Several recent works in cardiac and skeletal muscles suggested that SSM and IFM are prone to different and independent modifications in pathological conditions [36–39]. However, to date, the works referring to SSM/IFM specializations still provided inconsistent results most likely due to technical difficulties to accurately purify these mitochondria populations individually. This study, based on an ultrastructural approach coupled to functional evaluation, provides clear evidence that SSM are prone to specific but different size modifications in physiological (maturation, SSM size increase) or pathophysiological situation (ischemia, SSM size decrease), most likely arguing for specific functions. Differential effect of endurance training on SSM and IFM size have already been described in skeletal muscle [40,41]. Indeed, SSM seem closely related to the CM sarcolemma since their size is extremely correlated with the presence of crests at the cell surface. The loss of CM crests during HF or conversely the acquisition of crests during physiological CM maturation associated respectively with loss or birth of SSM beneath the sarcolemma strongly supports this notion. Finally, Ca^{2+} uptake experiments also highly suggest that SSM and IFM harbor different responses which could be indicative of distinct function, even if these experiments related only, for the moment, to correlative conclusions based on electron microscopy observations. Recently, specific disruption of SSM localization/function was also reported in skeletal muscle from dystrophin-deficient mice [42].

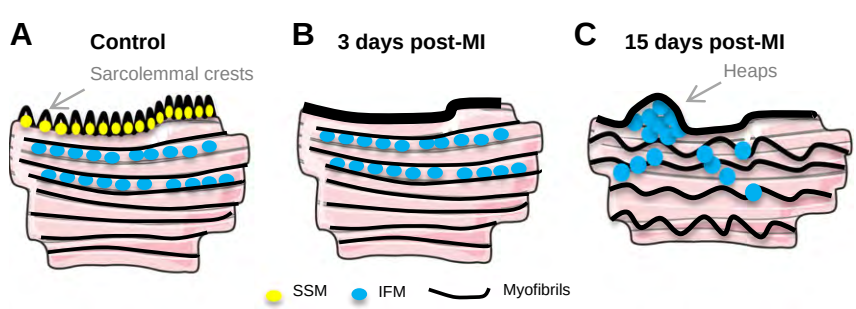


Fig. 7. Model depicting early and late mitochondrial shift occurring in CMs after MI. (A) In control CMs, SSM are regularly organized beneath the sarcolemma creating crests structure at the cell surface while IFM are aligned along myofibrils. (B) SSM are prone to early death following MI (3 days post-MI) without modifications of IFM and myofibrils. (C) In later post-MI stage (15 days post-MI), IFM delocalize from myofibrils and moved toward the cell surface, promoting the formation subsarcolemmal IFM heaps.

Collectively, these results highlight for the first time the depletion of CM cell crests and related SSM in early post-MI hearts and also consequent and later IFM cell surface trafficking in end-stage failing post-MI. It will be interesting in the future to investigate if similar structural modifications of the CM also apply for different HF origins. In the future, one challenging task will be to identify the molecular mechanisms underlying such mitochondrial shifts occurring in pathological CMs, thus opening a new research area in HF research.

Non-standard abbreviations and acronyms

AP	Action potential
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
AFM	Atomic force microscopy
CM	Cardiomyocyte
ECM	Extracellular matrix
FV	Force Volume
HF	Heart failure
IFM	Interfibrillar mitochondria
MI	Myocardial infarction
SICM	Scanning ion conductance microscopy
SR	Sarcoplasmic reticulum
SSM	Subsarcolemmal mitochondria
TEM	Transmission electron microscopy
TT	T tubules.

Author contributions

ED, GG & VL performed most experiments, analyzed and interpreted data. JF, JT and AL performed and analyzed calcium analysis. CM contributed to Di-Anepps staining and also adult cardiomyocytes purification. LC & DA performed AFM tomography analysis. SK contributed to the access to new analytical tools (OpenFovea). CS performed AFM experiments. CH performed cardiac ischemia. BH performed mice echocardiography. CGF & BP analyzed electron microscopy images. AP & JMS assisted with data processing and analysis and with manuscript preparation. CG designed and managed the overall project, analyzed and interpreted data and cowrote the manuscript with ED.

Conflict of interest statement

The authors declared that no conflict of interest exists.

Acknowledgments

We thank Dr. Charles Roduit for tomography analysis support. This work was supported by grants from the young scientist program ANR-11-JSV5-001-01 (AFMYST project) of the Agence Nationale pour la Recherche (ANR) to ED from fondation Recherche Médicale (ING20140129094) and from the Coup d'élan pour la recherche française 2013, Bettencourt-Schueller foundation to CG.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.05.006.

Disclosures

None.

References

[1] Creemers EE, Pinto YM. Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart. Cardiovasc Res 2011;89:265–72.
[2] Heymans S, Schroen B, Vermeersch P, Milting H, Gao F, Kassner A, et al. Increased cardiac expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 is related to cardiac fibrosis and dysfunction in the chronic pressure-overloaded human heart. Circulation 2005;112:1136–44.
[3] Marti CN, Gheorghiade M, Kalogeropoulos AP, Georgiopoulou VV, Quyyumi AA, Butler J. Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure. J Am Coll Cardiol 2012;60:1455–69.
[4] Segura AM, Frazier OH, Buja LM. Fibrosis and heart failure. Heart Fail Rev 2014;19(2):173–5.
[5] Weber KT, Brilla CG, Janicki JS. Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. Cardiovasc Res 1993;27:341–8.
[6] Cross SE, Jin YS, Rao J, Gimzewski JK. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. Nat Nanotechnol 2007;2:780–3.
[7] Qiu H, Zhu Y, Sun Z, Trzeciakowski JP, Gansner M, Depre C, et al. Short communication: vascular smooth muscle cell stiffness as a mechanism for increased aortic stiffness with aging. Circ Res 2010;107:615–9.
[8] Stolz M, Gottardi R, Raiteri R, Miot S, Martin I, Imer R, et al. Early detection of aging cartilage and osteoarthritis in mice and patient samples using atomic force microscopy. Nat Nanotechnol 2009;4:186–92.
[9] Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. Nat Rev Mol Cell Biol 2006;7:589–600.
[10] Ibrahim M, Gorelik J, Yacoub MH, Terracciano CM. The structure and function of cardiac t-tubules in health and disease. Proc Biol Sci 2011;278:2714–23.
[11] Louch WE, Sejersted OM, Swift F. There goes the neighborhood: pathological alterations in T-tubule morphology and consequences for cardiomyocyte Ca2+ handling. J Biomed Biotechnol 2010;2010:503906.
[12] Lyon AR, MacLeod KT, Zhang Y, Garcia E, Kanda GK, Lab MJ, et al. Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:6854–9.
[13] Wagner E, Lauterbach MA, Kohl T, Westphal V, Williams GS, Steinbrecher JH, et al. Stimulated emission depletion live-cell super-resolution imaging shows proliferative remodeling of T-tubule membrane structures after myocardial infarction. Circ Res 2012;111:402–14.
[14] Wei S, Guo A, Chen B, Kutschke W, Xie YP, Zimmerman K, et al. T-tubule remodeling during transition from hypertrophy to heart failure. Circ Res 2010;107:520–31.
[15] Nikolaev VO, Moshkov A, Lyon AR, Miragoli M, Novak P, Paur H, et al. Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. Science 2010;327:1653–7.
[16] Emerson RJt, Camesano TA. On the importance of precise calibration techniques for an atomic force microscope. Ultramicroscopy 2006;106:413–22.
[17] Hertz H. Ueber die Berührung fester elastischer Körper. J Reine Angew Math 1881;92:156–71.
[18] Gaboriaud F, Parcha BS, Gee ML, Holden JA, Strugnell RA. Spatially resolved force spectroscopy of bacterial surfaces using force-volume imaging. Colloids Surf B Biointerfaces 2008;62:206–13.
[19] Gorelik J, Yang LQ, Zhang Y, Lab M, Korchev Y, Harding SE. A novel Z-groove index characterizing myocardial surface structure. Cardiovasc Res 2006;72:422–9.
[20] Davis JJ, Hill HA, Powell T. High resolution scanning force microscopy of cardiac myocytes. Cell Biol Int 2001;25:1271–7.
[21] Roduit C, Saha B, Alonso-Sarduy L, Volterra A, Dietler G, Kasas S. OpenFovea: open-source AFM data processing software. Nat Methods 2012;9:774–5.
[22] Guo Q, Xia Y, Sandig M, Yang J. Characterization of cell elasticity correlated with cell morphology by atomic force microscope. J Biomech 2012;45:304–9.
[23] Boengler K, Stahlhofen S, van de Sand A, Gres P, Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, et al. Presence of connexin 43 in subsarcolemmal, but not in interfibrillar cardiomyocyte mitochondria. Basic Res Cardiol 2009;104:141–7.
[24] Boengler K, Ruiz-Meana M, Gent S, Ungefug E, Soetkamp D, Miro-Casas E, et al. Mitochondrial connexin 43 impacts on respiratory complex I activity and mitochondrial oxygen consumption. J Cell Mol Med 2012;16:1649–55.
[25] Rottlaender D, Boengler K, Wolny M, Michels G, Endres-Becker J, Motloch LJ, et al. Connexin 43 acts as a cytoprotective mediator of signal transduction by stimulating mitochondrial KATP channels in mouse cardiomyocytes. J Clin Invest 2010;120:1441–53.
[26] O'Rourke B, Blatter LA. Mitochondrial Ca2+ uptake: tortoise or hare? J Mol Cell Cardiol 2009;46:767–74.
[27] Paillard M, Tubbs E, Thiebaut PA, Gomez L, Fauconnier J, Da Silva CC, et al. Depressing mitochondria-reticulum interactions protects cardiomyocytes from lethal hypoxia-reoxygenation injury. Circulation 2013;128:1555–65.
[28] Kawai M, Hussain M, Orchard CH. Excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes after formamide-induced detubulation. Am J Physiol 1999;277:H603–9.
[29] Lab MJ, Bhargava A, Wright PT, Gorelik J. The scanning ion conductance microscope for cellular physiology. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2012;304:H1-11.
[30] Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. Phys Rev Lett 1986;56:930–3.
[31] Hinterdorfer P, Dufrene YF. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. Nat Methods 2006;3:347–55.
[32] Jacot JG, Martin JC, Hunt DL. Mechanobiology of cardiomyocyte development. J Biomech 2010;43:93–8.

[33] Lieber SC, Aubry N, Pain J, Diaz G, Kim SJ, Vatner SF. Aging increases stiffness of cardiac myocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004;287:H645–51.
[34] Dorn II GW, Maack C. SR and mitochondria: calcium cross-talk between kissing cousins. J Mol Cell Cardiol 2013;55:42–9.
[35] Ong SB, Hausenloy DJ. Mitochondrial morphology and cardiovascular disease. Cardiovasc Res 2010;88:16–29.
[36] Chomentowski P, Coen PM, Radikova Z, Goodpaster BH, Toledo FG. Skeletal muscle mitochondria in insulin resistance: differences in intermyofibrillar versus subsarcolemmal subpopulations and relationship to metabolic flexibility. J Clin Endocrinol Metab 2011;96:494–503.
[37] Holmuhamedov EL, Oberlin A, Short K, Terzic A, Jahangir A. Cardiac subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria display distinct responsiveness to protection by diazoxide. PLoS One 2012;7:e44667.
[38] Ritov VB, Menshikova EV, He J, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE. Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. Diabetes 2005;54:8–14.
[39] Schwarzer M, Schrepper A, Amorim PA, Osterholt M, Doenst T. Pressure overload differentially affects respiratory capacity in interfibrillar and subsarcolemmal mitochondria. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2013;304:H529–37.
[40] Howald H, Hoppeler H, Claassen H, Mathieu O, Straub R. Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans. Pflugers Arch 1985;403:369–76.
[41] Muller W. Subsarcolemmal mitochondria and capillarization of soleus muscle fibers in young rats subjected to an endurance training. A morphometric study of semithin sections. Cell Tissue Res 1976;174:367–89.
[42] Percival JM, Siegel MP, Knowels G, Marcinek DJ. Defects in mitochondrial localization and ATP synthesis in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy are not alleviated by PDE5 inhibition. Hum Mol Genet 2013;22:153–67.

223. Etude des effets de la doxorubicine sur l'architecture de la membrane latérale des cardiomyocytes, chez la souris.

Lachaize V, Cauquil M, Smolyakov G, Karsenti C,Severac C,Guilbeau-Frugier C, Senard JM, Galés C, Dague E

"Etude des effets de la doxorubicine sur l'architecture de la membrane latérale des cardiomyocytes, chez la souris"

(à soumettre)

Etude des effets de la doxorubicine sur l'architecture de la membrane latérale des cardiomyocytes, chez la souris.

Véronique Lachaize[1,2,3,4], Marie Cauquil[4], Georgiy Smolyakov[1], Clément Karsenti[4], Childerick Severac[1], Céline Guilbeau-Frugier[4], Jean-Michel Sénard[4], Céline Galés[4, 3], Etienne Dague[1,2,3]

[1] CNRS, ITAV-USR3505 ; F-31100 Toulouse, France
[2] CNRS, LAAS, 7 avenue du colonel Roche, F-31400 Toulouse, France
[3] Université de Toulouse, UPS, ITAV, LAAS, F-31000 Toulouse, France
[4] Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, INSERM UMR 1048, Toulouse, France.

Introduction

Le traitement du cancer se base sur la trilogie, chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie. Parmi les anticancéreux utilisés en chimiothérapie, les anthracyclines constituent une classe de molécules particulièrement efficaces et utilisées préférentiellement pour lutter contre des tumeurs solides et liquides, comme par exemple les leucémies de l'adulte ou de l'enfant[1], et plus particulièrement dans les leucémies dites aiguë lymphoblastique (LAL), et lymphoïde chronique (LLC)[2]. Ces molécules sont des agents intercalants dont le mécanisme d'action consiste en une inhibition compétitive de la topoisomérase II en s'intercalant entre les bases de l'ADN. Il se produit alors une interférence dans les mécanismes réplicatifs de l'ADN qui entraîne la mort cellulaire (apoptose). Ce phénomène apoptotique n'est pas spécifique des cellules cancéreuses, cependant les cellules cancéreuses sont plus touchées que les cellules normales car leur vitesse de division est beaucoup plus élevée[3].

L'identification de la daunorubicine en 1963, puis de ses dérivés dont la 14-hydroxydaunomycin ou doxorubicine (Dox), a conduit à la création d'une nouvelle classe de molécules anticancéreuses : les anthracyclines. La daunorubicine a été purifiée à partir d'une bactérie et a montré, dans les années 60 son efficacité contre les leucémies et des lymphomes[4]. Peu de temps après, la Dox a démontré une plus grande efficacité encore, contre la leucémie et le lymphome, ainsi qu'un intérêt dans le traitement des rechutes des cancers du sein, mais également a été intégré dans les traitements du cancer du poumon, des myélomes multiples et des sarcomes[5]. La molécule de Dox stimule aussi, indirectement, une immunité antitumorale via le recrutement et la différenciation de cellules dendritiques. Cela se traduit par la diminution des infections opportunistes apparaissant généralement chez les patients sous chimiothérapie[6].
Cependant, bien que la Dox soit devenue l'un des agents anticancéreux les plus utilisés, il a été noté très tôt que son utilisation s'accompagne d'un effet secondaire grave chez 2,2% des patients

traités[7] : l'insuffisance cardiaque (IC). La cardiotoxicité associée à la Dox est à la fois aigüe/sub-aigüe et chronique[8,9,1] :

A court terme : son effet est réversible et non dose-dépendant,

- de façon aigüe (pendant ou juste après l'injection), la Dox est responsable d'arythmies, et de modifications électrocardiographiques chez environ 1 % des patients.
- de façon subaigüe (dans les deux semaines qui suivent le traitement), elle entraine essentiellement des myocardites chez 1,4 à 2 % des patients.

A long terme (au moins un an après, et la plupart du temps 10 ans après la fin du traitement) : L'effet est dose-dépendant, cumulatif et irréversible. il se caractérise par un allongement de l'espace QT, une élévation chronique de la troponine (marqueur connu d'IC indicateur de la mort des cardiomyocytes), une fonction diastolique puis une fraction d'éjection du ventricule gauche altérées, conduisant à une IC dilatée chez 1,6 à 5 % des patients.

En pratique clinique, une Dose Cumulative Maximale autorisée de 450-550 mg/m^2 a été imposée pour limiter les effets à long terme. Malgré ses précautions, environ 10 % des patients, traités par la Dox ou ses dérivés, développeront quand même des complications cardiaques dans les 10 ans suivant l'arrêt de la chimiothérapie[7,10–13 1413].

Etant donné la gravité de ces effets secondaires au niveau cardiaque et la large utilisation de la Dox de par son efficacité dans les chimiothérapies anti cancéreuses, il est urgent et important d'identifier précisément les mécanismes impliqués dans la cardiotoxicité de la Dox pour une meilleure prise en charge des patients. L'enjeu primordial est de limiter, si possible prévenir, le phénomène de cardiotoxicité provoqué par un traitement aux anthracyclines. En effet, à cette heure, il n'existe que des moyens de limiter cette toxicité. Par exemples :

- l'utilisation d'une forme liposomale de la Dox est moins toxique aux doses standards et permet donc la prescription d'une dose plus élevée sans pour autant augmenter l'effet cardiotoxique,
- l'injection concomitante de dexrazoxane, chélateur du Fe^{2+} [15], permet de diminuer significativement le risque de cardiotoxicité à long terme,
- l'utilisation concomitante d'une version modifiée de la Neuréguline (NRG1B, facteur de croissance), qui assure une cardioprotection après stimulation de ses récepteurs spécifiques cardiaques (ErbB2 et 4). Cependant, dans sa forme native, la Neuréguline possède un potentiel pronéoplasique. Le développement d'une forme bivalente de la Neuréguline permettrait de conserver son potentiel cardioprotecteur tout en réduisant le potentiel pronéoplasique[16]. Cette voie consistant à développer des molécules

cardioprotectrices à associer au traitement par la Dox est encore du domaine de la recherche.

Cependant ces moyens permettant de limiter la cardiotoxicité de la Dox ne sont pas une solution. Il est nécessaire aujourd'hui de comprendre les mécanismes menant à un pourcentage non négligeable d'apparition d'une IC chez les patients traités à la Dox.

La connaissance actuelle que nous avons de la cardiotoxicité de la Dox repose essentiellement sur la mort des CMs, que ce soit par apoptose, nécrose ou sénescence[17,18]. Les mécanismes toxiques mis en évidence sont nombreux et proviennent de différentes cascades de réactions moléculaires[18] (Fig. 1), mais à l'échelle cellulaire, 2 types de mécanismes toxiques sont prépondérants

- Des mécanismes « Reactive Oxygen Species-dépendant » (ROS-dep) :

La Dox induit la production d'espèces réactives de l'oxygène (et de l'azote) (radicaux libres ou ROS) [19,20], soit directement soit sous sa forme complexée au Fe^{2+}. Comme la concentration mitochondriale en Fe^{2+} est plus élevée que dans le cytoplasme, la Dox a une toxicité importante sur les mitochondries[21,22]. L'effet cardioprotecteur du dexrazoxane (chélateur du Fe^{2+}) s'explique par la diminution des ROS produits par la forme complexée de la Dox au Fe^{2+}

Les ROS sont responsables de nombreux dommages :

- peroxydation des lipides, responsable d'une altération des membranes.
- lésions de l'ADN nucléaire et mitochondrial.
- troubles de l'expression génique par interaction/dégradation avec les protéines de la régulation
- détérioration du sarcomère (entité contractile) des CMs.

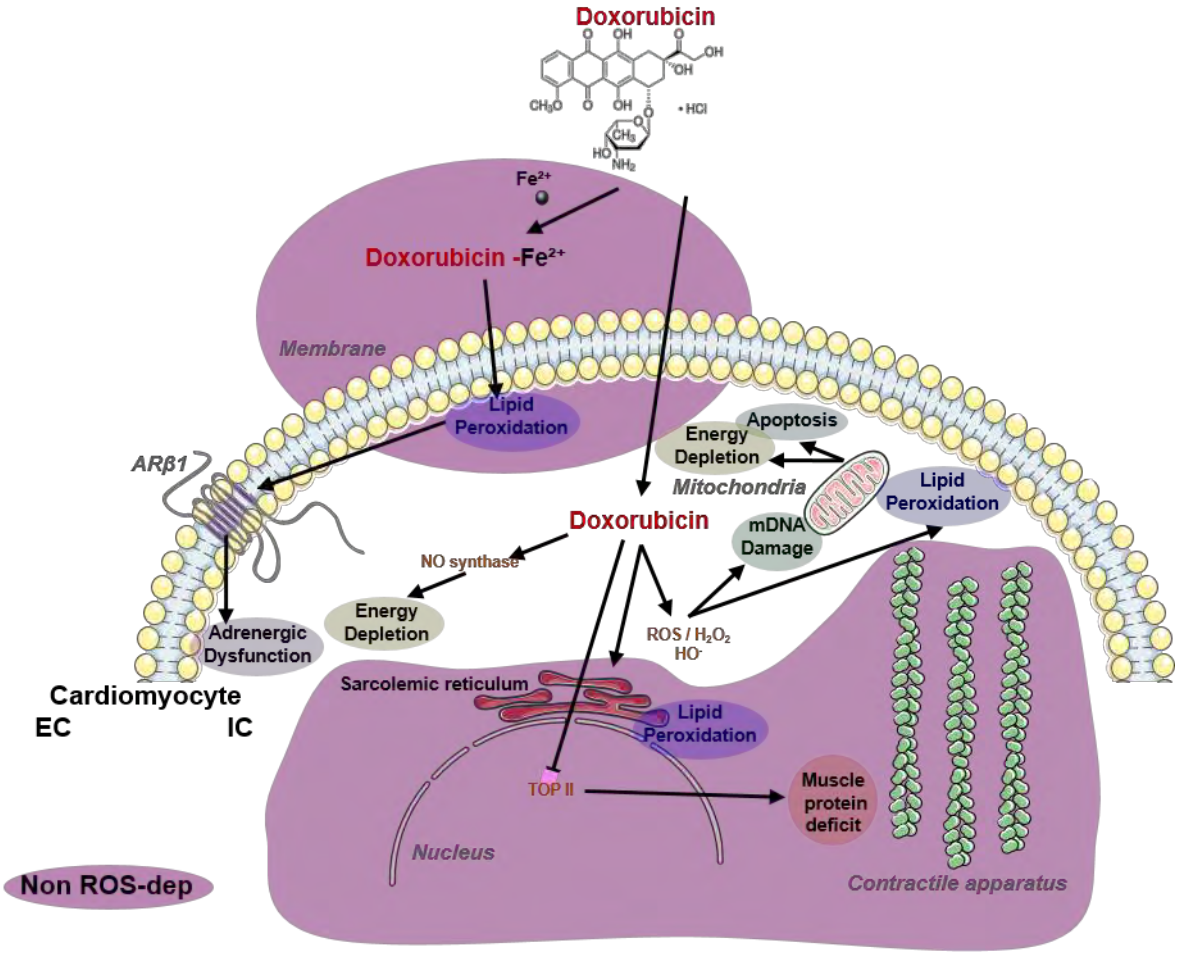


Figure 1 : ***Mécanismes de toxicité de la doxorubicine au niveau du cardiomyocyte.*** *La molécule de Doxorubicine entre dans le cardiomyocyte par diffusion passive et stimulent la production de radicaux libres, conduisant à des dommages cellulaires. La Doxorubicine est impliquée directement et indirectement dans des mécanismes inhibant la transcription des gènes de la contraction, le fonctionnement mitochondrial, et la production d'énergie dans la cellule. Les mécanismes de toxicité non ROS-dépendants sont surlignés en rose. EC = Extracellulaire ; IC = Intracellulaire*

Des études faites chez les rongeurs ont permis de montrer que l'administration, concomitante au traitement par la Dox, d'anti-oxydants, permettrait de réduire sur le long terme la dégénérescence des CMs en limitant l'atteinte mitochondriale et les dommages oxydatifs[23]. Cependant l'effet cardiotoxique aigu semble persister. Les ROS auraient donc un rôle prépondérant mais pas unique dans la cardiotoxicité de la Dox.

- Des mécanismes «non ROS-dépendant» (non ROS-dep):
  - Mort cellulaire : via des mécanismes qui ne font pas intervenir les ROS.
    - Par apoptose : la Dox est responsable d'une perturbation du flux calcique mitochondrial engendrant une perte du potentiel transmembranaire. Il en résulte un gonflement de la mitochondrie avec passage transmembranaire de molécules activant, dans le cytoplasme, la voie de l'apoptose.

- Par nécrose : provoquée par une perturbation de l'homéostasie du calcium mitochondrial. Cette surcharge calcique va être un facteur critique pour la survie de le CMs. De plus, la Dox induit également des dommages de l'ADN mitochondrial, dans la respiration mitochondriale, et provoque l'épuisement de l'ATP. Tous ces événements contribuent à la nécrose du CMs [24,8].

- Inhibition des mécanismes compensatoires de sauvetage cellulaire.
- Perte de la structure du sarcomère des CMs.
- Déplétion énergétique: La Dox cible le système des CPT (Carnitine Palmitoyl Transferases)[25], des transporteurs situés sur les membranes internes et externes mitochondriales responsables d'étapes dans l'oxydation des acides gras. Il en résulte une altération du métabolisme énergétique lipidique et cette déplétion énergétique associée à la perte de structure du sarcomère auront pour conséquence des troubles de la contractilité du CM.

Il est notable que l'atteinte des mitochondries du CMs semble être un événement majeur dans la cardiotoxicité de la Dox mais les effets rapportés sont faits sans distinction entre les différentes sous-populations mitochondriales constituant les CMs.

Nos études précédentes dans l'équipe ont permis de montrer de montrer pour la 1ère fois, une modification ultrastructurale de la membrane latérale du CM lors d'une IC induite par un infarctus du myocarde (par ligature permanente de l'artère coronaire gauche) chez la souris. Ces travaux ont mis en évidence une redistribution spatio-temporelle des sous-populations mitochondriales des CMs. En effet, il est souvent oublié que le CM adulte mature possède 3 sous-populations de mitochondries distinctes : les mitochondries interfibrillaires (IFM) entre les myofibrilles de l'appareil contractile (permettant l'apport énergétique de la contraction, ce sont les mitochondries les plus étudiées), les mitochondries sous-sarcolemmales (SSM) juste sous la membrane plasmique, créant une structure périodique caractéristique du CM en creux et crêtes au niveau de la membrane du CM, mais également des mitochondries périnucléaires.

Les SSM ont été découverte dans les années 1970 mais encore aujourd'hui leur fonction reste inconnue[26]. De façon évidente ces mitochondries présentent de nombreuses différences avec les IFM, que ce soit dans leur localisation mais aussi dans leur morphologie, ce qui suggère des fonctions différentes. Dans une étude précédente, nous avons pu montrer par ce modèle d'ischémie que, 3 jours après la ligature, il y a une modification majeure de la structure du sarcolemme avec un première disparition des SSM à la surface du CM[27]. La disparition des crêtes a été provoquée par la mort des SSM, alors que nous n'avons observé à ce stade aucunes modifications de l'architecture de l'intérieur du CM (notamment dans les myofibrilles ainsi qu'au

niveau des invaginations intracellulaires du sarcolemme, les Tubules-T, dont la désorganisation a récemment été identifiée comme point commun à tous les modèles d'IC). Cette perte des SSM est accompagné d'un changement dans les propriétés nanomécanique de membrane latérale (ML) qui a pu être détecter par la microscopie à force atomique (AFM). Cet outil, avec un couplage à la microscopie électronique à transmission (TEM), a permis de montre en évidence deux étapes au niveau du CM lors de l'évolution vers l'IC post-ischémique:

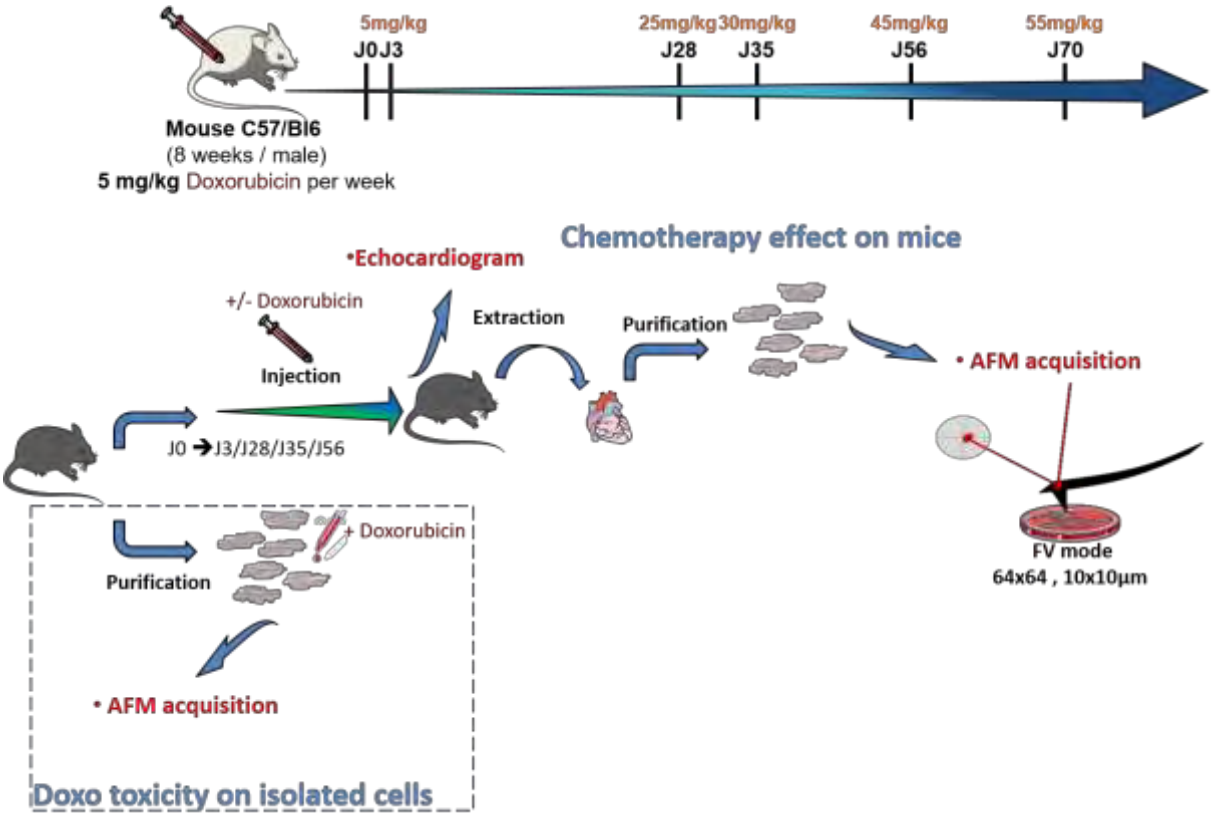
- 3 jours post infarctus, la perte des SSM à la surface de la membrane accompagnée d'une baisse de l'élasticité et avec un maintien de l'organisation contractile du CM,
- 15 jours post-infarctus, une augmentation de l'élasticité de la membrane corrélée à une délocalisation et remontée des IFM à la surface du CM.

En conclusion, cette étude a proposé l'hypothèse selon laquelle la mort précoce des SSM à la surface des CMs constituerait le phénomène initiateur dans l'évolution vers l'IC post-ischémique.

Il est maintenant intéressant de montrer si cette perte des SSM est une caractéristique commune entre les différents modèles d'IC comme celle apparaissant après un traitement chimiothérapique par Dox. Et donc d'observer si les mécanismes cardiotoxiques de la Dox au niveau du CM, se situent en amont ou en aval d'un bouleversement mitochondrial comme observé dans le modèle d'IC post-ischémique.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes proposés d'étudier l'effet cardiotoxique de la Dox en cinétique sur la structure membranaire du CM. Pour cela, nous avons établi un protocole chez le modèle murin (souris C57/Bl6) mimant le protocole de chimiothérapie à la Dox chez l'homme (**Fig. 2A**). Nous avons étudié par AFM, la surface de CMs préalablement isolés de cœur de souris ayant reçu une injection chaque semaine de Dox (**Fig. 2**). Ces observations ont été faites à différentes doses reçues afin d'étudier l'évolution du CM jusqu'à la mise en place d'une IC. Pour ce faire, nous avons suivi les capacités contractiles du cœur par échographie et l'analyse de la structure du CM sur cellules vivantes a été faite par AFM en mode spectroscopie de force. Des analyses de l'architecture des CMs au sein du tissu en microscopie électronique ont également

Afin de vérifier que les anomalies du CM étaient liées à une toxicité directe de la Dox, nous avons également effectués des analyses sur CMs isolés vivants après une mise en contact avec une solution de différentes concentrations de Dox.



<u>Figure 2</u> : *Stratégie appliquée pour l'étude de la toxicité cumulée et directe de la doxorubicine sur la structure membranaire du cardiomyocyte, lors d'un protocole in vitro, chez la souris. A : Protocole d'injection mis en place pour mimer une chimiothérapie à base de doxorubicine :* *1 injection de 5mg/kg de Doxorubicine tous les 7 jours en intrapéritonéale chez des souris C57/Bl6 sauvages mâles âgées de 8 semaines pendant 70 jours. Les analyses sont réalisées après la première injection soit à une dose de 5mg/kg, puis après 28 jours (dose cumulée de 25 mg/kg), 35 jours (dose cumulée de 30 mg/kg), 56 jours (dose cumulée de 45 mg/kg) et 70 jours (dose cumulée de 55 mg/kg).* ***B : Protocole d'analyse de l'effet toxique de la Doxorubicine.*** *Les analyses sont séparées en 2 groupes. Premièrement, la toxicité cumulée est étudiée. Pour ce faire, l'effet de la doxorubicine sur les capacités contractiles du cœur est évaluée par échographie aux différends temps étudiées (J3/J28/J36/J56). Une fois les données contractiles enregistrées, les cœurs sont extraits et les CMs sont purifiés et isolés par un système de Langerhoff[28]. Une fois les CMs isolés, ils sont immobilisés dans une boite de petri coatées à la laminine (une protéine de la MEC essentielle à la survie des CMS) et maintenus dans un milieu MEM modifié. La température est maintenue à 37°C et l'atmosphère est contrôlée pour contenir 5% de CO_2 lors des mesures AFM. Les mesures AFM consistent en matrices de 64x64 courbes de force réalisées sur une aire de 10x10 µm².*
Le second groupe permet l'étude de la toxicité directe de la doxorubicine sur la membrane latérale de CMs isolés. Les CMs sont purifiés à partir de souris C57/Bl6 male âgées de 8 semaines Wild type, et isolés par un système de Langerhoff[28]Une fois les CMs isolés, ils sont immobilisés dans une boite de petri coatées à la laminine (une protéine de la MEC essentielle à la survie des CMS) et incubés dans un milieu MEM modifié, en présence de différentes concentrations de Doxorubicine(1 / 1.5 / 2 / 2.5 / 5 µM pendant 5 minutes). La température est maintenue à 37°C et l'atmosphère est contrôlée pour contenir 5% de CO_2 lors des mesures AFM. Les mesures AFM consistent en matrices de 64x64 courbes de force réalisées sur une aire de 10x10 µm².

Matériels et Méthodes

Modèle animal

Des souris mâles C57Bl6 âgées de 2 mois ont été choisies comme modèle pour cette étude. Le protocole expérimental concernant les animaux a été analysé et approuvé par le Comité d'éthique pour l'expérimentation animale : CEEA 122 (CEEA-122 2014-33) (§ Chapitre 3 : Annexe). Le protocole prévoit :

1 groupe de souris traités avec 5 mg/kg de Doxorubicine (35 souris)

1 groupe de souris contrôle injectée avec du 5 mg/kg de PBS (20 souris)

La fonction cardiaque de ces deux groupes de souris sera suivie par échographie. Le protocole de traitement à la Dox sera arrêté lorsque 75 % des souris de ce groupe groupe traités seront en IC.

1 groupe de souris non traité sera destiné à l'étude *in vitro* (20 souris)

Traitement à la Doxorubicine in vivo

Le groupe de souris traitées a reçu une Injection intrapéritonéale de 5mg/kg de Doxorubicin Hydrochloride (Dox) (Sigma Aldrich, D1515) dilué dans un Tampon phosphate salin (PBS), chaque semaine pendant 10 semaines. Les analyses, décrites ci-dessous, ont été réalisées après l'injection cumulée des doses suivantes : J3 (5mg/Kg), J28 (25mg/Kg), J35 (30mg/Kg), J56 (45mg/Kg), J70 (55mg/Kg). Le groupe contrôle a reçu la même quantité de PBS (5 mg/kg) chaque semaine

Pour les 2 groupes, les souris ont été sacrifiées par injection d'une dose létale de pentobarbital 3 jours près leurs dernières injections. Le cœur a été immédiatement prélevé et les cardiomyocytes isolés (méthode Langendorff décrites dans le chapitre précédent) pour analyse en AFM sur cellules vivantes[29].

Echocardiographie

Pour l'échographie, les souris sont anesthésiées avec un mélange de 2% d'isoflurane / 98% d'oxygène. Elles sont intubées et ventilées (ventillation endotrachéale) pendant l'échocardiographie transthoracique. L'échographe est un Vevo 2100® (Visual Sonics). Les paramètres mesurés sont la fraction d'éjection, la dimension intraventriculaire gauche ainsi que le volume du ventricule gauche. Une analyse "Strain" de l'échographie a également permis la mesure de la déformation longitudinale du muscle cardiaque

Les différentes données extraites (Fraction d'éjection, volume intraventriculaire gauche, distance intraventriculaire gauche et déformation longitudinal du ventricule gauche) des mesures prises lors de l'échographie sur chaque souris ont été moyennées. La significativité statistique des données (Fraction d'éjection, volume intraventriculaire gauche, distance intraventriculaire

gauche et déformation longitudinal du ventricule gauche) a été évaluée à l'aide du test ANOVA avec le test post-hoc de Tukey. ns non significatif, * P <0,1, ** P <0,01, *** P <0,001.

AFM

Les expériences de microscopie à force atomique (AFM) ont été menées dans le milieu de culture des CMs, à 37 °C sous un flux de CO_2 de 5%. Nous avons utilisé la cellule perfusée (perfusing cell, PetriDishHeater™, JPK) et le système de chauffage du Nanowizard II (JPK)

Pour toutes les mesures, nous avons utilisé les sondes MLCT (Bruker, Santa Barbara, CA, USA) qui se présentent sous forme de pointe pyramidale en Si_3N_4, avec un rayon de courbure de 35°.

Les images de hauteur ainsi que les cartes d'élasticité ont été enregistrées en mode Force volume (résolution 64x64 CFs).

La sensibilité et la constante de raideur des leviers a été systématiquement calibrée. Pour la constante de raideur nous avons utilisé la méthode du bruit thermique[30]. Les constantes de raideur de nos leviers varient de 0.101 à 0.120 N/m

La force maximale appliquée aux cellules a été limitée à 3 nN afin de préserver l'intégrité de la membrane. La courbe représentant la force en fonction du déplacement de la pointe est convertie en courbe d'indentation grâce à la calibration de notre sonde puis le modèle de Hertz est appliqué afin de déterminer l'élasticité de la cellule[31].Les courbes de force ont été extrait des cartes d'élasticité enregistrées selon une matrice de 64 × 64 points sur une zone de 100 μm^2.

Isolement des cardiomyocytes

Les cardiomyocytes adultes de souris ont été isolé selon la méthode de perfusion Langendorff[29]. Succinctement : Les cœurs sont retirés après l'euthanasie et perfusés via la crosse aortique avec successivement :

- une solution de lavage composé d'une solution de Krebs (en mM: NaCl 113, KCl 4,7, KH_2PO_4 0,6, $NaHPO_4$ 0,6, $MgSO_4$ 1,2, $NaHCO_3$ 12, $KHCO_3$ 10, HEPES 10, Taurin 30, 2, 3-butanedione monoxime (BDM) 10, du glucose 5,5, pH 7,4) contenant 0,5 mM de $CaCl_2$ à 37°C pendant 4 minutes.
- une solution de décalcification (solution de Krebs contenant mM EGTA 0,1) à 37°C pendant 2 min.
- une solution enzymatique (solution de Krebs contenant la collagénase II, 2,2 mg/mL (Worthington Biochemical), et 12,5 µM de $CaCl_2$) à 37°C pendant 10 min.

Après la digestion, les ventricules sont disséqués en morceaux de 1 mm^3, et les cardiomyocytes dispersés mécaniquement (à l'aide d'une pipette Pasteur) dans la solution de resuspension (solution de Krebs contenant 10% de sérum de veau et 12,5 µM de $CaCl_2$). Les cardiomyocytes en suspension sont ensuite filtrés à travers un tamis de maille 200 μm^2 de côté et récoltés après 10

minutes de sédimentation. Pour les études en AFM, les cardiomyocytes isolés ont été ensemencés sur des boîtes de petri de culture coatés avec de la laminine. Les analyses AFM ont été réalisées dans le milieu de culture des cardiomyocytes (MEM 5% sérum de veau fœtal, 100 U/ml Peniciline, 2 mM/l Glutamine) additionné de 10 mM de 2,3-butanedione monomoxime (BDM) pour inhiber la contraction des cellules durant la procédure AFM.

Traitement à la Doxorubicine in vitro

Une fois les cardiomyocytes isolés et immobilisés, les cellules sont incubées avec une solution de Dox à différentes concentrations (1, 1.5, 2, 2.5, 5 µM) dans un milieu de MEM modifié (MEM 5% sérum de veau fœtal, 100 U/ml Peniciline, 2 mM/l Glutamine, 10 mM de BDM) pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec du PBS avant les mesures AFM qui se font dans du milieu MEM modifié.

Statistiques AFM

Les cartes d'élasticité de 4096 courbes de forces ont été divisées selon certains motifs qui ont été préalablement définis (motifs crêtes / plat / protrusion). L'aire de ces zones a été moyennée avec les aires de chaque souris des mêmes groupes/cohortes. L'intérêt et la méthode de cette analyse statistique a été développée dans la partie résultats. La significativité statistique des données a été évaluée à l'aide du test ANOVA avec le test post-hoc de Bonferronni. ns non significatif, * P <0,1, ** P <0,01, *** P <0,001.

Résultats

Nous nous sommes proposés d'observer l'effet cardiotoxique de la Doxorubicine au cours du temps lors d'injections hebdomadaires intrapéritonéales de Dox (5mg/kg), chez un modèle de souris C57/Bl6. Pour ce faire, nous avons tout d'abord utilisé l'échographie pour mesurer l'évolution de la capacité contractile du cœur au cours de différents temps (doses cumulées) du protocole. Par AFM nous avons observé la topographie ainsi que mesuré l'élasticité de la surface de la ML des CMs vivants isolés à partir des cœurs traités aux différentes doses de Dox.

Contrôles des capacités contractiles du muscle cardiaque par Echographie

L'échocardiographie permet, grâce aux ultrasons, d'analyser, en termes de dimension, activité, déformation et volume, les différents compartiments du cœur : les ventricules, oreillettes, septum, valves, parois cardiaques… Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur le ventricule gauche (VG) qui permet de caractériser l'IC. Nous nous sommes donc intéressés à la fraction d'éjection (FE) qui représente le pourcentage du volume de sang contenu dans le ventricule éjecté de celui-ci lors d'un battement cardiaque[32–34]. Cette FE représente donc le rapport entre le volume d'éjection systolique (différence entre le volume diastolique et systolique) et le volume diastolique (le volume du ventricule plein). En condition dite normale, ce pourcentage est d'environ 60 % alors qu'une IC est caractérisée par une FE inférieure à 40 %[35]. Nos résultats (**Fig. 3A**) montrent que, dans la cohorte de souris contrôle, c'est-à-dire des souris ayant reçu chaque semaine une injection de placebo (PBS) sur une période de 10 semaines, la FE est en moyenne de 55 % (aucune souris ne présente une FE < 40%). Ce résultat nous permet d'affirmer que s'il y a apparition d'une IC lors de notre protocole d'injection Dox, elle ne peut pas être due : aux stress des injections, manipulations ou au vieillissement des souris.

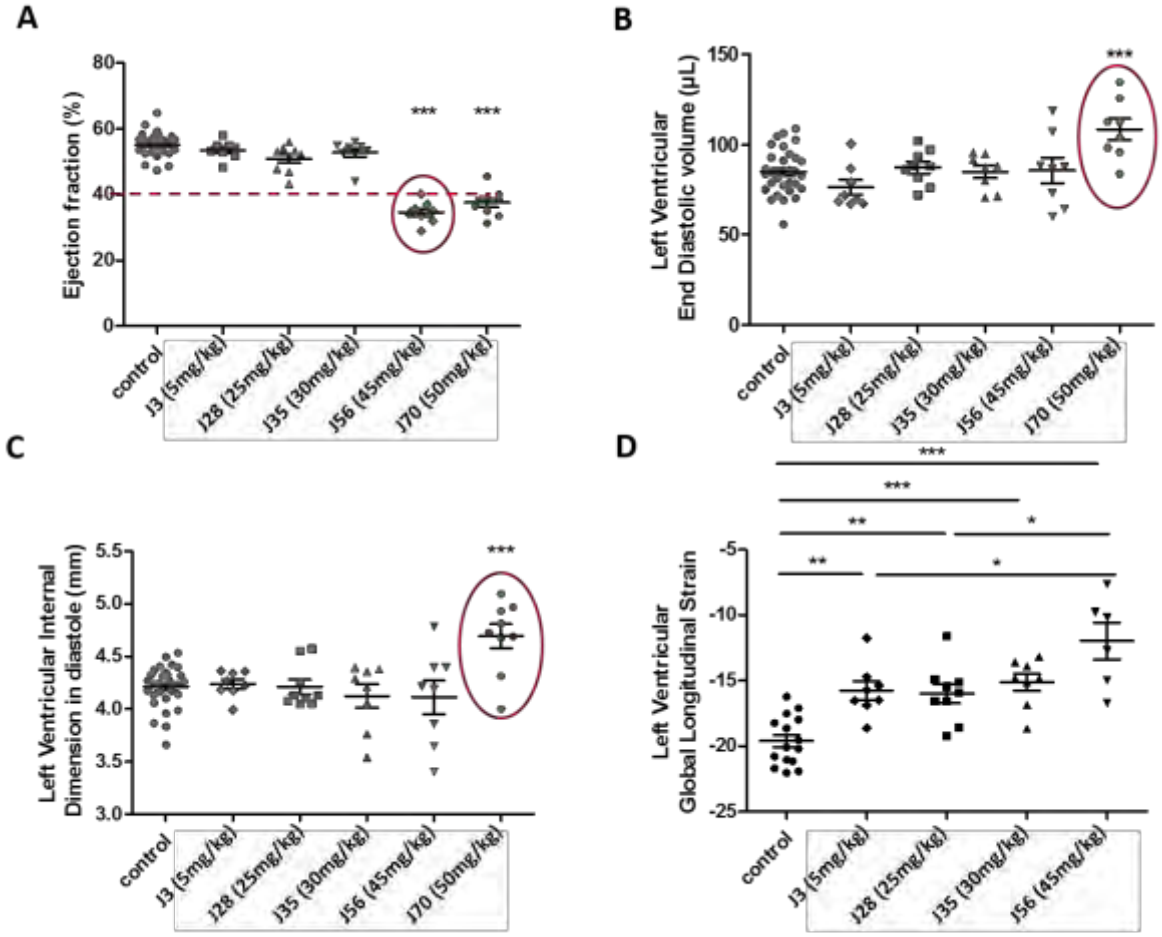
Lorsque l'on considère la cohorte traitée à la Dox. La cohorte J3 (5mg/kg) ne présente pas de trouble de la FE, elle est d'environ 53 %. De la même façon, les cohortes J28 (25 mg/kg) et J35 (30 mg/kg) la FE ne semble toujours pas impactée par le traitement puisqu'elles présentent un FE moyenne de 50 % et 52 % respectivement. Ce n'est qu'à partir de J56 (45mg/kg), que la FE diminue significativement, avec une valeur de 35 %, ce qui est caractéristique d'une IC. Cette donnée illustrant l'installation d'une IC est confirmée par le maintien d'une FE inférieure à 40% pour la cohorte J70 (55mg/kg ; FE 37 %). En plus de la FE, nous avons étudié deux autres paramètres de la cavité du VG, son volume et sa dimension interne (diamètre) en diastole, permettant de caractériser le degré de dilatation du muscle cardiaque (**Fig. 3B** : volume et **Fig. 3C** : dimension interne). En effet, lors de l'évolution vers l'IC, la diminution de la capacité du cœur à fournir un débit suffisant s'explique par la mort des cellules contractiles, les CMs. Cette perte de cellules induit une diminution de l'épaisseur du muscle cardiaque et donc une augmentation du

volume de la cavité du ventricule et notamment gauche, responsable d'irriguer la majeure partie de l'organisme. L'augmentation de volume et de dimension interne du VG en diastole marque une IC dite dilatée[36,37]. Elle est caractérisée quand les valeurs de volume ainsi que d'épaisseur du myocarde sont significativement différentes des valeurs de ces paramètres chez des souris témoins. Pour ces paramètres, la cohorte témoin (0 mg/kg) présente un volume de 85 µL et un diamètre intra ventriculaire de 4,28 mm. Les cohortes J3 (5 mg/kg), J28 (25 mg/kg) et J35 (30 mg/kg) présentent environ les mêmes valeurs avec respectivement un volume de 75, 86 et 86 µL et une dimension (diamètre) interne de 4,30, 4,28 et 4,25 mm, ce qui montre qu'à ces doses, la Dox ne provoque pas d'anomalies (dilatation) du ventricule gauche. Pour la dose cumulée suivante à J56 (45 mg/kg), la moyenne des données de volume et de dimension du ventricule obtenues sur les différentes souris de la cohorte montre des valeurs toujours proches de la cohorte témoin (0 mg/kg) de 86 µL et 4,14 mm respectivement. Cependant, la cohorte J56 (45 mg/kg) présente une hétérogénéité beaucoup plus importante, l'écart type passant de 12,5 dans la cohorte témoin (0 mg/kg) à 20,2 chez la cohorte J56 (45 mg/kg). A partir de cette dose cumulée, J56 (45 mg/kg), certaines souris montrent une dilatation du ventricule gauche. Cependant, ce n'est qu'à la dose J70 (55 mg/kg) que la dilatation du ventricule gauche est statistiquement significative ($P < 0,001$). Le volume du VG passe de 85 µL chez les souris témoins (J3 +J28 + J35 + J56 + J70) (0 mg/kg) à un volume de 110 µL après une dose reçue de 55 mg/kg, la dimension intraventriculaire passant, elle, de 4,28 mm à 4,65 mm.

L'échocardiographie nous a donc permis d'observer un FE caractéristique d'une IC (<40%) après 56 jours de traitement à la Dox, soit une dose de 45 mg/kg, mais nous a montré aussi que la dilatation des ventricules ne s'installe qu'à partir de 70 jours de traitement, soit une dose de 55 mg/kg. Ces résultats confirment que notre protocole mime la cardiotoxicité induite par une chimiothérapie à la Dox qui s'installe au long terme chez l'homme.

Dans cette étude nous avons utilisé un mode émergent dans l'échocardiographie, l'imagerie du strain myocardique multidirectionnel. L'imagerie du strain myocardique multidirectionnel est un outil de quantification précis de la fonction contractile du myocarde, apparu il y a une quinzaine d'années. Le strain est un paramètre sans unité ($\Delta L/L$; rapport de longueur ; ΔL est la variation de longueur et L la longueur initiale) représentant la déformation longitudinale du VG par rapport à sa forme originelle. Pour notre cohorte témoin (0 mg/kg), nous observons un raccourcissement longitudinal du VG caractérisé par une valeur de strain de -19.50 (**Fig 3D**). De façon intéressante, dès la dose J3 (5 mg/kg), donc après une seule injection de Dox de 5 mg/kg, une différence de déformation significative apparait. Le raccourcissement du VG lors de la contraction est moins important avec une valeur de strain de seulement -14.50. Cette diminution d'amplitude de raccourcissement traduit une diminution de la capacité de déformation du cœur lors d'un battement et donc une anomalie de contraction. Cette résistance à la déformation n'est pas

augmentée pour les cohortes J28 (25 mg/kg) et J35 (30 mg/kg), elle stagne aux valeurs de -14,00 pour J28 (25 mg/kg) et -14,75 pour J35 (30 mg/kg). Ce n'est qu'à la dose de J56 (45 mg/kg), que cette anomalie contractile s'accentue encore, la capacité de déformation diminue et la valeur de strain atteint -12,15. Cette nouvelle technique d'échocardiographie, le strain, nous a permis d'observer un effet très précoce de la Dox, à une dose de 5mg/kg, au niveau cardiaque et cela avant l'installation de l'IC détectée par le mode d'échographie standard. En effet, l'analyse de la FE (**Fig. 3A**) ne permet pas d'observer une anomalie avant la dose de J56 (45 mg/kg). L'analyse des paramètres de dilatation, c'est-à-dire du volume (**Fig. 3B**) et de la dimension interne du VG en diastole (**Fig. 3C**), ne montrent une différence significative avec la condition témoin (0 mg/kg) qu'à la dose J70 (55 mg/kg).



<u>Figure 3</u>: ***Etudes des capacités contractiles du cœur par échographie.*** *(Vevo 2100®, Visual Sonics) sur les différentes cohortes désignées par la durée du traitement (J »X ») et la dose cumulée de Dox injectée (X mg/kg).*
A: Graphique représentant le pourcentage de la fraction d'éjection en fonction de la dose cumulée de Doxorubicine. *Le groupe témoin (J0, 0 mg/kg) présente une fraction d'éjection d'environ 60 %, tout comme les groupe J3, (5 mg/kg) / J28, (25 mg/kg) et J35 (30 mg/kg). Ce n'est qu'à partir du groupe J56 soit 45 mg/kg de Doxorubicine injecté que les souris présentent une fraction d'éjection inférieure à 40%.* ***B: Graphique représentant le volume du ventricule gauche lors de la diastole des différents groupes étudiés au cours du temps,*** *les données ne montrent qu'une différence significative du volume de sang contenu dans le ventricule gauche qu'à partir de 70 jours de traitement à la Doxorubicine (50 mg/kg) où le volume passe d'environ 80 µL à 110 µL.* ***C: Graphique représentant le diamètre du ventricule gauche lors de la diastole en fonction des groupes de temps étudiés.*** *Les données ne montrent qu'une différence significative du diamètre de l'intérieur de la cavité du ventricule gauche qu'à partir de 70 jours de traitement à la Doxorubicine (50 mg/kg), où la dimension passe d'environ 4,2mm à 4,8 mm. Les paramètres étudiés sur les graphiques B et C illustrent les IC dilatée.* ***D: Graphique représentant la déformation longitudinale du ventricule gauche par échographie strains selon les groupes de temps étudiés.*** *Ce graphique montre un défaut du mouvement contractile du myocarde à partir de la première injection de Doxorubicine (soit le groupe J3 à 5mg/kg). Ce défaut reste stable jusqu'au groupe J56 (45 mg/kg) avant de s'accentué après 10 semaines d'injections hebdomadaire de Doxorubicine.*
ns Non significatif; P<0,1, ** P <0,01; *** P <0,001, cercle rouge : Présence IC*

Validation des observations des motifs présents à la surface de la ML des CMs par AFM

Dans cette étude de la cardiotoxicité de la Dox, nous avons utilisé un appareillage AFM différent de notre étude précédente sur l'ischémie cardiaque [27]. Il nous a fallu donc revalider les structures de la surface des CMs observés précédemment, à savoir, une évolution de la structure de la ML des CMs dans le temps après l'infarctus et présentant 3 motifs :

- le motif « **Crête** » présent en condition témoin (0 mg/kg). Nous avons montré que ces crêtes sont formées par des mitochondries subsarcolemmales (SSM), présentes comme leur nom l'indique sous la membrane latérale des CMs.
- le motif « **Plat** » présent dès 3 jours post infarctus lié à la mort des SSM et donc la perte des crêtes.
- le motif « Protrusion » présent à partir de 15 jours post infarctus correspondant à des amas de mitochondries intrafibrillaires (IFM). Ces amas sont formés par la migration des IFM à la surface qui se sont décrochés de l'appareil contractile à l'intérieur du CM.

Lors de cette étude, nous avions montré qu'un traitement des CMs à la Formamide, en causant un stress osmotique, mime exactement l'effet délétère, d'un infarctus du myocarde, sur la structure de la ML[27,39,40]. Selon la concentration de formamide appliquée, nous obtenons les trois motifs observés lors de l'évolution vers l'IC (0 µM : Crète, 250 µM : Plat, 750 µM : Protrusion).

Nous avons donc reproduit ces expériences de traitement à la formamide sur le nouvel appareillage AFM et ce sur des CMs vivants isolés de souris C57/Bl6 de 8 semaines. Nos résultats, présentés **figure 4** permettent de confirmer les modifications relatives d'élasticité observées entre les motifs. L'élasticité est décrite par la valeur du module de Young (YM), cette variable permet de relier la contrainte de compression et la déformabilité du matériau. Les valeurs de YM moyens obtenues pour les 3 motifs sont les suivantes :

- motif « **Crête** » YM moyen compris entre 3,5 et 5 kPa, (**Fig. 4 Crest**) et obtenu sur des CMs, non traités (37°C, 5 % Co2).
- motif « **Plat** » YM moyen inférieur à 2 kPa, (**Fig. 4 Flat**) et obtenu sur des CMs incubés dans une solution de Formamide à 250 µM pendant 20 minutes.
- motif « **Protrusion** » YM moyen supérieur à 8,5 kPa, (**Fig. 4 Heaps**) et obtenu après incubation dans une solution de Formamide à 750 µM pendant 20 minutes.

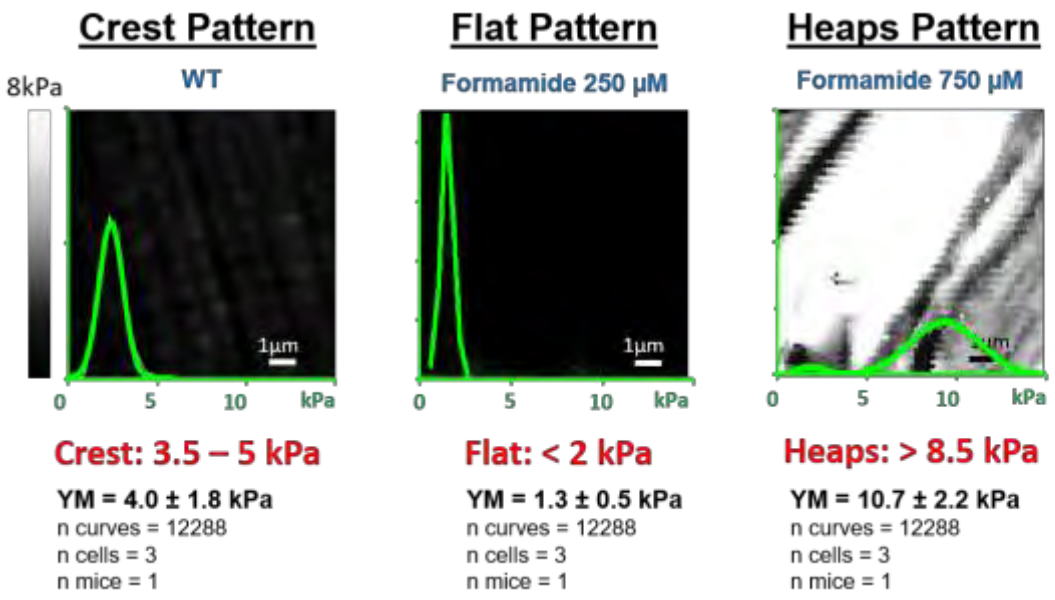


Figure 4: ***Définition des motifs Crêtes / Plat / Protrusion. Des CMs issus de souris sauvages ont été traités avec différentes concentrations de Formamide.*** *Données obtenues à partir de carte d'élasticité une matrice de 100 µm² de 64 x 64 CF. Moyenne pour chaque condition sur n souris = 1, n cellules = 3 et n CF = 12288,*
*Le **motif « Crête »** est représenté par des CMs non traités, et possèdent un YM moyen situé entre 3,5 et 5,0 kPa,*
*Le **motif « plat »** est représenté par des CMs traités à une concentration de Formamide de 250 µM, et possède nu YM moyen inférieur à 2,0 kPa,*
*Le **motif « Protrusion »** est représenté par des CMs traités à une concentration de Formamide de 750µM, et possède nu YM moyen supérieur à 8,5 kPa*

Nous observons donc une différence notable entre les valeurs absolues de YM obtenues dans notre précédente étude de 2014[27] et les valeurs obtenues ici. Toutefois les variations relatives entre les motifs restent conservées. Et nous sommes confrontés au délicat problème de la détermination de la valeur absolue d'un YM sur la matière molle (ici les CMs). Cette valeur est dépendante de nombreux facteurs, comme la calibration des leviers (détermination de la constante de raideur des leviers), positionnement du point de contact sur la courbe de force, choix du modèle élastique etc. Nous pouvons noter 2 différences majeures entre l'étude de 2014 et les présentes mesures :

- 2 appareillages AFM différents ont été utilisés et la détermination de la constante de raideur des leviers, en milieu liquide, présente une différence d'un facteur 3. En effet, dans notre précédente étude, avec l'AFM que nous avions utilisée (Bioscope, Bruker), la constante de raideur du levier de notre pointe (MLCT, Bruker) était d'environ 0,31 N/m, alors que dans notre étude actuelle, l'AFM que l'on utilise présente une constante de raideur pour ce même levier de 0,10 N/m.
- le modèle de Hertz a été utilisé dans l'article JMCC et ici nous avons privilégié le modèle de Sneddon qui est plus adapté aux pointes pyramidales utilisées. Néanmoins, la différence induite n'est pas importante, de l'ordre de 12 %.

Cette thèse n'est pas le lieu pour le débat des biophysiciens concernant la pertinence et l'utilité de déterminer des YM « absolus ». Les variations relatives sont les mêmes, ce qui nous indiquent que les mécanismes biologiques sous-tendant les observations AFM sont toujours les mêmes. Les interprétations se baseront donc sur les variations relatives plutôt que sur les valeurs absolues qui comme nous venons de le voir n'ont qu'un sens limité.

Vérification de stabilité des CMs témoins (0 mg/kg) dans le temps

Dans la suite de notre étude, nous avons regroupé dans une même cohorte, les CMs extraits des souris traitées avec une solution saline une fois par semaine (Cohorte témoin), plus précisément, les souris ont été injectées avec un volume équivalent de PBS que de solution à base de Dox pour les souris traitées. Ces injections permettent de supprimer le facteur stress des anomalies potentiellement observées chez les souris traitées à la Dox. En effet, chaque souris aura subi le même stress d'injection. Pour ce faire, nous avons d'abord vérifié que le vieillissement des souris ne modifiait pas l'ultrastructure de la ML des CMs (**Fig.5**). On constate sur la **figure 5** que le motif « Crête » est conservé au cours du temps sur toutes les surfaces analysées. De plus, l'élasticité des CMs en condition témoin reste (**Fig. 5**) constante sur toute la durée de notre étude, autour d'une valeur de 3,6 ± 1,8 kPa.

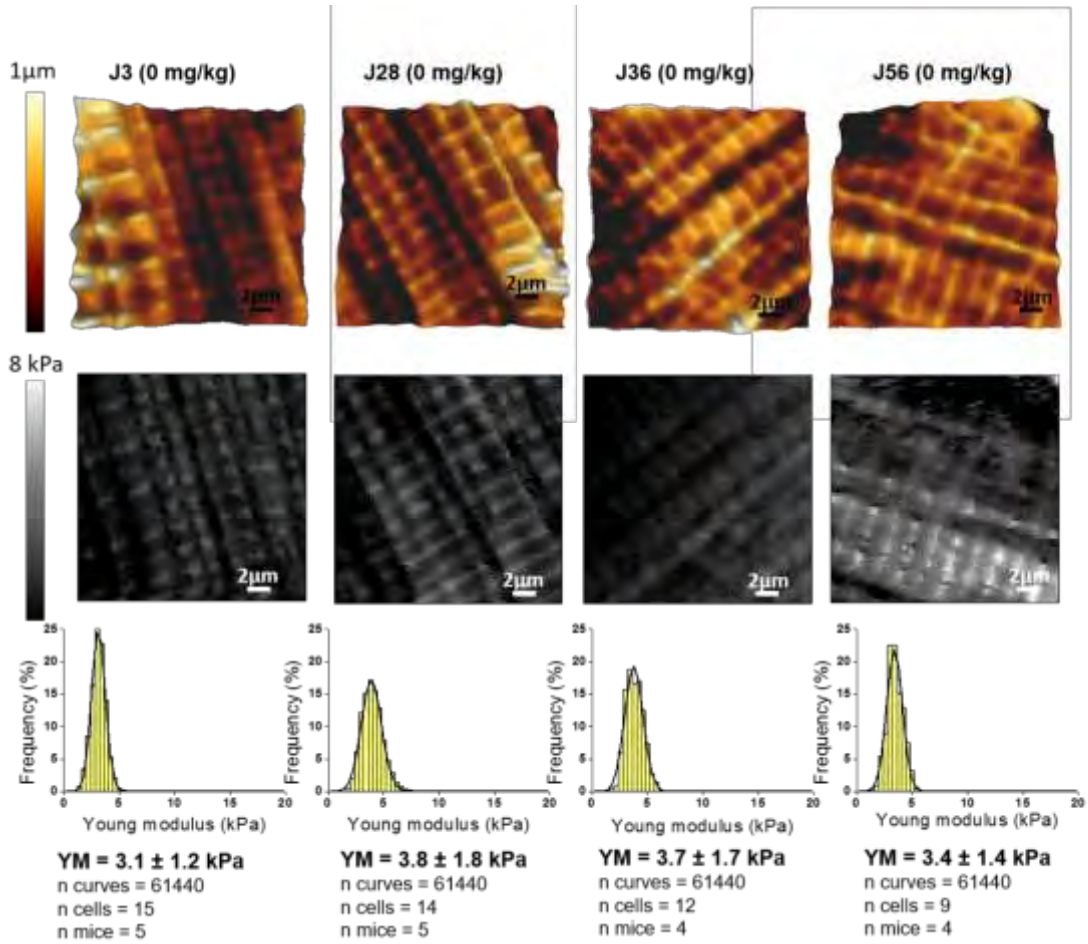


Figure 5: ***Analyse de la stabilité de la structure de la membrane des cardiomyocytes contrôles au cours du temps par AFM en mode spectroscopie de force.***
de haut en bas :
i)topographie de la surface analysée (10µmx10µm) – Exemple représentatif de la condition
ii) Carte d'élasticité (10µmx10µm et 4096 courbes de force) – Exemple représentatif de la condition
iii) Distribution des modules de Young (YM) extraits des courbes de force en fonction de leur fréquence d'apparition.
Un modèle Gaussien est appliqué pour déterminer la valeur médiane de la distribution observée.
Pour le ***groupe contrôle J3 (0mg/kg)*** *le YM moyen est de 3,1 ± 1,2 kPa.*
Le ***groupe J28 (0mg/kg),*** *la distribution est centrée sur 3.8 ± 1.8 kPa.*
Pour le ***groupe J35 (0 mg/kg),*** *présente un YM moyen de 3,7 ± 1,7kPa.*
Pour le ***groupe J56 (0mg/kg),*** *le YM moyen est de 3,4 ± 1,4kPa*

Analyse, par AFM, de l'évolution de la ML des CMs lors d'un traitement à la Dox.

Pour rappel, ces expériences ont été réalisées sur des CMs vivants, immobilisés sur Laminine et maintenus dans une atmosphère contrôlée (37°C, CO_2). Le mode Spectroscopie de Force de l'AFM (Nanowizard II, JPK) a été utilisé pour acquérir des cartes d'élasticité de 10 µm de côté sur la surface de la ML des CMs. Ces cartes correspondent à 4096 courbes de forces qui suivent une matrice spatiale de 64x64 positions (chaque pixel de la carte d'élasticité correspond à une courbe de force). En condition témoin (injection PBS), précédemment décrite, la ML présente une

topographie périodique organisée en creux/crêtes et une élasticité moyenne de 3,6 ± 1,8 kPa. Les CMs isolés des cœurs de souris ayant été traités de façon hebdomadaire par une dose de Dox de 5mg/kg, montrent une évolution de leur ML que nous avons mesuré à J3 (5 mg/kg), J28 (25 mg/kg), J36 (30 mg/kg) et J56 (45 mg/kg) (Fig. 6).

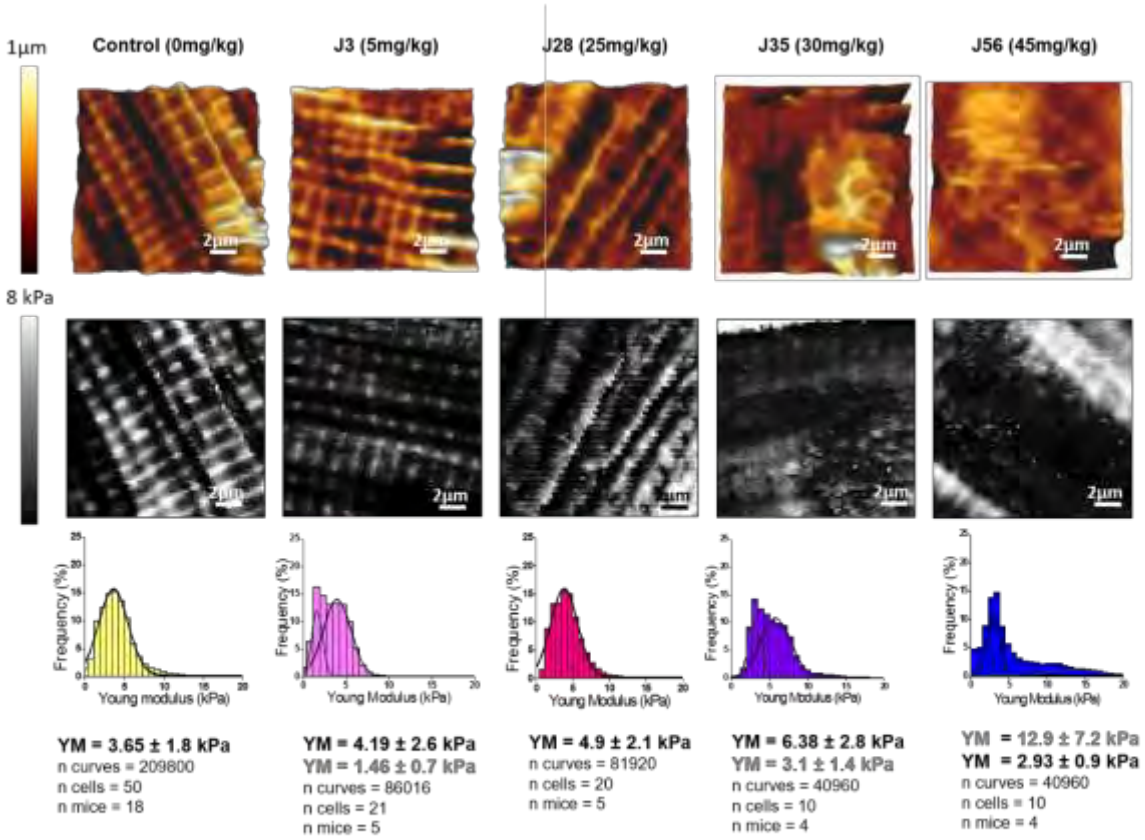


Figure 6: ***Analyse qualitative des effets de la Dox in vivo sur la structure de la membrane latérale du cardiomyocytes par AFM en mode spectroscopie de force.***
de haut en bas :
i)topographie de la surface analysée (10µmx10µm) – Exemple représentatif de la condition
ii) Carte d'élasticité (10µmx10µm et 4096 courbes de force) – Exemple représentatif de la condition
iii) Distribution des modules de Young (YM) extraits des courbes de force en fonction de leur fréquence d'apparition.
Un modèle Gaussien est appliqué pour déterminer la valeur médiane de la distribution observée.
Pour le ***groupe contrôle (0mg/kg)*** *le YM moyen est de 3,6 ± 1,8 kPa.*
Pour le ***groupe J3 (soit une dose injectée de 5 mg/kg),*** *la distribution est de type bimodal et se déconvolue en deux gaussiennes centrée respectivement sur 1,5 ± 0,7 kPaet.4,2 ± 2,6 kPa.*
Le ***groupe J28 (25 mg/kg)*** *présente lui un YM moyen de 4,9 ± 2,1 kPa.*
Pour le ***groupe J35 (30 mg/kg),*** *a distribution est de type bimodal et se déconvolue en 2 gaussiennes centrée respectivement sur6,4 ± 2,8 kPa et 3,1 ± 1,4kPa.*
Pour le ***groupe J56 (45 mg/kg),*** *la distribution est de type bimodal et se déconvolue en 2 gaussiennes centrée respectivement sur 12,9 ± 7,2 kPa et 2,9 ± 0,9 kPa*

Pour la cohorte J3 (5 mg/kg), nous observons une topographie et une carte d'élasticité proche de celles qui sont observées en conditions témoin. Cependant, la distribution des YM en fonction de la fréquence d'apparition présente une dispersion différente de la cohorte témoin. En effet, notre distribution peut être déconvoluée en deux gaussiennes. Une première centrée sur 4,2 ± 2,6 kPa et donc proche de la valeur des YM moyens trouvés en conditions témoin, et une deuxième qui est centrée sur une valeur plus basse de YM, de 1,5 ± 0,7 kPa. Cette valeur pourrait représenter l'apparition d'un motif « plat », précédemment défini, sur la surface membranaire des CMs.

Pour la cohorte J28 (25 mg/kg), nous observons une topographie et une carte d'élasticité qui perdent leur périodicité dans le motif « crête ». La distribution des YM pour cette cohorte se traduit par une Gaussienne centrée sur 4,9 ± 2,1 kPa.

Concernant la cohorte J35 (30 mg/kg), la ML perd sa structure organisée aussi bien au niveau topographique qu'au niveau de la carte d'élasticité. La distribution des YM extraits des cartes d'élasticité présente une disparité plus importante que pour les autres cohortes. La déconvolution en deux gaussiennes permet de mettre en évidence deux groupes, un centré sur une valeur de YM à 3,1 ± 1,4 kPa et un second groupe centré sur une élasticité de 6,4 ± 2,8 kPa.

Pour la dernière cohorte étudiée par AFM, J56 (45 mg/kg), la désorganisation à la surface des CMs est encore plus accentuée, la périodicité des crêtes n'est plus détectable. En effet, la distribution des YM en fonction de la fréquence d'apparition montre une importante dispersion. La déconvolution de la distribution en gaussienne met en évidence une population centrée sur une élasticité de 2,9 ± 0,9 kPa et une autre autour de 12,9 ± 7,2 kPa.

Cette analyse par AFM permet d'observer une évolution au cours du traitement chimiothérapeutique. Cette évolution se traduit au niveau topographique par une dégradation de l'ultrastructure de la ML des CMs avec :

- Une désorganisation de la ML qui traduit des anomalies structurales des SSM qui progressivement tendent à disparaitre.
- Les zones de la ML où les SSM ont disparus font place à des zones avec un motif plat. Ce motif va progressivement représenter la majorité de la surface de la membrane du CM.
- Puis des protrusions à la surface de la ML apparaissent qui illustrent la migration des IFM au niveau du sarcolemme et la perte de l'intégrité du CM.

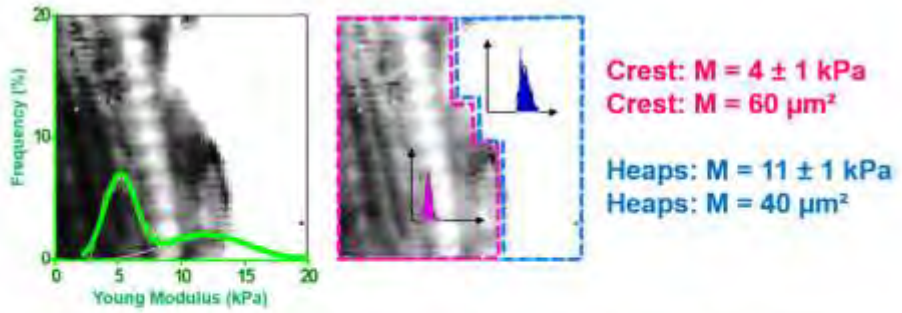
Pour compléter cette analyse qualitative et quantifier ces évolutions, nous avons développé une nouvelle méthode d'analyse permettant de mettre en évidence la disparition et l'apparition de ces motifs Crêtes/Plat/Protrusions (précédemment décrit) qui provoquait une hétérogénéité de nos cartes d'élasticité.

Méthode de quantification de l'hétérogénéité des données nanomécaniques de la surface des CMs

Les distributions précédemment décrites ont montré la dégradation de la structure de la surface des CMs au cours d'une chimiothérapie à la Dox. Nous avons remarqué au cours de cette analyse que les cartes d'élasticité présentaient une hétérogénéité de plus en plus importante au cours de l'évolution du traitement, ce qui se traduit par des distributions de module de Young en fonctions de la fréquence d'apparition de plus en plus larges. Cependant, cette analyse qualitative n'est pas suffisante et nous avons voulu quantifier ces évolutions. Pour ce faire, nous avons divisé chaque carte d'élasticité en fonction des motifs présents, comme le décrit la **figure 7**.

Sur la carte présentée **figure 7**, 2 zones ont été définies. Une première correspondant au motif « crest», dont l'aire est de 57,6 μm^2 avec une élasticité de 4,12 ± 0,8 kPa et un motif « heaps », dont l'aire est de 39,6 μm^2 avec une élasticité 10,8 ± 1,2 kPa.

Ainsi, chaque carte a été découpée en autant de zones que de motifs. Ici, nous avons identifié 344 zones sur nos 111 cartes d'élasticité. L'aire et l'élasticité moyenne de chaque zone a été calculée pour déduire, pour chaque carte, l'aire recouverte et l'élasticité des motifs "crêtes", "plat" et "protrusion". Une fois ces analyses fastidieuses réalisées, nous avons été en mesure de quantifier l'aire et l'élasticité de chaque motif tout au long du traitement chronique à la Dox.



Cohort	Crest		Flat		Heaps	
	YM (kPa)	Area (µm²)	YM (kPa)	Area (µm²)	YM (kPa)	Area (µm²)
J35 (30mg/kg)	4	60	X	0	11	40

Figure 7: ***Stratégie d'analyse des cartes d'élasticité hétérogènes.***
A gauche : *exemple d'une carte d'élasticité de 10x10 µm² sur laquelle la distribution, en vert, des modules de Young, est superposée : la distribution de type bimodale est corrélée à la présence de deux des 3 motifs définis dans la Figure 4. Les zones correspondantes aux motifs crête et protrusion sont analysées de manière indépendante selon le schéma proposé sur la carte d'élasticité présentée à droite. Chaque carte d'élasticité générée dans ce travail a alors été analysée (YM moyen et surface) selon les 3 motifs préalablement définis (Crêtes / Plat / Protrusion) et consigné dans un tableau (Tab annexe 1). Ici les entrées du tableau et un exemple de résultat sont présentés au bas de la figure. Le tableau exhaustif (Tab annexe 1) indique donc le groupe d'appartenance du CM étudié, puis pour chaque motif, l'élasticité du motif ainsi que sa surface. Dans l'exemple, la carte comprend 2 motifs, crêtes et protrusion, reconnus grâce à l'échelle de couleur (noir = plat ; blanc = protrusion ; alternance périodique de blanc et noir = crêtes).*

Evolution de la surface représentée par les des différents motifs de la ML des CMs lors d'un traitement de Dox.

Avant d'analyser la surface occupée par les différents motifs sur les cartes d'élasticité des CMs isolés à partir des souris ayant reçu différentes doses de Dox, nous avons vérifié que chaque zone correspondant à un motif défini (crêtes/plat/protrusion) présentait un YM stable malgré les différentes doses de Dox. Pour cela, un test statistique (ANOVA avec un sur-test de Bonferroni) a permis de constater la stabilité des valeurs des YM, représentant les motifs, avec l'augmentation de la dose de Dox injectée (**Fig.8A-C**). A l'aide de cette méthode d'analyse, nous avons établi un histogramme représentant, pour chaque motif, (Crête, Plat, Protrusion) l'évolution de son aire en fonction du temps et de la dose de Dox (**Fig. 8D-F**).

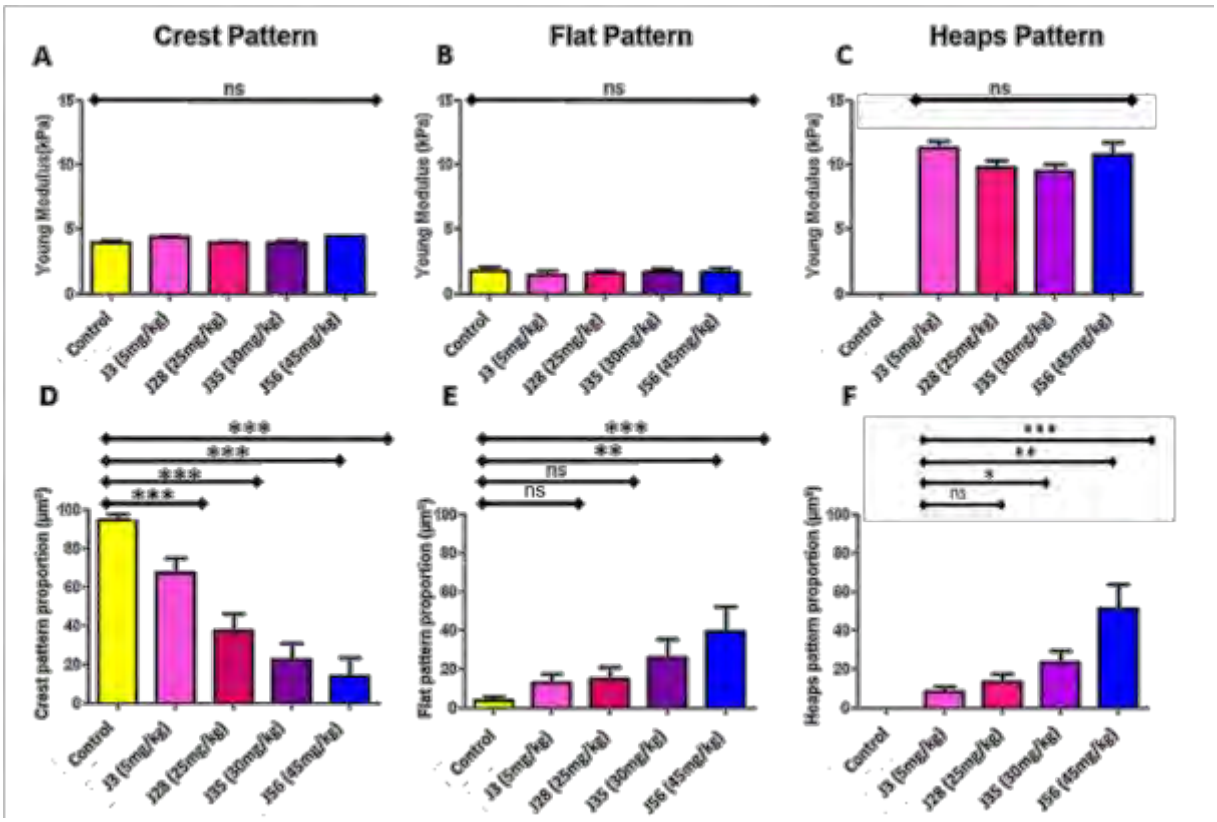


Figure 8: ***Quantification des effets de la Dox in vivo sur les différents motifs de la membrane latérale des CMs.*** *Ces données statistiques ont été obtenues par un Test ANOVA avec un test post hoc de Bonferroni (avec n souris = 25, n cellules = 86, n zones = 344).*

Les histogrammes du haut représentent la moyenne des YM

Les histogrammes du bas représentent la moyenne de l'aire occupée par le motif sur une surface de 100µm².

Les barres noires au-dessus de l'histogramme représentes la significativité de test en comparant les différentes cohortes de souris traitées (située au niveau de la connexion droites du trait noir) à la cohorte contrôle (située au niveau de la connexion gauche du trait noir).

***A: Statistique pour le motif crêtes**, l'histogramme du haut représente le YM moyen obtenue pour l'étude de ce motif selon les différentes cohortes de souris, cela montre aucune différence significative de la valeurs moyenne de l'élasticité du motifs crêtes au cours du traitement Dox. L'histogramme du bas représente l'espace pris par le motif crêtes sur les cartes d'élasticité étudiées selon les groupes. Une diminution significative est observée dès J28 (25mg/kg) de l'espace occupé par ce motif. Les CMs contrôles présentent 95µm² d'espace occupé par le motif crêtes, le groupe J3 (5mg/kg) ne présente plus que 70µm², J28 (25mg/kg) 36µm², J35 (30mg/kg) 24µm² et J56 (45mg/kg) 18µm².*

***B: Statistique pour le motif Plat**, l'histogramme du haut représente le YM moyen obtenue pour l'étude de ce motif selon les différentes cohortes de souris, cela montre aucune différence significative de la valeurs moyenne de l'élasticité du motif plat au cours du traitement Dox. L'histogramme du bas représente l'espace pris par le motif plat sur les carte d'élasticité étudiées selon les groupes. Une augmentation de l'espace occupé par ce motif est observée au cours de l'avancé du traitement. Les CMs contrôles présentent 5µm² d'espace occupé par le motif plat, le groupe J3 (5mg/kg) présente 12 µm², J28 (25mg/kg) 15 µm², J35 (30mg/kg) 28 µm² et J56 (45mg/kg) 38 µm².*

***C: Statistique pour le motif Protrusion,** l'histogramme du haut représente le YM moyen obtenue pour l'étude de ce motif selon les différentes cohortes de souris, cela montre aucune différence significative de la valeurs moyenne de l'élasticité du motifs protrusion au cours du traitement Dox. L'histogramme du bas représente l'espace pris par le motif protrusion sur les cartes d'élasticité étudiées selon les groupes. Une augmentation significative est observée dès J3 (5mg/kg) de l'espace occupé par ce motif. Les CMs contrôles ne présentent pas le motif protrusion, le groupe J3 (5mg/kg) il y a apparition de ce motif avec un espace de 10 µm², J28 (25mg/kg) 17 µm², J35 (30mg/kg) 22µm² et J56 (45mg/kg) 55µm².*

ns Non significatif; P<0,1, ** P <0,01; *** P <0,001*

Le test ANOVA avec un sur-test de Bonferroni a été utilisé pour démontrer la significativité des modifications de la ML observées lors du traitement (**Tab. 1**). Les résultats obtenus pour le motif « Crête » (**Fig. 8D**) montre une diminution de ce motif dès la première injection de Dox. En effet, nous pouvons voir que dès 3 jours de traitement, l'espace occupé par ce motif diminue de façon significative (P <0,001). L'aire occupée par le motif crête passe de 93 ± 13,6 μm^2 chez les CMs témoins (Control) à 68 ± 11,5 μm^2 pour la cohorte J3 (5mg/kg). A J28 (25 mg/kg), cet espace diminue encore et ne représente plus qu'une zone moyenne de 36 ± 19,4 μm^2 (avec une diminution significative avec la cohorte témoin, P <0,001). Les temps suivant observés, J35 (30mg/kg) et J56 (45mg/kg) après le début du traitement, présentent la même tendance. Le motif crête de la surface des CMs après ces temps de traitement Dox diminue de façon importante, puisqu'il ne représente plus qu'une zone moyenne de 21 ± 17,4 μm^2 pour J35 (30mg/kg) et 13 ± 15,5 μm^2 pour J56 (45mg/kg) μm^2 (avec une diminution significative avec la cohorte témoin, P <0,001).

A l'inverse, le motif « Plat » voit sa présence augmenter au cours du traitement Dox. Chez les CMs isolés de la cohorte témoin (Control), il n'est présent que de façon mineure, avec une zone moyenne de 4 ± 4,7 μm^2, alors que dès la première injection de 5 mg/kg nous observons ce motif présent sur une zone moyenne de 12 ± 8,4 μm^2. Pour les temps suivant, J28 (25mg/kg), J35 (30mg/kg) et J56 (45mg/kg) de traitement, cette proportion augmente avec respectivement des zones moyennes de 15 ±12,7, 25 ± 15,3 et 39 ± 20,5 μm^2. Cette augmentation de l'aire occupée par le motif plat devient significative par rapport à la cohorte témoin avec P <0,01 pour J35 (30mg/kg) et P <0,001 pour J56 (45mg/kg).

De façon similaire, le motif « Protrusion » voit également sa présence augmenter au cours du traitement. Chez les CMs témoins (Control) il est totalement inexistant. Mais dès la première injection de Dox, nous observons l'apparition de ce motif sur une zone moyenne de 8 ± 4,7 μm^2. Pour les temps suivant, J28 (25mg/kg), J35 (30mg/kg) et J56 (45mg/kg) jours de traitement, nous observons cette présence toujours plus importante avec respectivement des zones moyennes de 14 ± 9,0 ; 21 ± 11,6 et 51± 19,1μm^2. Cette augmentation de la présence du motif protrusion devient significative par rapport à la cohorte témoin avec P <0,1 pour J28, P <0,01 pour J35 et P <0,001 pour J56. Après 56 jours de traitement (45 mg/kg), nous pouvons constater que c'est ce motif « protrusion » qui est présent de façon majoritaire à la surface des CMs.

Cette analyse nous a permis de mettre en évidence que dès les trois premiers jours de traitement à la Dox (5 mg/kg) et en accord avec les données fonctionnelles de contraction cardiaques en strain (Fig 3D), les CMs sont déjà impactés et montrent des anomalies ultrastructurales de surface. Après ces observations, il a été important de démontrer si cette désorganisation architecturale de la ML est bien liée à un effet direct de la molécule de Dox sur le CM ou à un impact indirect lié à des effets systémiques.

Effet de la Dox sur la ML des CMs isolés en condition in vitro

Afin d'observer les effets directs de la Dox sur les CMs, nous avons effectué des tests *in vitro* sur des CMs isolés à partir de souris (C57/Bl6). Après mise en culture, ces CMs ont été incubés avec différentes doses de Dox, 1 ;1,5, 2 ; 2,5 et 5 µM pendant un temps court de 5 minutes (37°C, 5 % Co2) (**Fig. 9**).

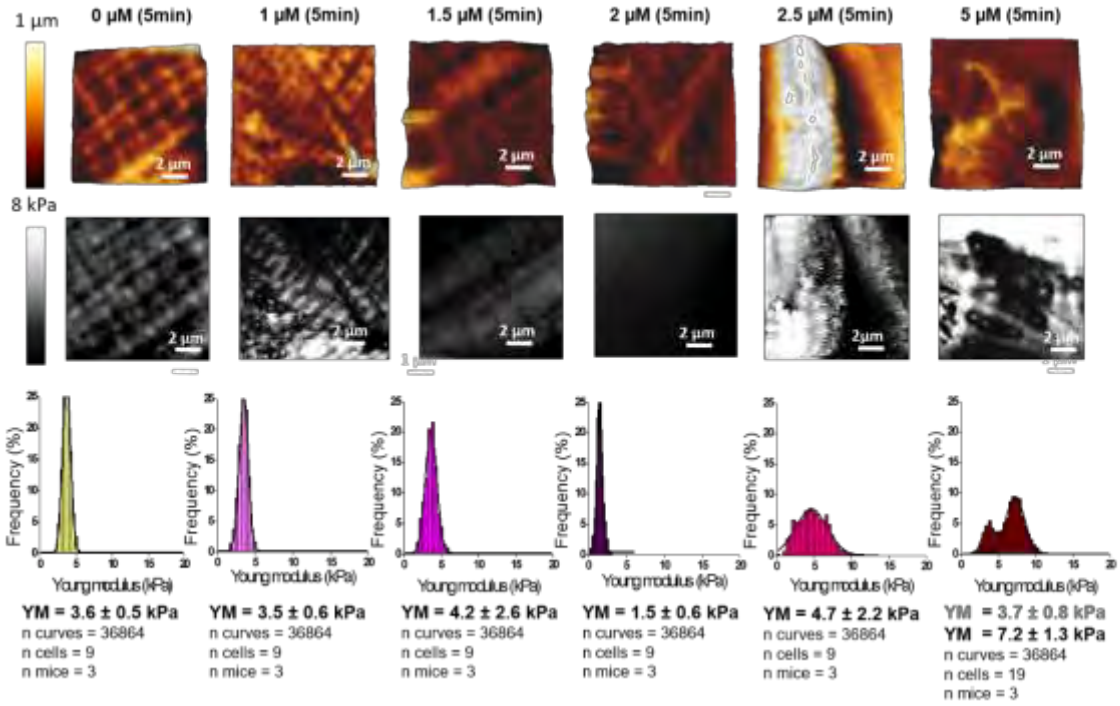
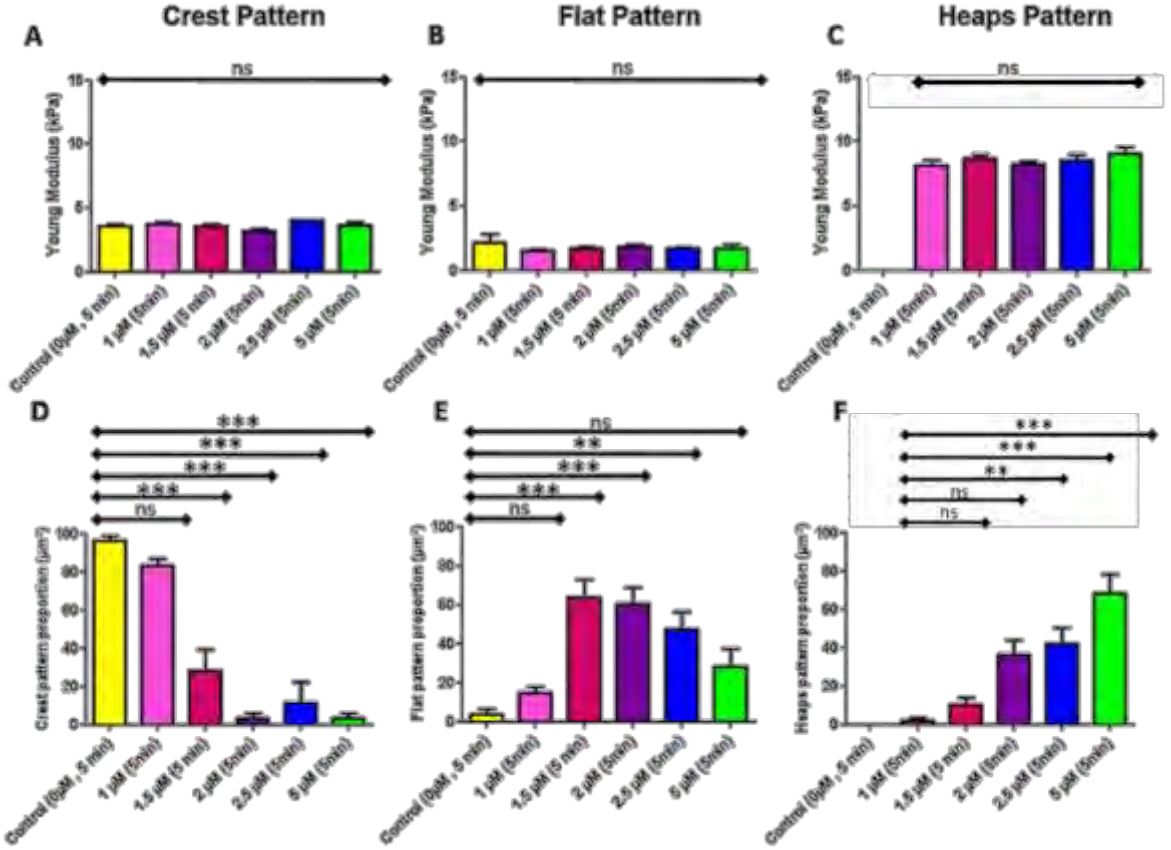


Figure 9: ***Analyse de l'effet in vitro de la Dox sur la structure de la membrane latérale du cardiomyocytes par AFM en mode spectroscopie de force.***
de haut en bas :
i)topographie de la surface analysée (10µmx10µm) – Exemple représentatif de la condition
ii) Carte d'élasticité (10µmx10µm et 4096 courbes de force) – Exemple représentatif de la condition
iii) Distribution des modules de Young (YM) extraits des courbes de force en fonction de leur fréquence d'apparition. Un modèle Gaussien est appliqué pour déterminer la valeur médiane de la distribution observée.
Pour le ***groupe contrôle (mileu de culture)*** *le YM moyen est de 3,6 ± 1,8 kPa.*
Pour les ***CMs incubés pendant 5 min dans une solution de 1 µM de Dox****, la distribution des YM en fonction de la fréquence peut être représentée par une gaussienne centrée sur 3,6 ± 0,8 kPa,*
Pour les ***CMs incubés pendant5 min dans une solution de 1,5 µM de Dox****, la distribution des YM en fonction de la fréquence peut être représentée par une gaussienne centrée sur 4,2 ±2,6kPa,*
Pour les ***CMs incubés pendant5 min dans une solution de 2 µM de Dox****, la distribution des YM en fonction de la fréquence peut être représentée par une gaussienne centrée sur 1,5 ± 0,6 kPa*
Pour les ***CMs incubés pendant5 min dans une solution de 2,5 µM de Dox****, la distribution des YM en fonction de la fréquence peut être représentée par une gaussienne centrée sur 4,7 ± 2,2 kPa,*
Pour les ***CMs mise en contact 5 min dans une solution de 5 µM de Dox****, la distribution est de type bimodal et se déconvolue en 2 gaussiennes centrée respectivement sur 3,7 ± 0,8 kPa et 7,2 ± 1,3 kPa*

On peut ainsi voir une altération de la ML qui augmente avec la concentration de Dox. Dès que les CMs sont incubés avec une solution de Dox à 1µM pendant 5 minutes, une diminution de la périodicité du motif crête est visible. De plus, ce changement topographique est corrélé à une désorganisation des cartes d'élasticité. Ces changements topographiques et élastiques sont accentués par l'augmentation de la dose de Dox. De plus, ces analyses semblent montrer le même

schéma d'évolution que celui observé précédemment sur notre protocole mimant un traitement chimiothérapique. Une première étape de désorganisation des crêtes avec une perte progressive de ces dernières, puis l'apparition du motif plat. A partir d'un traitement à de 2 µM de Dox, le motif plat semble recouvrir la majorité de la surface de la ML des CMs étudiés. Aux concentrations plus importantes, une formation de protrusions sur la surface de la ML est observée, ce motif voit sa proportion augmenter à mesure de l'augmentation de la dose. Les acquisitions par AFM aux concentrations de Dox supérieures n'ont pas été possibles en raison d'un taux de mortalité important et de la grande fragilité membranaire des CMs survivants. Afin de rendre compte de nos observations sur l'évolution de la ML en présence d'une dose croissante de Dox, nous avons utilisé la même méthode d'analyse que précédemment décrite. Pour cela, chaque carte d'élasticité (n cellules = 54) a été divisé en zones (n = 104) selon leurs motif crêtes / plat / protrusion. La surface occupée par ces différents motifs en fonction de la concentration de Dox utilisé pour traiter les CMs, va pouvoir être comparée avec le groupe témoin (Control, milieu de culture) afin de quantifier précisément les changements de la ML (**Fig.10**).



<u>Figure 10</u> : ***Quantification des effets directe de la Dox in vitro sur les différents motifs de la membrane latérale des CMs***

Les histogrammes du haut représentent la moyenne des YM

Les histogrammes du bas représentent la moyenne de l'aire occupée par le motif sur une surface de 100µm².

Les barres noires au-dessus de l'histogramme représentes la significativité de test en comparant les différentes cohortes de souris traitées (située au niveau de la connexion droites du trait noir) à la cohorte contrôle (située au niveau de la connexion gauche du trait noir).

***A: Statistique pour le motif crêtes**, l'histogramme du haut représente le YM moyen obtenue pour l'étude de ce motif selon les différentes cohortes de souris, cela montre aucune différence significative de la valeurs moyenne de l'élasticité du motifs crêtes au cours du traitement Dox. L'histogramme du bas représente l'espace pris par le motif crêtes sur les carte d'élasticité étudiées selon les groupes. Une diminution significative est observée dès 1.5 µM (5min) de l'espace occupé par ce motif. Les CMs contrôles présentent 96 µm² d'espace occupé par le motif crêtes, le groupe 1 µM (5min) ne présente plus que 83 µm², 1.5 µM (5min) 26 µm², 2 µM (5min) 3 µm², 2.5 µM (5min) 11 µm² et 5 µM (5min) 3 µm²,*

***B: Statistique pour le motif Plat**, l'histogramme du haut représente le YM moyen obtenue pour l'étude de ce motif selon les différentes concentrations de Dox, cela montre aucune différence significative de la valeurs moyenne de l'élasticité du motif plat. L'histogramme du bas représente l'espace pris par le motif plat sur les cartes d'élasticité étudiées selon les groupes. Une augmentation de l'espace occupé par ce motif est observée au cours de l'avancé du traitement. Les CMs contrôles présentent 4 µm² d'espace occupé par le motif plat, le groupe 1 µM (5min) présente une aire 15 µm², 1.5 µM (5min) 64 µm², 2 µM (5min) 61 µm², 2.5 µM (5min) 47 µm² et 5 µM (5min) 28 µm².*

***C: Statistique pour le motif Protrusion,** l'histogramme du haut représente le YM moyen obtenue pour l'étude de ce motif selon les différentes concentrations de Dox, cela montre aucune différence significative de la valeurs moyenne de l'élasticité du motifs protrusion. L'histogramme du bas représente l'espace pris par le motif protrusion sur les cartes d'élasticité étudiées selon les groupes. Une apparition du motif est observée dès 1 µM (5min) avec un espace occupé de 2 µm² et augmentation de cette espace pour 1.5 µm² avec une aire de 11 µm². Une augmentation significative est observable pour une concentration de 2 µM (5min), 2.5 µM (5min) et 5 µM (5min) de l'espace occupé par ce motif avec une aire de 36 µm² pour 2 µM (5min), 42 µm² pour 2.5 µM (5min) et 68 µm² pour 5 µM (5min).*

Les données statistiques ont été obtenu par un Test ANOVA avec un test post hoc de Bonferroni (avec n souris = 18, n cellules = 54 zone = 344).

ns Non significatif; P<0,1, ** P <0,01; *** P <0,001*

Le test ANOVA avec un sur-test de Bonferroni a été utilisé pour démontrer la significativité des modifications de la structure membranaire. Les résultats obtenus pour le motif « Crête » (**Fig. 10D**) montre une diminution du motif dès le traitement à 1 µM de Dox. Cette aire occupée par le motif crêtes passe d'environ 96 ± 3,9 μm^2 chez les CMs du groupe témoin (Control) à 83 ± 5,3 μm^2 pour le groupe de CMs traités. A partir de 1.5 µM de Dox, cette espace diminue encore et ne représente plus qu'une zone moyenne de 26 ± 16,3 μm^2 (avec une diminution significative avec le groupe témoin, P <0,001). Les concentrations suivantes croissantes de Dox, 2 µM (5min), 2.5 µM (5min) et 5 µM (5min), présentent la même tendance. Leurs zones encore organisées en motif crêtes diminuent de façon importante, elles ne représentent plus qu'une zone moyenne de 3 ± 3,5 μm^2 à 2 µM, 11 ± 5,3 μm^2 à 2,5 µM et 3 ± 3,5 μm^2 à 5 µM (avec une diminution significative de P <0,001 pour 2 µM, ainsi que pour 2,5 µM et 5 µM avec la cohorte témoin).

A l'inverse le motif « Plat » voit sa présence augmenter au cours du traitement. Chez les CMs témoin (control), il n'est présent que de façon mineure, avec une zone moyenne de 4 ± 3,9 μm^2, alors que dès la dose de 1 µM, nous observons ce motif présent sur une zone moyenne de 15 ± 5,0 μm^2. Pour les doses suivantes à 1,5 µM et 2 µM, nous observons cette proportion augmenter avec respectivement des zones moyennes de 64 ± 14,5 et 61 ± 12,2 μm^2. Cette augmentation de l'aire occupée par le motif plat devient significative par rapport au groupe témoin avec P <0.001 pour 1,5 µM, et 2 µM. Pour les doses suivantes de 2.5 µM et 5 µM, une diminution de présence de ces motifs est observée avec des zones occupées pour ce motif plat de respectivement 47 ± 13,9 et 28 ± 13,3 μm^2.

De façon inversement corrélée, le motif « Protrusion » voit sa présence augmenter de façon significative lors de la baisse de proportion du motif « plat ». Chez les CMs témoin, ce motif « Protrusion » est inexistant. Mais dès un traitement de 1µM de Dox, nous observons l'apparition de ce motif sur une zone moyenne de 2 ± 2,0 μm^2. Pour Les doses suivantes de 1.5 µM, 2 µM, 2.5 µM et 5 µM, le motif "protusion" augmente de façon toujours plus importante avec respectivement des zones moyennes de 11 ± 5,3, 36 ± 11,8, 42 ± 13,3 et 68 ± 17,8 μm^2. Cette augmentation de la présence du motif « Protrusion » devient significative par rapport au groupe de CMs témoin avec P <0.01 pour 2 µM, P <0,001 pour 2,5 µM et 5 µM. Après un traitement des CMs pendant 5 minutes CMs avec 5 µM, nous constatons que le motif « protrusion » prédomine à la surface des CMs.

Comme précédemment, cette analyse, nous a permis de mettre en évidence que les CMs sont impactés et montrent des anomalies structurales très précocement dès la mise en présence d'une dose faible de Dox (1 µM, 5 min), Ces anomalies étant comparables à celles observées *in vivo* suggèrent fortement que l'impact de la Dox observé lors de notre protocole mimant une chimiothérapie *in vivo* chez la souris est dû à un effet direct de la molécule de Dox sur les CMs.

Discussion

Les travaux exposés ici reposent sur la mise en place d'un protocole innovant chez la souris mimant le traitement chimiothérapique à la Dox chez l'Homme (protocole de doses cumulées de Dox). Cette approche a permis de constater le délai important entre le début du traitement et l'installation d'une IC. En effet, comme nous l'avons précédemment mentionné, les patients ayant subi une chimiothérapie de Dox peuvent contracter une IC des années plus tard voir une dizaine d'années après l'arrêt du traitement. Ce protocole nous a permis de retranscrire ce phénomène chez la souris, cette dernière ne développant une IC que 56 jours après le début du traitement. Cette IC a été confirmée en mesurant, par échographie, les capacités contractiles du cœur. L'analyse de la FE nous permet d'affirmer l'installation de l'IC. Nous avons aussi vérifié que cette IC est bel est bien une IC dilatée comme la littérature le décrit pour la Dox[41]. Pour cela, nous avons mesuré le volume ventriculaire en diastole ainsi que son diamètre interne et nous avons pu caractériser une IC dilatée à partir d'une dose cumulée de Dox de 50 mg/kg soit 70 jours après le début du traitement.

L'intérêt de notre protocole est donc de donner accès aux anomalies apparaissant bien avant que la fonction contractile ne soit affectée. Ces anomalies précoces ont d'abord été caractérisées à l'aide d'un mode émergent en échographie : le Strain. Ce mode d'échographie permet, entre autres, de quantifier la déformation longitudinale du ventricule gauche. Ce paramètre montre des anomalies dès la première dose de Dox injecté (5mg/kg). En effet, 3 jours après le début du traitement nous constatons une diminution de la capacité du VG à se déformer longitudinalement. Pour comprendre si la diminution de la capacité à se déformer du myocarde est liée à des anomalies au niveau des CMs, et plus particulièrement au niveau de la ML, nous avons analysé l'ultrastructure de cette unité contractile par SF et cela à différents temps au cours du traitement. Il est connu que la cardiotoxicité induite par un traitement à la Dox évolue en IC. Dans une étude précédente, nous avons pu mettre en évidence une modification structurale précoce de la ML des CMs en amont d'une IC provoqué par un infarctus du myocarde après ligature permanente des coronaires[27].

En ayant connaissance du fait qu'il existe des changements morphologiques précoce de la membrane en amont de la mise en place d'une IC à la suite d'un infarctus, nous avons observé l'ultrastructure de la ML par SF à différends temps du traitement à base de Dox jusqu'à l'établissement d'une IC. Ces observations ont été faites à 3, 28, 35 et 56 jours après le début des injections hebdomadaires de Dox. Les souris présentent une IC après une dose cumulée de 40 mg/kg, soit 56 jours après le début du traitement. Sachant que nos travaux portent sur les mécanismes cellulaires contribuant au développement de l'IC, nous avons donc naturellement

arrêté les analyses à J56 (40 mg/kg). Les analyses topographiques et nanomécaniques ont été faites par SF avec une matrice spatiale de 4096 courbes de force sur une surface de 100 μm^2. L'analyse de la topographie montre une désorganisation croissante des crêtes au cours du temps de traitement. En effet, les CMs contrôles présentent une surface membranaire hautement organisée avec une succession de creux et de crêtes avec une périodicité établie[42,43,27]. Mais dès la première dose de traitement à la Dox, nous avons observé une dégradation des motifs présents à la surface de la membrane des CMs, effet qui s'accentue avec l'augmentation de la dose de Dox injectée. Cette dégradation du motif crêtes fait place à l'apparition du motif plat, puis progressivement, à des doses cumulées de Dox plus importantes, à l'apparition du motif protrusions, jusqu'à la disparition quasi-totale du motif crêtes. Cette dégradation de la structure est directement corrélée avec une désorganisation des cartes d'élasticité. En effet, nous pouvons observer sur les cartes d'élasticité une correspondance entre la désorganisation de la topographie des CMs et l'apparition de nouveaux motifs élastiques. Cependant, après une analyse classique de la distribution des YM de toutes les cartes d'élasticité, l'hétérogénéité des motifs présents sur la ML n'apparaissait pas. Ainsi, pour rendre compte de cette évolution hétérogène et visible sur les différentes cartes d'élasticité, nous avons comparé l'espace occupé par les différents motifs, préalablement définis. Cette analyse nous a permis de mettre en évidence l'effet délétère de la Dox sur la ML des CMs isolés de souris traitées dès la première injection, de Dox à une concentration de 5mg/kg. Ces résultats expliquent probablement les troubles contractiles détectés chez ces mêmes souris par l'échographie strain à cette même dose. De façon intéressante, les changements structuraux significatifs de la ML du CMs détectés au cours du traitement présentent une grande similarité avec l'évolution de l'architecture de surface du CMs que nous avons observée après un infarctus de myocarde chez la souris jusqu'au développement d'une IC aigüe[27]. En effet, dans ces deux situations pathologiques, nous avons observé une perte précoce de la structure organisée en creux/crêtes de la membrane avec une apparition d'un motif « plat », puis la formation de protrusions sur la ML indicatrice de mort imminente du CM. L'étude des changements morphologiques de la surface de la ML du CM après un infarctus a montré, par un couplage de l'AFM avec du TEM, que les différents motifs observés au cours du temps étaient corrélés directement à un remaniement des mitochondries présentes sous le sarcolemme du CM. En effet, l'apparition d'un motif plat correspond à la perte/mort des SSM, responsables de cette structure caractéristique de crêtes chez le CM sain. Par la suite, l'apparition de protrusions à la surface membranaire du CM est liée à la remontée des IFM qui viennent former des amas subsarcolemmale suite à une désorganisation importante de l'appareil contractile du CM[27]. Cette similarité laisse penser que l'évolution vers une IC induite par une chimiothérapie à la Dox met en jeu les mêmes mécanismes cellulaires que ceux impliquée dans l'apparition de l'IC post- infarctus

du myocarde. Dans le futur, il sera intéressant de voir si la détérioration précoce de la structure de la ML est un phénomène commun au développement d'IC toutes origines confondues.

Cependant, le fait que notre étude en AFM repose sur une analyse sur cellules isolées, sorties de leur contexte tissulaire cardiaque, pourrait induire un bais de sélection. En effet, lors de la préparation des CMs pour l'AFM, une étape d'immobilisation/adhésion des cellules a été nécessaire. Cette étape sélectionne les cellules en bonne santé, capables d'adhérer à leur substrat matriciel, la laminine. Le taux de mortalité des CMs n'est alors pas pris en compte. Il en est de même pour les CMs présentant une membrane trop fragile pour supporter le contact avec la pointe AFM. Cependant cette sélection peut être un premier indicateur quant à la fragilité de la ML, en effet plus les doses cumulées du traitement augmentent, plus le nombre de cellules adhérées diminue et plus le nombre de CM se déchirant lors de l'acquisition augmente. Heureusement, ce biais de sélection peut être éliminé grâce à l'analyse du tissu entier. Pour cette étude, nous avons donc lancé en parallèle des analyses de la structure des CMs au sein du tissu cardiaque par TEM afin de vérifier que nos observations AFM n'étaient pas liées à un biais technique. Nos résultats ont montré que, dans le tissu entier, des anomalies structurales apparaissant dès la première dose J3 (5 mg/kg) de traitement à la Dox (**Fig. annexe 2**). De plus, grâce au TEM, nous avons pu corréler les motifs élastiques à la désorganisation mitochondriale et ce de façon similaire au modèle d'IC post-infarctus. Ainsi, dans une phase précoce nous avons une désorganisation de la ML provoquée par une perte des SSM. Lorsque toutes les SSM ont disparu, la surface des CMs présente un motif plat. Dans temps, une étape de désorganisation de l'appareil contractile du CM commence qui va entrainer la remontée des IFM à la surface des CMs et former des protrusions précédant la rupture de la membrane et donc la mort du CM par nécrose.

Il est difficile d'étayer nos résultats avec d'autres études car aujourd'hui, il est difficile de trouver des travaux relatant les changements morphologiques au niveau nanométrique de la surface membranaire d'un CM lors d'une IC ou de sa mise en place. Seules quelques études réalisées à l'aide d'un autre type de microscopie à sonde locale, la Scanning Ion Conductance Microscopy (SICM), ont montré une désorganisation ionique de la surface des CMs en condition d'IC[44,40,45]. Ce changement ionique peut rendre compte de façon indirecte une modification structurale de la ML. Cependant, il ne faut pas oublier que cette technologie basée sur des échanges ioniques peut être biaisée par le fort caractère ionique du CM[46,47]. Par opposition, l'AFM n'est pas affectée par les concentrations d'ions et est directement liée à l'utilisation d'une pointe interagissant avec la surface de l'échantillon et permet en plus d'obtenir des données nanomécaniques[48]. Cette technique d'observation a révélé différents motifs, préalablement définis[27] et validés, qui ont illustré l'impact précoces de la Dox sur les CMs.

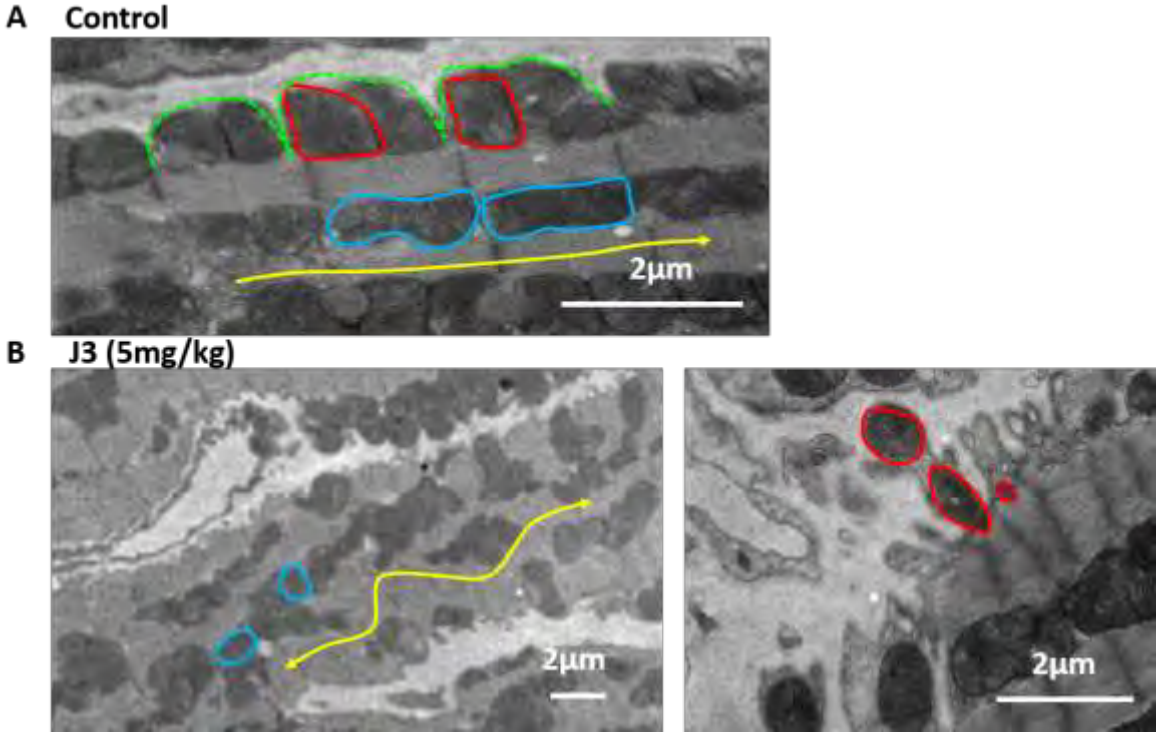
Cette étude est une étude novatrice dans le domaine de la recherche en cardiotoxicité d'une chimiothérapie à la Dox. En effet, nos résultats sont les premiers à s'intéresser à l'impact de la molécule de Dox au niveau de l'architecture de la cellule contractile et non pas aux mécanismes ROS-dépendant et aux anomalies métaboliques de la cellule[49,50]. Ces deux axes de recherches semblent faire intervenir des mécanismes moins précoces que les anomalies structurales. Les effets toxiques de la Dox au niveau métabolique du CMs ont pour conséquence une détérioration voire une mort des mitochondries[8] conduisant à une perte d'énergie, une apoptose, une peroxydation des acides gras provoquant la rupture de la ML, et la nécrose[51–54]. Il est évidant que la Dox impacte de façon majeure les mitochondries, mais dans les études récentes, les populations mitochondriales ne sont jamais différenciées alors que nos résultats indiquent un effet différentiel temporel selon le type de mitochondries (SSM ou IFM)[55,56]. De plus, grâce à nos analyses *in vitro*, nous avons montré que la détérioration de la structure de la ML suit le même schéma qu'observé en condition *in vivo*, c'est-à-dire qu'a dose faible (1µM, 5 min - 1.5 µM 5min) il a perte progressive de l'espace occupé par le motif crêtes pour laisser place à motif plat. A partir de dose plus importante (2 µM, 5 min – 2,5 µM, 5 min), le motif protrusion augmente son espace d'occupation au détriment du motif plat, jusqu'à recouvrir la majorité de la surface de la ML étudiée à une dose 5 µM (5min).

Notre étude, en permettant la mise en évidence de l'effet rapide et direct de la molécule de Dox sur les CMs, pourra permettre une prise en charge immédiate de ce paramètre. Cette prise de conscience pourra peut-être entrainer un changement de protocole thérapeutique chez les patients les plus sensible au niveau cardiaque, et/ou de diminuer la dose cumulée maximale à injecter. L'effet toxique de cette molécule n'est plus à démontrer [24,3,12,1], et les recherches dans le domaine de la cardioprotection sont en plein essor[57–61]. Cependant, il est nécessaire de s'intéresser à ce phénomène de modification structurale de la ML induit par une désorganisation mitochondriale, qui semble être immédiat, en plus des effets métaboliques, très étudiés[62,63,53,50,64], dans l'explication de la cardiotoxicité. Il serait intéressant à l'avenir d'utiliser l'AFM pour évaluer ces nouvelles pistes de cardioprotection contre la toxicité métabolique induite par la Dox et d'observer l'évolution structurale de la ML. La compréhension de cette cardiotoxicité de la Dox restera un domaine privilégié de la recherche afin d'améliorer les traitements luttant contre le cancer en limitant les effets secondaires encore trop importants.

Références

1. Force, T. & Wang, Y. Mechanism-Based Engineering against Anthracycline Cardiotoxicity. *Circulation* CIRCULATIONAHA.113.003688 (2013). doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003688
2. Pui, C.-H. & Evans, W. E. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **354,** 166–178 (2006).
3. Volkova, M. & Russell, R. Anthracycline Cardiotoxicity: Prevalence, Pathogenesis and Treatment. *Curr. Cardiol. Rev.* **7,** 214–220 (2011).
4. Di Marco, A., Cassinelli, G. & Arcamone, F. The discovery of daunorubicin. *Cancer Treat. Rep.* **65 Suppl 4,** 3–8 (1981).
5. Arcamone, F. *et al.* Adriamycin, 14-hydroxydaimomycin, a new antitumor antibiotic from S. Peucetius var. caesius. *Biotechnol. Bioeng.* **11,** 1101–1110 (1969).
6. Mackall, C. L. *et al.* Lymphocyte depletion during treatment with intensive chemotherapy for cancer. *Blood* **84,** 2221–2228 (1994).
7. VON HOFF, D. D. *et al.* Risk Factors for Doxorubicin-lnduced Congestive Heart Failure. *Ann. Intern. Med.* **91,** 710–717 (1979).
8. Montaigne, D., Hurt, C. & Neviere, R. Mitochondria death/survival signaling pathways in cardiotoxicity induced by anthracyclines and anticancer-targeted therapies. *Biochem. Res. Int.* **2012,** 951539 (2012).
9. Todaro, M. C. *et al.* Cardioncology: state of the heart. *Int. J. Cardiol.* **168,** 680–687 (2013).
10. Lipshultz, S. E., Alvarez, J. A. & Scully, R. E. Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Heart* **94,** 525–533 (2008).
11. Scully, R. E. & Lipshultz, S. E. Anthracycline cardiotoxicity in long-term survivors of childhood cancer. *Cardiovasc. Toxicol.* **7,** 122–128 (2007).
12. Pai, V. B. & Nahata, D. M. C. Cardiotoxicity of Chemotherapeutic Agents. *Drug Saf.* **22,** 263–302 (2012).
13. Octavia, Y. *et al.* Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **52,** 1213–1225 (2012).
14. Von Hoff, D. D. *et al.* Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann. Intern. Med.* **91,** 710–717 (1979).
15. Vavrova, A. *et al.* Catalytic inhibitors of topoisomerase II differently modulate the toxicity of anthracyclines in cardiac and cancer cells. *PloS One* **8,** e76676 (2013).
16. Jay, S. M. *et al.* An engineered bivalent neuregulin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity with reduced proneoplastic potential. *Circulation* **128,** 152–161 (2013).
17. Harake, D., Franco, V. I., Henkel, J. M., Miller, T. L. & Lipshultz, S. E. Cardiotoxicity in childhood cancer survivors: strategies for prevention and management. *Future Cardiol.* **8,** 647–670 (2012).
18. Montaigne, D., Hurt, C. & Neviere, R. Mitochondria death/survival signaling pathways in cardiotoxicity induced by anthracyclines and anticancer-targeted therapies. *Biochem. Res. Int.* **2012,** (2012).
19. Goormaghtigh, E., Chatelain, P., Caspers, J. & Ruysschaert, J. M. Evidence of a complex between adriamycin derivatives and cardiolipin: possible role in cardiotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* **29,** 3003–3010 (1980).
20. Schlame, M., Rua, D. & Greenberg, M. L. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog. Lipid Res.* **39,** 257–288 (2000).
21. Maccarinelli, F. *et al.* Mice lacking mitochondrial ferritin are more sensitive to doxorubicin-mediated cardiotoxicity. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* (2014). doi:10.1007/s00109-014-1147-0
22. Ichikawa, Y. *et al.* Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *J. Clin. Invest.* **124,** 617–630 (2014).
23. Granados-Principal, S. *et al.* Hydroxytyrosol ameliorates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats with breast cancer. *Biochem. Pharmacol.* **90,** 25–33 (2014).
24. Zhang, Y.-W., Shi, J., Li, Y.-J. & Wei, L. Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **57,** 435–445 (2009).
25. Kashfi, K., Israel, M., Sweatman, T. W., Seshadri, R. & Cook, G. A. Inhibition of mitochondrial carnitine palmitoyltransferases by adriamycin and adriamycin analogues. *Biochem. Pharmacol.* **40,** 1441–1448 (1990).
26. Palmer, J. W., Tandler, B. & Hoppel, C. L. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *J. Biol. Chem.* **252,** 8731–8739 (1977).
27. Dague, E. *et al.* Atomic force and electron microscopic-based study of sarcolemmal surface of living cardiomyocytes unveils unexpected mitochondrial shift in heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **74,** 162–172 (2014).
28. Louch, W. E., Sheehan, K. A. & Wolska, B. M. Methods in Cardiomyocyte Isolation, Culture, and Gene Transfer. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **51,** 288–298 (2011).
29. Broadley, K. J. The Langendorff heart preparation—Reappraisal of its role as a research and teaching model for coronary vasoactive drugs. *J. Pharmacol. Methods* **2,** 143–156 (1979).
30. Emerson IV, R. J. & Camesano, T. A. On the importance of precise calibration techniques for an atomic force microscope. *Ultramicroscopy* **106,** 413–422 (2006).
31. Ueber die Berührung fester elastischer Körper. *J. Für Reine Angew. Math. Crelles J.* **1882,** 156–171 (2009).
32. Gao, S., Ho, D., Vatner, D. E. & Vatner, S. F. Echocardiography in Mice. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* **1,** 71–83 (2011).
33. Otto, C. M., Schwaegler, R. G. & Freeman, R. V. *Echocardiography Review Guide: Companion to the Textbook of Clinical Echocardiography*. (Elsevier Health Sciences, 2011).

34. Ostenfeld, E. & Flachskampf, F. A. Assessment of right ventricular volumes and ejection fraction by echocardiography: from geometric approximations to realistic shapes. *Echo Res. Pract.* **2,** R1–R11 (2015).
35. McMurray, J. J. V. *et al.* ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. *Eur. J. Heart Fail.* **14,** 803–869 (2012).
36. Jefferies, J. L. & Towbin, J. A. Dilated cardiomyopathy. *Lancet Lond. Engl.* **375,** 752–762 (2010).
37. Brunner, S. *et al.* Left ventricular functional assessment in murine models of ischemic and dilated cardiomyopathy using [18 F]FDG-PET: comparison with cardiac MRI and monitoring erythropoietin therapy. *EJNMMI Res.* **2,** 43 (2012).
38. D'hooge, J. *et al.* Regional Strain and Strain Rate Measurements by Cardiac Ultrasound: Principles, Implementation and Limitations. *Eur. Heart J. - Cardiovasc. Imaging* **1,** 154–170 (2000).
39. Kawai, M., Hussain, M. & Orchard, C. H. Excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes after formamide-induced detubulation. *Am. J. Physiol.* **277,** H603-609 (1999).
40. Lyon, A. R. *et al.* Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106,** 6854–6859 (2009).
41. Chatterjee, K., Zhang, J., Honbo, N. & Karliner, J. S. Doxorubicin Cardiomyopathy. *Cardiology* **115,** 155–162 (2010).
42. Hesketh, G. G. *et al.* Ultrastructure and Regulation of Lateralized Connexin43 in the Failing Heart. *Circ. Res.* **106,** 1153–1163 (2010).
43. Bhargava, A. *et al.* Super-resolution Scanning Patch Clamp Reveals Clustering of Functional Ion Channels in Adult Ventricular Myocyte. *Circ. Res.* **112,** 1112–1120 (2013).
44. Gorelik, J. *et al.* A novel Z-groove index characterizing myocardial surface structure. *Cardiovasc. Res.* **72,** 422–429 (2006).
45. Nikolaev, V. O. *et al.* β2-Adrenergic Receptor Redistribution in Heart Failure Changes cAMP Compartmentation. *Science* **327,** 1653–1657 (2010).
46. Pásek, M., Šimurda, J., Orchard, C. H. & Christé, G. A model of the guinea-pig ventricular cardiac myocyte incorporating a transverse–axial tubular system. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **96,** 258–280 (2008).
47. Vostarek, F., Sankova, B. & Sedmera, D. Studying dynamic events in the developing myocardium. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **115,** 261–269 (2014).
48. Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56,** 930–933 (1986).
49. Thorn, C. F. *et al.* Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet. Genomics* **21,** 440–446 (2011).
50. Asensio-López, M. C. *et al.* Early oxidative damage induced by doxorubicin: Source of production, protection by GKT137831 and effect on Ca(2+) transporters in HL-1 cardiomyocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **594,** 26–36 (2016).
51. Maccarinelli, F. *et al.* Mice lacking mitochondrial ferritin are more sensitive to doxorubicin-mediated cardiotoxicity. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **92,** 859–869 (2014).
52. Ichikawa, Y. *et al.* Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *J. Clin. Invest.* **124,** 617–630 (2014).
53. Pillai, V. B. *et al.* Sirt3 protects mitochondrial DNA damage and blocks the development of doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **310,** H962-972 (2016).
54. Rocha, V. C. J. *et al.* Protective effects of mito-TEMPO against doxorubicin cardiotoxicity in mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **77,** 659–662 (2016).
55. Varga, Z. V., Ferdinandy, P., Liaudet, L. & Pacher, P. Drug-induced mitochondrial dysfunction and cardiotoxicity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **309,** H1453-1467 (2015).
56. Armstrong, J. & Dass, C. R. Doxorubicin action on mitochondria: relevance to osteosarcoma therapy? *Curr. Drug Targets* (2015).
57. Agustini, F. D. *et al.* Cardioprotection mechanism of mangiferin on doxorubicin-induced rats: Focus on intracellular calcium regulation. *Pharm. Biol.* 1–9 (2015). doi:10.3109/13880209.2015.1073750
58. Asselin, B. L. *et al.* Cardioprotection and Safety of Dexrazoxane in Patients Treated for Newly Diagnosed T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia or Advanced-Stage Lymphoblastic Non-Hodgkin Lymphoma: A Report of the Children's Oncology Group Randomized Trial Pediatric Oncology Group 9404. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **34,** 854–862 (2016).
59. He, S.-F. *et al.* Morphine preconditioning confers cardioprotection in doxorubicin-induced failing rat hearts via ERK/GSK-3β pathway independent of PI3K/Akt. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **288,** 349–358 (2015).
60. Kwatra, M. *et al.* Ameliorative effect of naringin against doxorubicin-induced acute cardiac toxicity in rats. *Pharm. Biol.* **54,** 637–647 (2016).
61. Liu, M.-H. *et al.* Hydrogen sulfide attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting the expression of peroxiredoxin III in H9c2 cells. *Mol. Med. Rep.* **13,** 367–372 (2016).
62. Bagchi, D. *et al.* Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutat. Res.* **523–524,** 87–97 (2003).
63. Nithipongvanitch, R. *et al.* Mitochondrial and nuclear p53 localization in cardiomyocytes: redox modulation by doxorubicin (Adriamycin)? *Antioxid. Redox Signal.* **9,** 1001–1008 (2007).
64. Ghigo, A., Li, M. & Hirsch, E. New signal transduction paradigms in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta* (2016). doi:10.1016/j.bbamcr.2016.01.021



<u>Figure Annexe 2</u> : ***Coupe transversale de tissu cardiaque observée par microscopie électronique à transmission*** *isolée à partir de souris traitées ou non à la Dox.* ***A. Condition témoin (0mg/kg),*** *le CM présente une architecture structurée avec un sarcolemme en creux/crêtes (vert), des SSM (rouge), des IFM (bleu) localisées le long des myofibrilles (jaune).* ***B. J3 (5mg/kg)*** *le tissu entier présente des anomalies structurales avec perte de l'alignement des myofibrilles (jaune), les IFM perdent leur localisation, perte de la structure creux/crêtes du sarcolemme induite par la perte des SSM.*

23. Etude par AFM de l'architecture oligomérique des RCPGs sur la membrane cellulaire

231. Introduction

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) composent une des plus grandes familles de récepteur chez les eucaryotes, et sont les acteurs d'une grande variété de processus physiologiques[1]. Les RCPGs sont par conséquent une cible privilégiée en pharmacologie, et représentent la cible d'environ 30% de tous les médicaments sur le marché[2]. Cependant, et comme pour tous les autres RCPGs, les molécules médicamenteuses ciblant ces récepteurs sont responsables d'un trop grand nombre d'effets secondaires. Sur ce constat, de nombreuses études ont été effectuées pour tenter d'améliorer ces traitements, les rendre plus spécifiques et de mieux comprendre les raisons de ces effets secondaires afin de les diminuer voir de les supprimer. Ces recherches ont révélé un aspect encore inconnu qui pourrait être la clef de la compréhension de ces effets non désirés. Une étude a montré que potentiellement les RCPGs ont une activité régulée par leur organisation oligomérique comme semble sous-entendre l'exemple de la morphine développé dans les travaux de B. Kobilka[3] . Dans le cadre de mes travaux, nous nous sommes proposés d'observer l'architecture oligomérique des RCPGs sous différentes conditions, après stimulation de différents agonistes et l'effet de la densité de récepteurs exprimés sur la membrane.

Cette étude a été faite par Spectroscopie de Force à l'échelle de la Molécule Unique (SMFS)[31–36], qui est une technologie particulière issuse de l'AFM. Cette méthode s'est développée ces dernières années avec les progrès en chimie de surface. Dans la technologie de SMFS, les pointes AFM interagissent avec des biomolécules immobilisées sur des substrats ou des biomembranes artificielles ou même présentes à la surface de cellules vivantes afin d'en étudier les interactions intra et inter-moléculaires[4,5]. Pour rendre l'interaction entre la pointe et la molécule étudiée spécifique, il est nécessaire de fonctionnaliser la pointe[6–11]. La fonctionnalisation consiste à lier à la pointe un anticorps spécifique ciblant la protéine d'intérêt, cependant il peut être difficile d'obtenir l'anticorps reconnaissant la protéine membranaire native avec une spécificité assez élevée ce qui limite l'utilisation de cette méthode. Pour contourner cette difficulté, les biologistes ont développé une stratégie génétique consistant à marquer leurs protéines d'intérêts en N- ou C-terminal avec de petites « étiquettes » spécifiques. La pointe AFM est donc fonctionnalisée par un anticorps dirigé contre ces « étiquettes ». Avec cette approche, nous avons étudié nos RCPGs d'intérêts (B2-AR AT1, et mGlu3) préalablement fusionnés en N-terminal par l'épitope HA qui pourra donc être détecté par la pointe AFM fonctionnalisées avec un anticorps anti-HA. Lorsque aura lieu une interaction entre la pointe et la molécule, les courbes de retrait décrivent un événement adhésif spécifique du RCPG, qui se caractérise par la force de rupture et la distance de

rupture entre la pointe et la surface. L'utilisation de la SMFS permet une approche innovante pour l'étude de l'architecture oligomérique des RCPGs par l'analyse de ces distances de rupture des interactions entre la pointe et le récepteur. Ces expériences ont été faites sur cellules vivantes et sous différentes conditions (densité de récepteurs sur la membrane, effet d'un ligand etc). Néanmoins, avant de pouvoir analyser les distances de rupture, il a fallu dans un premier temps valider le système « HA / Anti-HA ». Pour cela des surfaces modèles ont été fonctionnalisés avec l'épitope HA, et différentes conditions expérimentales ont été testées. Un blocage des épitopes a été effectué afin de vérifier la spécificité de notre interaction, puis des expériences de loading rate ont déterminé le profile énergétique de la liaison entre l'épitope HA et son anticorps[12]. Ces différentes acquisitions ont été faites à différends temps de contact ce qui a permis de montrer la spécificité de l'interaction. Cette validation est décrite dans l'article : «Mapping HA-tagged protein at the surface of living cells by atomic force microscopy »[13]. Grâce à cette validation du système « HA / Anti-HA » nous avons pu utiliser les données de distance de rupture entre le récepteur membranaire et la pointe AFM pour observer l'architecture oligomérique à la surface d'une cellule vivante, décrit dans un second article « Spectroscopie de Force à l'échelle de la molécule unique appliquée aux RCPGs taggés HA révèle un impact sur l'organisation des récepteurs à la surface de cellules vivantes après stimulation de leurs agonistes ». Les résultats obtenus ont permis de constater une différence de comportement dans l'oligomérisation après une stimulation avec un agoniste synthétique ou endogène. En effet il semble que les agonistes endogènes ciblent plus spécifiquement une population d'oligomère. Lors de la stimulation avec l'Isoproterenol, l'agoniste synthétique, il y a une perte de toutes les populations oligomérique, que ce soit les dimères, les tétramères et les hexamères. Alors qu'avec une stimulation avec l'Epinephrine et Norepinephrine, les molécules vont préférentiellement faire internaliser les récepteurs oligomérisés en tétramères. Cette caractéristique des agonistes endogènes pourrait expliquer le fait que les agonistes dits synthétiques ont la plupart du temps des effets secondaires notables. Il est possible qu'il y ait une régulation des voies de signalisations par l'oligomérisation des récepteurs activés. Le récepteur plus ou moins oligomérisés pourrait présenter des différences mineures dans leur conformation spatiale, ce qui permettrait au ligand de se fixer ou non sur ce récepteur et d'activer une voie de signalisation spécifique sans déclencher les autres qui pourraient être délétères à la réponse attendue. Alors qu'un agoniste synthétique ne pourra pas détecter ces subtiles différences entre les récepteurs et donc les activer tous comme le sous entends certaines études[14–16,3]. La différence d'activité possible de chaque population oligomérique (monomère/dimère/tétramère/hexamère) semble d'autant plus visible lorsque ces dernières sont comparées l'une à l'autres selon les différentes conditions. C'est ce que nous avons cherché à représenter dans la figure 17. Sur cet histogramme de distributions des différentes populations nous pouvons constater que lors d'une stimulation par un agoniste, les tétramères diminuent le

plus fortement puis les dimères. Cependant une apparition des monomères apparait, qui pourrait avoir comme fonction la désensibilisation de la cellule comme précédemment développé. La différence d'une stimulation entre différents types d'agoniste (synthétique ou naturelles) se fait, semble-t-il, au niveau de l'internalisation de certaines populations oligomériques. En effet, les agonistes synthétiques font internaliser tous les oligomères quelques soit leurs degrés d'oligomérisation. Alors que les agonistes naturels semblent cibler préférentiellement les dimères avec plus ou moins d'efficacité selon l'affinité de l'agoniste avec le récepteur.

1. Hill, S. J. G-protein-coupled receptors: past, present and future. Br. J. Pharmacol. 147Suppl 1, S27-37 (2006).
2. Wise, A., Gearing, K. & Rees, S. Target validation of G-protein coupled receptors. Drug Discov. Today 7, 235–246 (2002).
3. Manglik, A. et al. Crystal structure of the μ-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. Nature 485, 321–326 (2012).
4. Dufrêne, Y. F. et al. Five challenges to bringing single-molecule force spectroscopy into living cells. Nat. Methods 8, 123–127 (2011).
5. Müller, D. J., Helenius, J., Alsteens, D. &Dufrêne, Y. F. Force probing surfaces of living cells to molecular resolution.Nat. Chem. Biol. 5, 383–390 (2009).
6. Gamsjaeger, R. et al. Oriented binding of the His6-tagged carboxyl-tail of the L-type Ca2+ channel alpha1-subunit to a new NTA-functionalized self-assembled monolayer. Langmuir ACS J. Surf.Colloids 20, 5885–5890 (2004).
7. Kienberger, F., Kada, G., Mueller, H. &Hinterdorfer, P. Single molecule studies of antibody-antigen interaction strength versus intra-molecular antigen stability.J. Mol. Biol. 347, 597–606 (2005).
8. Kamruzzahan, A. S. M. et al. Antibody linking to atomic force microscope tips via disulfide bond formation. Bioconjug.Chem. 17, 1473–1481 (2006).
9. Ebner, A. et al. A new, simple method for linking of antibodies to atomic force microscopy tips. Bioconjug.Chem. 18, 1176–1184 (2007).
10. Ebner, A., Hinterdorfer, P. & Gruber, H. J. Comparison of different aminofunctionalization strategies for attachment of single antibodies to AFM cantilevers. Ultramicroscopy 107, 922–927 (2007).
11. Verbelen, C., Gruber, H. J. &Dufrêne, Y. F. The NTA-His6 bond is strong enough for AFM single-molecular recognition studies. J. Mol. Recognit. JMR 20, 490–494 (2007).
12. Merkel, R., Nassoy, P., Leung, A., Ritchie, K. & Evans, E. Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. Nature 397, 50–53 (1999).
13. Formosa, C. et al. Mapping HA-tagged protein at the surface of living cells by atomic force microscopy. J. Mol. Recognit. 28, 1–9 (2015).
14. Gether, U. &Kobilka, B. K. G Protein-coupled Receptors II.MECHANISM OF AGONIST ACTIVATION.J. Biol. Chem. 273, 17979–17982 (1998).
15. Rios, C. D., Jordan, B. A., Gomes, I. & Devi, L. A. G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function.Pharmacol.Ther.92, 71–87 (2001).
16. Breitwieser, G. E. G Protein–Coupled Receptor Oligomerization Implications for G Protein Activation and Cell Signaling. Circ. Res. 94, 17–27 (2004).

232. Validation de l'utilisation de l'AFM afin d'étudier les récepteurs transmembranaires

Formosa C, Lachaize V, Galés C, Rols MP, Martin-Yken H, François JM, Duval RE, Dague E.

"Mapping HA-tagged protein at the surface of living cells by atomic force microscopy"

(publié en 2015 dans *Journal of Molecular Recognition, 1-9. doi: 10.1002/jmr.2407*)

Research Article

Journal of Molecular Recognition

Received: 15 May 2014, Revised: 20 June 2014, Accepted: 25 June 2014, Published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/jmr.2407

Mapping HA-tagged protein at the surface of living cells by atomic force microscopy

C. Formosa[a,b,c,d], V. Lachaize[a,b,e,f], C. Galés[b,e,f], M. P. Rols[b,g], H. Martin-Yken[b,h], J. M. François[b,h], R. E. Duval[c,d,i] and E. Dague[a,b,f]*

Single-molecule force spectroscopy using atomic force microscopy (AFM) is more and more used to detect and map receptors, enzymes, adhesins, or any other molecules at the surface of living cells. To be specific, this technique requires antibodies or ligands covalently attached to the AFM tip that can specifically interact with the protein of interest. Unfortunately, specific antibodies are usually lacking (low affinity and specificity) or are expensive to produce (monoclonal antibodies). An alternative strategy is to tag the protein of interest with a peptide that can be recognized with high specificity and affinity with commercially available antibodies. In this context, we chose to work with the human influenza hemagglutinin (HA) tag (YPYDVPDYA) and labeled two proteins: covalently linked cell wall protein 12 (Ccw12) involved in cell wall remodeling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the β2-adrenergic receptor (β2-AR), a G protein-coupled receptor (GPCR) in higher eukaryotes. We first described the interaction between HA antibodies, immobilized on AFM tips, and HA epitopes, immobilized on epoxy glass slides. Using our system, we then investigated the distribution of Ccw12 proteins over the cell surface of the yeast *S. cerevisiae*. We were able to find the tagged protein on the surface of mating yeasts, at the tip of the mating projections. Finally, we could unfold multimers of β2-AR from the membrane of living transfected chinese hamster ovary cells. This result is in agreement with GPCR oligomerization in living cell membranes and opens the door to the study of the influence of GPCR ligands on the oligomerization process. Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: single-molecule recognition; AFM; GPCR; yeast

INTRODUCTION

Since its invention in 1986 by Binnig *et al*. (1986), atomic force microscopy (AFM) has developed into a multifunctional toolbox that opened the door to the nanoworld (Gerber and Lang, 2006). The basic principle of this technique relies on the measurement of a force between a sharp tip and a surface sample, and to keep this force constant while scanning in order to get a three-dimensional image of the sample. An advantage of AFM is the possibility to work with living cells in their physiological environment. However, AFM is not only an imaging technology but also a highly sensitive force machine. Indeed, AFM is also able to record force–distance curves, thus giving access to nanomechanical and adhesive properties of the living material probed. In this context, an AFM-based technique, single-molecule force spectroscopy (SMFS), has recently emerged in the field. In this technique, AFM tips interact with biomolecules immobilized on innate substrates or artificial biomembranes (*in vitro* studies) or present at the surface of living cells so to understand the intramolecular and intermolecular interactions of biomolecular systems (Müller *et al*., 2009; Dufrêne *et al*., 2011). SMFS techniques have been widely used *in vitro*, to monitor, for example, the interaction of cellular adhesion molecules, such as cadherins (Baumgartner *et al*., 2000) or oligosaccharides (Rief *et al*., 1997a) or to characterize the anchoring forces of peptides in lipid membranes (Ganchev *et al*., 2004). These *in vitro* studies generally do not need specific probes as they involve only one molecule, inserted in a membrane or linked to a surface, that can be picked up by the AFM tip (Rief *et al*., 1997b; Zocher *et al*., 2012). However, they use purified biological molecules that have been removed from their native biological context, and the results obtained cannot be directly linked to biological processes happening *in vivo* (Robinson *et al*., 2007). Nevertheless, it is

* *Correspondence to: E. Dague, CNRS, LAAS, 7 avenue du Colonel Roche, 31400 Toulouse, France. E-mail: edague@laas.fr*

a *C. Formosa, V. Lachaize, E. Dague*
CNRS, LAAS, 7 avenue du Colonel Roche, 31400 Toulouse, France

b *C. Formosa, V. Lachaize, C. Galés, M. P. Rols, H. Martin-Yken, J. M. François, E. Dague*
Université de Toulouse, LAAS, ITAV, IPBS, 31400 Toulouse, France

c *C. Formosa, R. E. Duval*
CNRS, UMR 7565, SRSMC, Vandœuvre-lès-Nancy, France

d *C. Formosa, R. E. Duval*
Université de Lorraine, UMR 7565, Faculté de Pharmacie, Nancy, France

e *V. Lachaize, C. Galés*
Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1048, Université Toulouse III Paul Sabatier, 31432 Toulouse, France

f *V. Lachaize, C. Galés, E. Dague*
CNRS, ITAV, 1 Place Pierre Potier, 31000 Toulouse, France

g *M. P. Rols*
CNRS, IPBS, UMR 5089, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse, France

h *H. Martin-Yken, J. M. François*
INRA, UMR 972 LISBP, Toulouse, France

i *R. E. Duval*
ABC Platform®, Nancy, France

 Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

possible to study more accurately molecular interactions and recognition as they happen in their natural environment, by performing SMFS experiments directly on living cells (Lama *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013).

However, such experiments are often challenging because of the heterogeneity of the cellular surfaces. In lower eukaryotic cells, such as yeast cells, the cell wall is composed of heterogeneous components (mannans, mannoproteins, glucans, and chitin) that are structurally organized among the cell wall depth. This heterogeneity and complex molecular organization are essential for maintaining a functional cell wall that protects the cells from the environment and allows morphogenic events to take place (Lipke and Ovalle, 1998; Orlean, 2012). In the case of higher eukaryotes, the key feature of cell surface heterogeneity refers to the spatiotemporal confinement of proteins and lipids in defined and dynamic microscale regions of the plasma membrane (Maxfield, 2002; Sonnino and Prinetti, 2012). Association between lipids and proteins can modulate their biological functions and therefore cellular bioprocesses such as cell adhesion or cell–cell interactions (Lee, 2004; Phillips *et al.*, 2009). During SMFS experiments, all these different components at the surface of living cells can cause nonspecific interactions with the AFM tip (hydrophobic interactions, electrostatic interactions, etc.).

In this context, it is necessary to functionalize AFM tips with specific antibodies targeting only one specific protein at the surface of the cells. However, the difficulty to obtain antibodies recognizing native membrane proteins with high specificity and affinity prevents the use of functionalized AFM tips to explore the behavior of these proteins at the cell surface. As an alternative, biologists have developed a genetic strategy consisting in labeling proteins to their amino (N–) or carboxy (C–) terminus with specific small tags and then expressing these tagged proteins in living cells. Several and general epitope tags such as human influenza hemagglutinin (HA) tag (YPYDVPDYA), FLAG tags (DYKDDDDK), or myc tags (EQKLISEEDL) and corresponding highly specific and affine antibodies recognizing these epitopes have been thus developed and are commonly used by the biology community, therefore offering the possibility to follow the protein of interest with high accuracy with a specific antibody against the epitope tag. We took advantage of these specific antibodies and decided to functionalize an AFM tip with an antibody targeted against the HA-epitope tag. Different strategies to functionalize AFM tips with biomolecules have been described so far. Some of them consist in the nonspecific adsorption of proteins, for example, bovine serum albumin, to the silicon nitride surface of AFM tips (Florin *et al.*, 1994) or in the chemical fixation of biomolecules by sulfur–gold bonds to gold-coated AFM tips. This last strategy has been successfully used for measuring interactions forces between complementary DNA strands (Lee *et al.*, 1994) or between fibronectin and bacterial cells (Bustanji *et al.*, 2003). However, in the first case, the adsorption is nonspecific, and in the second case, the gold coating of AFM tips modifies the spring constant of the cantilevers where the tips are fixed. To avoid these problems, it is possible to covalently link a molecule containing amino groups directly to the silicon nitride AFM tip. To this end, AFM tips must be first amino-functionalized either by esterification with ethanolamine (Hinterdorfer *et al.*, 1996) or silanization with aminopropyltriethoxysilane (Ros *et al.*, 1998). Then, the amino-functionalized tip has to be bridged to the biomolecule of interest. This can be achieved through the use of heterobifunctionalized polyethylene glycol (PEG; Kamruzzahan *et al.*, 2006; Ebner *et al.*, 2008; Wildling *et al.*, 2011) or, as we decided in our study, through the use of an aldehyde–phosphorus dendrimer, as we previously described (Jauvert *et al.*, 2012). This strategy developed in our team in 2012, and already used for probing the surface of live bacteria (Formosa *et al.*, 2012), consists in making "dendritips" by reacting amino-functionalized AFM tips with dendrimers, therefore leading to dendrimer-activated tips. Then, the free aldehyde functions at the surface of the dendrimers are available to react with amino-functions present on every protein and on many biomolecules. Using this strategy, we are able to measure specific interactions between a biomolecule immobilized on the AFM tip and a biomolecule immobilized on an abiotic surface or at the surface of living cells, without modifying the spring constant of the cantilever. Single-molecule events can be detected using this strategy using appropriate concentrations in the biomolecules grafted on the AFM tip. Finally, another advantage of this strategy, compared with PEG linkers for example, is that the interaction detected takes place at the exact position of the AFM tip, which allows precise mapping of proteins.

In this study, we developed an AFM tip functionalized with an anti-HA (peptide YPYDVPDYA) antibody and validated our system on model surfaces functionalized with HA epitopes. Our system was used to probe two transmembrane (TM) proteins of two different biological models. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* covalently linked cell wall (Ccw) 12 protein is a covalently linked mannoprotein and is considered as a crucial structural cell wall component, as mutant strains deleted for this protein present cell wall damages (Ragni *et al.*, 2007). The other investigated protein is the β2-adrenergic receptor (β2-AR) that is the hallmark of the mammalian G protein-coupled receptor (GPCR). These proteins constitute the largest class of cell-surface receptors that are involved in signal transduction (Galés *et al.*, 2006) and mediate complex cellular responses to highly diverse extracellular signals (Manglik and Kobilka, 2014). To probe these proteins at the surface of the corresponding model systems, an HA-epitope tag was fused at their N-terminus. These fusion proteins were then transiently overexpressed in yeast and mammalian cells and probed using functionalized AFM tips with anti-HA antibodies. Although this strategy has been used in recent papers with HA-tagged bacterial proteins, of V5-tagged yeast proteins (Alsteens *et al.*, 2010; El-Kirat-Chatel *et al.*, 2014a, 2014b), via the use of heterobifunctionalized PEG linkers, we show here for the first time that such experiments are possible using a dendrimer-based functionalization strategy, with yeast proteins but also with human molecules, such as β2-AR, at the surface of mammalian cells.

MATERIAL AND METHODS

Yeast growth conditions and transformation

S. cerevisiae strain BY4741 (MATa his3Δ1 leu2Δ10 met15Δ0 ura3Δ0) ΔCCW12 was stocked at −80°C, revivified on yeast peptone dextrose agar (Difco, 242720-500g) and grown in yeast peptone dextrose broth (Difco, 242820-500g) for 20 h at 30°C under agitation (180 rpm). Yeast transformation was conducted using LiAc, according to Gietz and Schiestl (2007). Strain Δ*ccw12* + p*CCW12-GFP-HA* was grown in yeast Nitrogen base Leu- for 20 h at 30°C under agitation (180 rpm). For mating projections, strain Δ*ccw12* + p*CCW12-GFP-HA* was put into fresh media for

Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

2 h at 30°C under agitation (180 rpm), and α-factor (Sigma T6901) was added at a concentration of 0.01 mg/ml for another 2 h at 30°C under agitation (180 rpm) before AFM experiments.

CHO cell growth conditions and transfection

Chinese hamster ovary (CHO) cells (wild-type Toronto from ATCC) were grown in minimum Eagle's medium (MEM) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco) and 1% penicillin/streptomycin mixture (100 u/ml) (Gibco), and incubated at 37°C in humidified atmosphere with a 5% CO_2 incubator. Transient transfections were performed 24 h after cell seeding using X-tremeGENE 9 DNA transfection reagent (Roche) according to the manufacturer's protocol. In all cases, cells were cotransfected with a fluorescent marker encoding vector (pGFP2-N1, PerkinElmer) so to identify transfected cells.

Sample preparation and AFM experiments

Yeast cells were concentrated by centrifugation, washed two times in acetate buffer (18 mM CH_3COONa, 1 mM $CaCl_2$, and 1 mM $MnCl_2$, pH = 5.2), resuspended in acetate buffer, and immobilized on polydimethylsiloxane (PDMS) stamps prepared as described by Dague *et al.* (2011). Briefly, freshly oxygen-activated microstructured PDMS stamps were covered by a total of 100 μL of the solution of cells and allowed to stand for 15 min at room temperature. The cells were deposited into the microstructures of the stamp by convective/capillary assembly. The stamp was then immerged in a Petri dish containing acetate buffer (+α-factor at 0.01 mg/ml for mating projection experiments) and placed in the PetriDishHeater (JPK) that maintained the device at 30°C during the whole experiment. For CHO cells, 75 00 cells for each conditions were grown in Petri dishes during 24 h before measurement, and classical medium was replaced by DMEM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) medium (HEPES 15 mM), and cells were placed in the PetriDishHeater (JPK) that maintained the Petri dish at 37°C during the whole experiment. Images were recorded in acetate buffer in Quantitative Imaging™ mode (Chopinet *et al.*, 2013), with MLCT AUWH cantilevers (nominal spring constant of 0.01 N/m). For SMFS experiments, the applied force was kept constant at 0.5 nN, for all experiments.

AFM tip functionalization

Functionalized tips were produced according to a French patent (Dague *et al.*, 2010) of the authors described in sensors and actuators (Jauvert *et al.*, 2012). Briefly, AFM tips were functionalized with dendrimers presenting CHO functions able to covalently link with NH_2 functions of proteins. Those dendritips were then incubated with the HA antibody at a concentration of 0.01 mg/ml (LifeProTein, LT0422, HA.C5 clone monoclonal antibody) for 1 h, before being used for force spectroscopy experiments.

Glass slide functionalization

A drop of HA epitope YPYDVPDYA (synthesized, LifeProTein) at a concentration of 5 mg/ml was deposited on epoxy glass slides and incubated overnight. The following day, glass slides were rinsed with acetate buffer (18 mM CH_3COONa, 1 mM $CaCl_2$, and 1 mM $MnCl_2$, pH = 5.2) and further used for SMFS experiments.

RESULTS

In order to probe HA-tagged protein at the surface of living cells, the first step was to functionalize AFM tips with HA antibodies and verify that they can specifically interact with synthetic HA peptides immobilized on epoxy glass slides. The results presented in Figure 1a show interaction forces at a loading rate (LR) of 70 000 pN/s. The forces measured are of 61.7 ± 18.9 pN, which is in the range of specific molecular interactions such as antigen–antibody interactions (Kienberger *et al.*, 2005). We also fixed the nonadhesive curve percentage to 80%, by adjusting the antibody and epitope concentrations, with the aim of measuring only single-molecule interactions. To examine whether these interactions were specific, we performed blocking experiments by saturating the epitopes on the glass slide with anti-HA antibodies (Figure 1b). The resulting measures indicated that the tip was not able anymore to interact with the epitopes at the surface thus confirming the specificity of the interaction. Next, we characterized the interactions between HA epitopes and HA tip, by performing force spectroscopy experiments with varying LRs and contact time. The rupture force for a specific biological interaction is expected to be a function of the LR (Evans and Ritchie, 1997; Baumgartner *et al.*, 2000). This LR dependence comes from the molecular link that exists in biological interactions such as antigen–antibody. Figure 1c shows the variation of the adhesion force for LRs between 10 000 and 100 000 pN/s. The direct relation between the adhesion force and the LR is clear, with an increase from 30.6 ± 4.8 pN for a LR of 20 000 pN/s to 62.5 ± 24.8 pN for a LR of 100 000 pN/s. Based on these results, we have been able to estimate the kinetic dissociation constant (*Koff*) on the HA–HA antibody interaction according to the following Eqn (1) (Evans and Ritchie, 1997):

$$F = f\beta \times \ln\left(\frac{r}{f\ \beta Koff}\right) \tag{1}$$

where F is the measured adhesion force, $f\beta$ is defined as the ratio between the thermal energy scale (K_BT, where K_B is Boltzmann's constant and T is temperature) and the length of the interaction at a transition state, and r the LR. At zero force, Eqn (1) can be rewritten as follows (Eqn (2)):

$$Koff = \frac{r0}{f\beta} \tag{2}$$

The values $f\beta$ (slope) and r0 (LR at zero force) were deduced from data presented in Figure 1b. The *Koff* parameter, estimated using the second equation, was equal to 1.4×10^{-5}/s.

In parallel, we studied the variation of the adhesion probability with the contact time between the HA epitopes and the HA tip, while keeping the LR constant to 70 000 pN/s. As showed in Figure 1d, the adhesion probability increased with the contact time, from 20 to 80% for a contact time ranging from 0 to 2 s, until reaching a plateau. This dependence of the probability of adhesion to the contact time confirms that we are probing a specific recognition that could be described by an association kinetic constant (*Kon*). The calculation needed to provide a *Kon* would nevertheless require many approximations, especially, the number of binding partners and the effective volume that they are in. We therefore decided not to estimate the *Kon* but to provide $t_{0.5}$ (contact time needed to reach 50% of adhesive events) = 0.05 s. All together, we have an adhesion force (61.7 ± 18.9 pN; LR = 70 000 pN/s) typical for epitope–antibody recognition; the

 Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

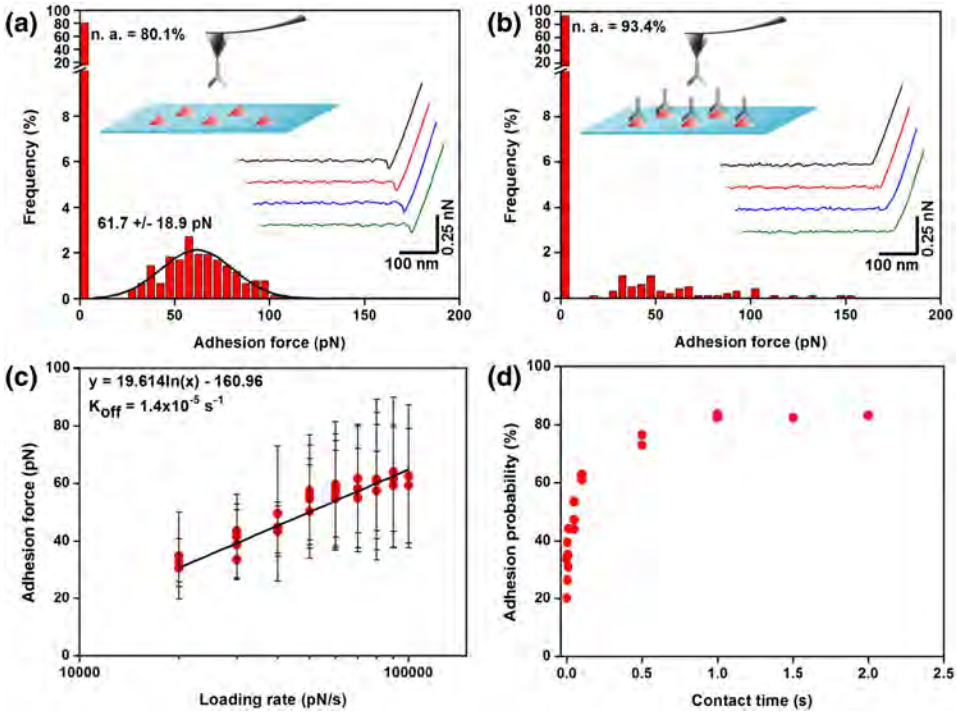


Figure 1. Single-molecule force spectroscopy with HA and HA antibody-functionalized AFM tips (HA-tip). (a) Single-molecule interactions between an HA peptide immobilized on an epoxy glass slide and HA antibodies immobilized on an AFM tip, at a loading rate of 70 000 pN/s. (b) Blocking of HA-specific sites by HA antibodies and single-molecule force spectroscopy with HA antibody AFM tips. (c) Loading-rate dependence of interaction forces between HA and HA antibodies and (d) contact-time dependence of the adhesion probability.

adhesion force is a function of the LR (*Koff* = 1.4×10^{-5}/s), and the adhesion probability increases with the contact time according to a log ($t_{0.5}$ = 0.05 s, plateau 80%).

Once this validation step with our anti-HA tip on a model surface bearing HA epitopes was accomplished, we then further used our HA-functionalized AFM tip first on living yeast cells, immobilized in microstructured PDMS stamps (Formosa *et al.*, 2013; Francois *et al.*, 2013). To this end, we labeled the plasmidic Ccw12 parietal yeast protein to HA tag and transformed yeast cells with Δ*ccw12* deleted for the genomic allele of the gene encoding this protein with this plasmid. The first experiments consisted in probing the surface of Δ*ccw12* (control strain, Figure 2a) so to control that no unspecific interactions were observed between the surface and the HA tip. Figure 2b presents the adhesion map obtained, while representative force curves and a histogram of the adhesion forces are presented in Figure 2c and d. In this case, 78.1% of the force curves presented no retract adhesions, and the few adhesions measured (Figure 1d) were not specific as their distance on the force curve is far from the contact point (more than 100 nm). Then, we probed the surface of the same strain but overexpressed the HA-tagged Ccw12 protein (Figure 2e). Unexpectedly, the results showed that there were no interactions between the tip and the sample, with a percentage of force curves with no retract adhesions reaching 96.7%. Because Ccw12 is a protein expressed at the tip of mating projections (Seidel and Tanner, 1997), we then incubated this same strain in the presence of α-factor, a yeast sexual pheromone triggering the formation of these characteristic mating projections by haploid yeast strains of *a* mating type (Merlini *et al.*, 2013). We were able to image the formation of mating projections or "shmoos", for the first time (to our knowledge) under liquid conditions with an AFM (Figure 2i). When we probed the surface of these shmoos using the anti-HA tip, we could clearly see interactions between the tip and the sample on the adhesion map (Figure 2j); 67.4% of the force curves in this case exhibited retract adhesions, with adhesion forces of 69.3 ± 31.4 pN at a LR of 70 000 pN/s (Figure 2k and l). This adhesion force value is consistent with similar data obtained on yeast cells using anti-V5-functionalized AFM tips and V5-tagged protein (Alsteens *et al.*, 2010). Therefore, we can conclude that in this particular morphogenic state, the cell wall is modified so that the protein becomes accessible to the AFM tip, at the surface of the cells.

To show the versatility of our system, we used the anti-HA tips on a different biological system so to extend the versatility and power of the functionalized tip. For that purpose, we used mammalian CHO cells overexpressing the human GPCR β2-AR. In these experiments, cells were transiently cotransfected with a green fluorescent protein (GFP) encoding vector together with a plasmid coding for the HA-β2-AR, thus allowing us to probe only transfected cells. Figure 3a and b presents optical images of the cells under the AFM tips; on the dark-field image, white arrows indicate fluorescent cells, that are, transfected cells. Cells were maintained at 37°C during all experiments in a 15-mM HEPES buffer, in order to keep them alive during the AFM experiment. Figure 3c presents a height image of a CHO cell imaged under these conditions. As we did for yeast cells, we first used anti-HA tips to probe the surface of untransfected cells (control cells) to control for unspecific interactions that would mask/interfere with the specific ones on transfected cells. The adhesion map and representative force curves (Figure 3d and g) showed that such interactions were indeed undetectable; 83.8% of the recorded force curves presented no retract adhesions (n = 1024 on four cells coming from two independent cultures) A second control consisted in probing the surface of

Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

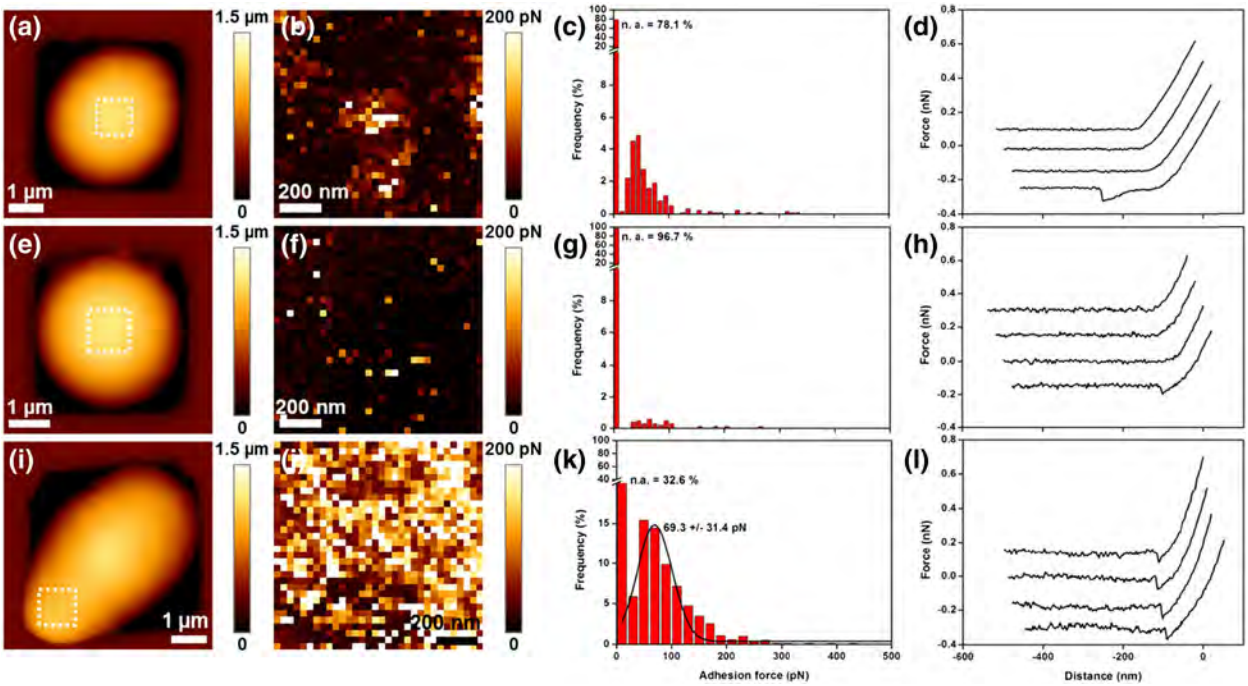


Figure 2. Mapping of HA-tagged protein CCW12 at the surface of living *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in PDMS stamps. AFM height image (a) of a *S. cerevisiae* cell lacking CCW12 protein (strain ΔCCW12), (e) of a *S. cerevisiae* cell lacking CCW12 protein and complemented by a plasmid coding for CCW12-HA (strain ΔCCW12 + p), and (i) of the same strain during mating projection process. (b, f, and j) Adhesion maps recorded with HA tips on small areas on top of the cells, delimited by whites squares on panels a, e, and i. (c, g, and k) Representative histograms of interaction forces and (d, h, and l) representative force curves recorded on top of the cells.

cells transfected with a noncoding vector so to verify that the transfection process would not destabilize the plasma membrane, which could lead to unspecific interactions. Figure 3e and h shows comparable results as the ones obtained on untransfected cells as we did not detect retract adhesions on 86.8% of the force curves recorded ($n = 1280$ on five cells coming from two independent cultures). However, when cells were transfected with the HA-β2-AR encoding plasmid, the receptors were expressed at the surface of the cells and could be unfolded using the anti-HA tip, as showed in Figure 3f and i. In these conditions, we found 65.2% of adhesive force curves, the average in adhesion force being 63.4 ± 25.7 pN ($n = 1280$, on five different cells coming from two independent cultures), at a LR of 100 000 pN/s. A detailed analysis of the force curves obtained on this sample is presented in Figure 4. On this figure, we presented 26 force curves obtained on different cells transfected with the plasmid coding for the HA-β2-AR, with a functionalized AFM tip. We can clearly see on this figure that the unfoldings are of different sizes and are distributed in a range going from 170 nm to 3.5 µm. The β2-AR is composed of 413 amino acids (protein database, GenBank: AAN01267.1) organized in seven TM domains (Rasmussen *et al.*, 2007). Assuming that one amino acid is, on average, 0.4 nm long (Rief *et al.*, 1997b), we expect a single β2-AR receptor unfolding around $413 \times 0.4 = 165.2$ nm. Based on our AFM results, it thus follows that we did not stretch a single β2-AR receptor unit, or maybe in the case of the top force curve presented in Figure 4, but this is too much uncertain to be confirmed. The more general force curve patterns obtained in these experiments, with long unfoldings, could thus represent the stretching of several receptors. In agreement with this hypothesis, the β2-AR is well known to oligomerize at the cell surface (George *et al.*, 2002; Bulenger *et al.*, 2005). In our conditions of receptor overexpression, it is likely possible that several receptors oligomerized at different orders were stretched at the cell surface by the functionalized AFM tip over varying lengths. If we take a closer look at the force curves, we can see that some of them present two distinct unfolding patterns (last one from the bottom, for example, on Figure 4), that is, with a return to the baseline between two unfoldings on the same force curve. This can be explained by the fact that the AFM tip starts stretching one group of oligomerized receptors; then, the interaction is broken, but because the tip is still close to the surface, it interacts with a second group of oligomerized receptors.

DISCUSSION

LR experiments allowed us to determine the dissociation kinetic constant *Koff* for the couple HA–anti-HA, equal, in our case, to 1.4×10^{-5}/s. Such constants were previously determined with the same technique for other antigen–antibody couples; for example, Hinterdorfer's team found a *Koff* of 6.7×10^{-4}/s for the couple human serum albumin (HSA)–anti-HSA (Hinterdorfer *et al.*, 1996). Our result is consistent with these literature data, as our *Koff* is in the same range of values. When varying the contact time during force spectroscopy experiments, we reached a plateau at 80% of probability of adhesion. This dependence of the probability of adhesion to the contact time is a proof that the interaction probed is specific and that the HA–anti-HA complex formed via multiple bonds (Benoit *et al.*, 2000). However, the *Kon* (association kinetic constant) was not calculated in this study because of uncertainties in the effective concentration (number of binding partners and effective volume) in epitopes at the surface of the area probed. These approximations are probably responsible for the large heterogeneity in the *Kon* values that can

 Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

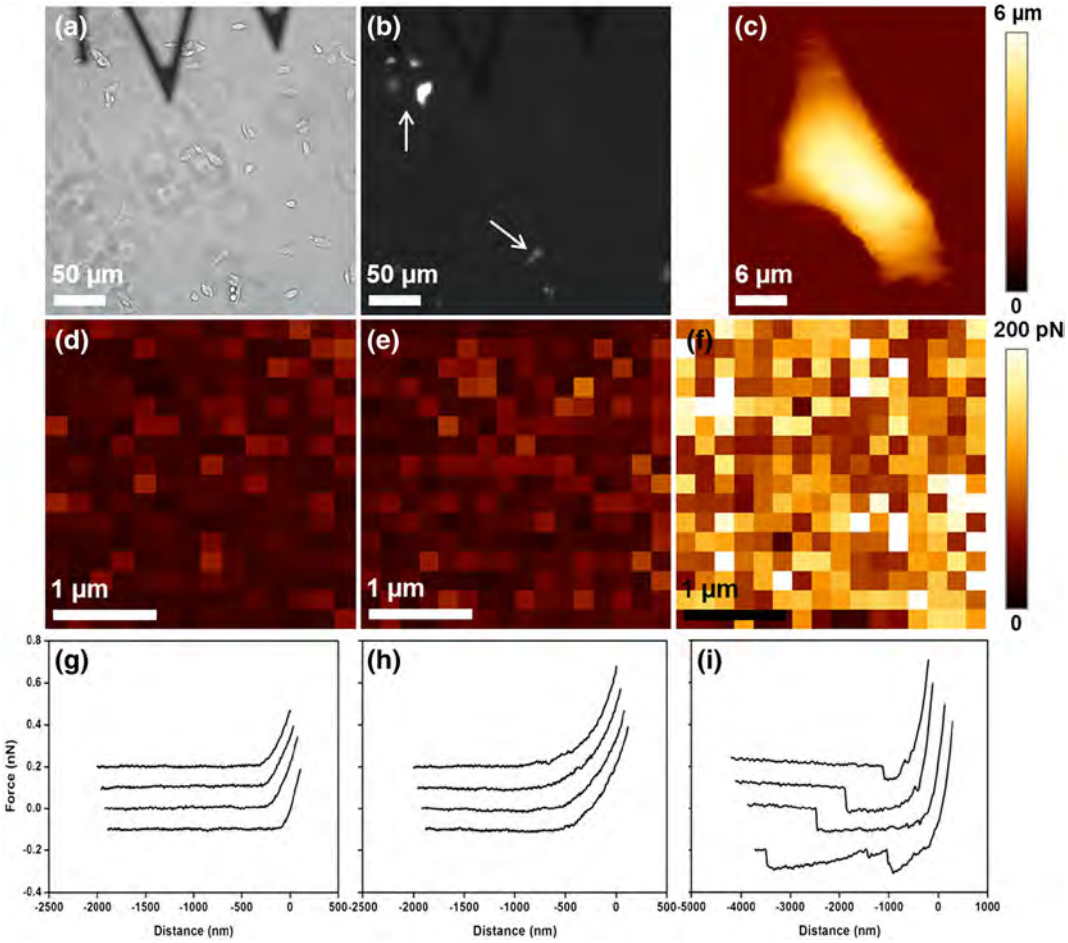


Figure 3. Mapping of HA-tagged β2-adrenergic receptors at the surface of living CHO cells. Optical image of (a) CHO cells immobilized on triphenylphosphine-coated Petri dishes during AFM experiments and (b) fluorescent CHO cells (transfected cells). (c) AFM height image of a single CHO cell. Adhesion map (d) of a small area recorded with HA tips on top of a control CHO cell, (e) of a CHO cell transfected with an empty plasmid, and (f) of a CHO cell transfected with a plasmid coding for HA-tagged β2-adrenergic receptors. (g, h, and i) Representative force curves on top of the cells.

be found in the literature (Le *et al.*, 2011). However, it is important to measure the relationship between the adhesion probability and the contact time for at least two reasons: Firstly, it is a proof that a specific recognition is probed; secondly, it gives an idea of a reasonable contact time that could be used on living cells.

We then used our HA–anti-HA system to probe the protein Ccw12 at the surface of living cells of the budding yeast *S. cerevisiae*. Yeast cells are surrounded by a thick cell wall, composed of β1,3-glucans and β1,6-glucans, chitin, mannans, and proteins (Lipke and Ovalle, 1998). Cell wall proteins are mannoproteins that play important roles, both as structural components and as enzymes involved in cell–cell interaction and cell wall assembly (Hagen *et al.*, 2004). The Ccw12p, the protein studied, is one of these CCW proteins that belongs to the family of cell wall proteins attached by a modified glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor to β-glucans (Orlean, 2012) and that can be released by β-1, 3-glucanases (Mrsa *et al.*, 1999). Loss of Ccw12p results in reduced growth rate, increased sensitivity to cell wall perturbing agents calcofluor white and Congo red, and increased amount of cell wall chitin, suggesting that Ccw12p is required for the maintenance of cell wall stability (Mrsa *et al.*, 1999; Ragni *et al.*, 2007). Furthermore, it has been showed by electron microscopy that Ccw12p is playing a role in the formation of a tightly packed outer mannan layer protecting the inner glucan networks (Ragni *et al.*, 2007). The results that we obtained on the *ccw12*Δ mutant are consistent with these data. Indeed, retract adhesions obtained on the force curves recorded on this mutant are not specific, as they occur far away from the contact point. These retract adhesions can be compared with sugar adhesions, as it has been previously seen at the surface of live yeast cells (Alsteens *et al.*, 2008; Francius *et al.*, 2008). This would be consistent with the role of Ccw12p in maintaining cell wall stability by forming a tight mannan layer; when the protein is not present, the cell wall architecture is modified so that polysaccharides can be stretched off the surface. We then probed the surface of the same strain but complemented with a plasmid expressing the HA-Ccw12 protein. In this case, there were no more retract adhesions on force curves, suggesting that in this strain, the protein has been reintroduced and has played its native function in the remodeling of the cell wall, as no polysaccharides were stretched. However, it was expected, in this case, to probe the Ccw12 protein thanks to our functionalized AFM tip. We could not stretch it, meaning that the protein was either not there or not accessible to the functionalized probe. The first hypothesis could be quickly evacuated. Compared with the mutant Δ*Ccw12*, the outer layer of polysaccharides could not be stretched, meaning that the phenotype caused by the loss of Ccw12 was restored upon expression of the HA-Ccw12 protein. Therefore, the fusion protein exerted the same function as the wild-type protein. To test the

Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

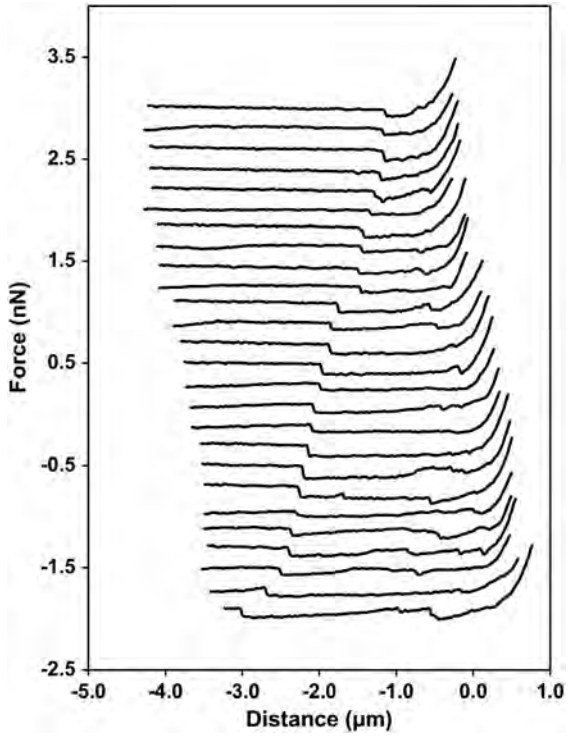


Figure 4. Detail of the force curves obtained on CHO cells transfected with a plasmid coding for HA-tagged β2-adrenergic receptors.

second hypothesis and knowing that the Ccw12 role is also to preserve the cell wall integrity at sites of active growth (Ragni *et al.*, 2011), we decided to look for Ccw12 on mating projections (shmoos) where active cell wall synthesis occurs. Indeed, it has been previously showed that GPI-anchored proteins in *Candida albicans*, another yeast species, could be embedded into the glucan layers deep enough to be hidden from the surface of round cells (Boisramé *et al.*, 2011). However, the same proteins have been shown to be exposed on hyphal forms of *C. albicans* (Monniot *et al.*, 2013), meaning that changes in the cell wall organization between two morphological types of the same species could expose the proteins. Such a phenomenon could happen in *S. cerevisiae*, because Ccw12p is also embedded in the glucan layer of the cell wall and could be exposed on a different morphological type, such as mating projections. When we probed the surface of a mating projection of this strain complemented, at the tip of the shmoo, the anti-HA tip could, indeed, interact specifically with HA epitopes, meaning that the protein, accumulated at this particular area on the shmoo tip, was accessible. The results are in agreement with different studies (Seidel and Tanner, 1997; Ragni *et al.*, 2011) and especially the one of Ragni *et al*. in which the genetic interaction network of Ccw12 is studied. The authors demonstrate that Ccw12 is required for cell wall integrity during active cell wall synthesis (budding and shmoo formation) and accumulates in these regions. Indeed, they use the Ccw12 protein marked with GFP in order to localize it in the cell; their results show that this protein strongly accumulates in areas of active cell wall synthesis, meaning at the budding site on the cell surface of mother cells, at the periphery of small buds, at the septum after cytokinesis, and at the tip of mating projections. This would explain why we could not unfold it from exponential-phase yeast cells; the protein is perhaps embedded into the cell wall of round cells and therefore not accessible with the AFM tip. This localization of the protein confirms an essential function of this protein in ensuring cell wall stability during mating processes.

Finally, in the last part of our study, we used the anti-HA tip on CHO cells overexpressing the human β2 adrenergic G protein-coupled receptor. Only one study, by Zocher *et al.*, has focused on the unfolding of this specific receptor (Zocher *et al.*, 2012). In this pioneering work, the authors have reconstituted single units of the β2-AR into phospholipid bilayers and used SMFS to characterize it. For that, an AFM tip was pushed onto the membrane at a force of 0.7 nN, which promotes the adhesion of single-protein polypeptides to the bare AFM tip, and retracted while recording the cantilever deflection (force). This allows therefore the unfolding of only one receptor, out of a membrane containing only this receptor, in 0.5% of the force curves recorded. They found that the force required to unfold the different domains of the β2-AR was ranging between 30 and 220 pN, depending on the domain considered, the LR but also the lipidic environment (the presence or absence of cholesteryl hemisuccinate mimicking cholesterol). In our experiments, CHO cells not only expressed β2-AR receptors but also other plasma membrane components. This is why we needed to find a way to specifically probe the β2-AR, and thus, we tagged the receptor with an extracellular HA epitope. This allowed the specific unfolding of β2-AR receptors at the surface of living cells, which is, as far as we know, the first time that this phenomenon was recorded in living cells. However, unlike Zocher's work, we were not able to measure single-receptor unfolding. Indeed, it has been showed that G-coupled protein receptors, like other TM receptors, can form dimers and higher order oligomers at the surface of living cells (Bouvier, 2001). Indeed, despite fully functional GPCR monomers were described in reconstituted nanodiscs (Whorton *et al.*, 2007; El Moustaine *et al.*, 2012), large amounts of studies reported that GPCR oligomers can spontaneously form in living cells (GPCR Oligomerization Knowledge Base, http://www.gpcr-okb.org, Khelashvili *et al.*, 2010). More recently, the receptor oligomer size was directly correlated with the receptor expression level (Calebiro *et al.*, 2013). Consistent with this notion, in our conditions, the β2-ARs are overexpressed, meaning that number of them is expressed at the cell surface, which could force the oligomerization process and lead to subsequent formation of higher order oligomers. It seems therefore difficult to conclude directly from our results whether β2-AR monomers are really a rare event in living cells that could explain why we could not unfold single receptors or whether a high-order oligomer is a general feature of this receptor, in agreement with our results showing that we were more generally able to unfold only oligomerized receptors at different orders. These unfoldings, represented in Figure 4, are ranging from 170 nm for the smallest (estimation of one β2-AR protomer) to 3.5 µm for the longest (~20 receptor clusters). The size of GPCR oligomer complexes is really a matter of debate, and its estimation seems most likely to be relying on the technological approach (Ferré *et al.*, 2014). However, AFM analysis of native disk membranes isolated from mice led to the visualization of rhodopsin arrangement in arrays of dimers (Fotiadis *et al.*, 2003), which could be consistent with large unfoldings presented in our study. Despite the fact that our data strongly support the concept of GPCR oligomerization at the plasma membrane of cultured cells (Bulenger *et al.*, 2005), we cannot, however, completely rule out that longer receptor unfoldings could also reflect heterodimerization of the β2-AR with other TM proteins (other endogenously expressed GPCRs, tyrosine kinase receptors or accessory proteins), as

 Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

previously described (Achour *et al.*, 2008). These data are of first interest and will allow, in the future, answering new questions about the organization of GPCRs at the surface of living cells or about their behavior to different stimuli in their native environment.

CONCLUSIONS

In this study, we developed a functionalized AFM tip with antibodies targeting the widely used HA epitope. The anti-HA tips, first validated on a model surface, were used on two biological systems, the yeast *S. cerevisiae* and higher eukaryotic CHO cells. In the first case, we mapped the Ccw12 protein, essential for maintaining of the cell wall stability, only at the tip of mating projections. In the second case, the anti-HA tip allowed us for the first time to unfold the β2-AR receptor from the surface of living cells. Our anti-HA tip is therefore a versatile tool that can be used in all types of molecular systems as long as they involve an HA-epitope tag, at the surface of living cells, both microorganisms and mammalian cells.

Acknowledgements

This work was supported by an ANR young scientist program (AFMYST project ANR-11-JSV5-001-01 no SD 30024331) to E. D. and FRM (ING20140129094). E. D. is a researcher at the Centre National de Recherche Scientifique. C. F. and V. L. are respectively supported by a grant from "Direction Générale de l'Armement" and from Toulouse University – Région Midi-Pyrénées.

REFERENCES

Achour L, Labbé-Jullié C, Scott MGH, Marullo S. 2008. An escort for GPCRs: implications for regulation of receptor density at the cell surface. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**: 528–535.

Alsteens D, Dupres V, Mc Evoy K, Wildling L, Gruber HJ, Dufrene YF. 2008. Structure, cell wall elasticity and polysaccharide properties of living yeasts cells, as probed by AFM. *Nanotechnology* **19**: 384005.

Alsteens D, Garcia MC, Lipke PN, Dufrêne YF. 2010. Force-induced formation and propagation of adhesion nanodomains in living fungal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**: 20744–20749.

Baumgartner W, Hinterdorfer P, Ness W, Raab A, Vestweber D, Schindler H, Drenckhahn D. 2000. Cadherin interaction probed by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 4005–4010.

Benoit M, Gabriel D, Gerisch G, Gaub HE. 2000. Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy. *Nat. Cell Biol.* **2**: 313–317.

Binnig G, Quate CF, Gerber C. 1986. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**: 930–934.

Boisramé A, Cornu A, Costa GD, Richard ML. 2011. Unexpected Role for a Serine/Threonine-Rich Domain in the Candida albicans Iff Protein Family. *Eukaryot. Cell* **10**: 1317–1330.

Bouvier M. 2001. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**: 274–286.

Bulenger S, Marullo S, Bouvier M. 2005. Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol. Sci.* **26**: 131–137.

Bustanji Y, Arciola CR, Conti M, Mandello E, Montanaro L, Samorí B. 2003. Dynamics of the interaction between a fibronectin molecule and a living bacterium under mechanical force. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 13292–13297.

Calebiro D, Rieken F, Wagner J, Sungkaworn T, Zabel U, Borzi A, Cocucci E, Zürn A, Lohse MJ. 2013. Single-molecule analysis of fluorescently labeled G-protein-coupled receptors reveals complexes with distinct dynamics and organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 743–748.

Chopinet L, Formosa C, Rols MP, Duval RE, Dague E. 2013. Imaging living cells surface and quantifying its properties at high resolution using AFM in QI™ mode. *Micron* **48**: 26–33.

Dague E, Jauvert E, Laplatine L, Viallet B, Thibault C, Ressier L. 2011. Assembly of live micro-organisms on microstructured PDMS stamps by convective/capillary deposition for AFM bio-experiments. *Nanotechnology* **22**: 395102.

Dague E, Trevisiol E, Jauvert E. 2010. Pointes de microscope à force atomique modifiées et biomodifiées.

Dufrêne YF, Evans E, Engel A, Helenius J, Gaub HE, Müller DJ. 2011. Five challenges to bringing single-molecule force spectroscopy into living cells. *Nat. Methods* **8**: 123–127.

Ebner A, Wildling L, Zhu R, Rankl C, Haselgrübler T, Hinterdorfer P, Gruber HJ. 2008. Functionalization of probe tips and supports for single-molecule recognition force microscopy. *Top. Curr. Chem.* **285**: 29–76.

El Moustaine D, Granier S, Doumazane E, Scholler P, Rahmeh R, Bron P, Mouillac B, Banères J-L, Rondard P, Pin J-P. 2012. Distinct roles of metabotropic glutamate receptor dimerization in agonist activation and G-protein coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 16342–16347.

El-Kirat-Chatel S, Beaussart A, Boyd CD, O'Toole GA, Dufrêne YF. 2014a. Single-Cell and Single-Molecule Analysis Deciphers the Localization, Adhesion, and Mechanics of the Biofilm Adhesin LapA. *ACS Chem. Biol.* **9**: 485–494.

El-Kirat-Chatel S, Boyd CD, O'Toole GA, Dufrêne YF. 2014b. Single-Molecule Analysis of Pseudomonas fluorescens Footprints. *ACS Nano* **8**: 1690–1698.

Evans E, Ritchie K. 1997. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys. J.* **72**: 1541–1555.

Ferré S, Casadó V, Devi LA, Filizola M, Jockers R, Lohse MJ, Milligan G, Pin J-P, Guitart X. 2014. G Protein–Coupled Receptor Oligomerization Revisited: Functional and Pharmacological Perspectives. *Pharmacol. Rev.* **66**: 413–434.

Florin EL, Moy VT, Gaub HE. 1994. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science* **264**: 415–417.

Formosa C, Grare M, Jauvert E, Coutable A, Regnouf-de-Vains JB, Mourer M, Duval RE, Dague E. 2012. Nanoscale analysis of the effects of antibiotics and CX1 on a Pseudomonas aeruginosa multidrug-resistant strain. *Sci. Rep.* **2**: 575.

Formosa C, Schiavone M, Martin-Yken H, François JM, Duval RE, Dague E. 2013. Nanoscale Effects of Caspofungin against Two Yeast Species, Saccharomyces cerevisiae and Candida albicans. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**: 3498–3506.

Fotiadis D, Liang Y, Filipek S, Saperstein DA, Engel A, Palczewski K. 2003. Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature* **421**: 127–128.

Francius G, Lebeer S, Alsteens D, Wildling L, Gruber HJ, Hols P, Keersmaecker SD, Vanderleyden J, Dufrêne YF. 2008. Detection, Localization, and Conformational Analysis of Single Polysaccharide Molecules on Live Bacteria. *ACS Nano* **2**: 1921–1929.

Francois JM, Formosa C, Schiavone M, Pillet F, Martin-Yken H, Dague E. 2013. Use of atomic force microscopy (AFM) to explore cell wall properties and response to stress in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Curr. Genet.* **59**: 187–196.

Galés C, Van Durm JJJ, Schaak S, Pontier S, Percherancier Y, Audet M, Paris H, Bouvier M. 2006. Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor–G protein complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**: 778–786.

Ganchev DN, Rijkers DTS, Snel MME, Killian JA, de Kruijff B. 2004. Strength of Integration of Transmembrane α-Helical Peptides in Lipid Bilayers As Determined by Atomic Force Spectroscopy†. *Biochemistry (Mosc.)* **43**: 14987–14993.

George SR, O'Dowd BF, Lee SP. 2002. G-Protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**: 808–820.

Gerber C, Lang HP. 2006. How the doors to the nanoworld were opened. *Nat. Nanotechnol.* **1**: 3–5.

Gietz RD, Schiestl RH. 2007. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protoc.* **2**: 31–34.

Hagen I, Ecker M, Lagorce A, Francois JM, Sestak S, Rachel R, Grossmann G, Hauser NC, Hoheisel JD, Tanner W, Strahl S. 2004. Sed1p and Srl1p are required to compensate for cell wall instability in Saccharomyces cerevisiae mutants defective in multiple GPI-anchored mannoproteins. *Mol. Microbiol.* **52**: 1413–1425.

Hinterdorfer P, Baumgartner W, Gruber HJ, Schilcher K, Schindler H. 1996. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 3477–3481.

Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

Jauvert E, Dague E, Séverac M, Ressier L, Caminade A-M, Majoral J-P, Trévisiol E. 2012. Probing single molecule interactions by AFM using bio-functionalized dendritips. *Sens. Actuators, B Chem.* **168**: 436–441.

Kamruzzahan AS, Ebner A, Wildling L, Kienberger F, Riener CK, Hahn CD, Pollheimer PD, Winklehner P, Hölzl M, Lackner B, Schörkl DM, Hinterdorfer P, Gruber HJ. 2006. Antibody Linking to Atomic Force Microscope Tips via Disulfide Bond Formation. *Bioconjug. Chem.* **17**: 1473–1481.

Khelashvili G, Dorff K, Shan J, Camacho-Artacho M, Skrabanek L, Vroling B, Bouvier M, Devi LA, George SR, Javitch JA, Lohse MJ, Milligan G, Neubig RR, Palczewski K, Parmentier M, Pin JP, Vriend G, Campagne F, Filizola M. 2010. GPCR-OKB: the G Protein Coupled Receptor Oligomer Knowledge Base. *Bioinf. Oxford Eng.* **26**: 1804–1805.

Kienberger F, Kada G, Mueller H, Hinterdorfer P. 2005. Single Molecule Studies of Antibody–Antigen Interaction Strength Versus Intramolecular Antigen Stability. *J. Mol. Biol.* **347**: 597–606.

Lama G, Papi M, Angelucci C, Maulucci G, Sica G, De Spirito M. 2013. Leuprorelin Acetate Long-Lasting Effects on GnRH Receptors of Prostate Cancer Cells: An Atomic Force Microscopy Study of Agonist/Receptor Interaction. *PLoS One* **8**: e52530.

Le DTL, Guérardel Y, Loubière P, Mercier-Bonin M, Dague E. 2011. Measuring Kinetic Dissociation/Association Constants Between Lactococcus lactis Bacteria and Mucins Using Living Cell Probes. *Biophys. J.* **101**: 2843–2853.

Lee AG. 2004. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1666**: 62–87.

Lee GU, Chrisey LA, Colton RJ. 1994. Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA. *Science* **266**: 771–773.

Lipke PN, Ovalle R. 1998. Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. *J. Bacteriol.* **180**: 3735–3740.

Manglik A, Kobilka B. 2014. The role of protein dynamics in GPCR function: insights from the β2AR and rhodopsin. *Curr. Opin. Cell Biol.* **27C**: 136–143.

Maxfield FR. 2002. Plasma membrane microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**: 483–487.

Merlini L, Dudin O, Martin SG. 2013. Mate and fuse: how yeast cells do it. *Open Biol.* **3**: 130008.

Monniot C, Boisramé A, Da Costa G, Chauvel M, Sautour M, Bougnoux M-E, Bellon-Fontaine M-N, Dalle F, d'Enfert C, Richard ML. 2013. Rbt1 Protein Domains Analysis in Candida albicans Brings Insights into Hyphal Surface Modifications and Rbt1 Potential Role during Adhesion and Biofilm Formation. *PLoS One* **8**: e82395.

Mrsa V, Ecker M, Strahl-Bolsinger S, Nimtz M, Lehle L, Tanner W. 1999. Deletion of New Covalently Linked Cell Wall Glycoproteins Alters the Electrophoretic Mobility of Phosphorylated Wall Components of Saccharomyces cerevisiae. *J. Bacteriol.* **181**: 3076–3086.

Müller DJ, Helenius J, Alsteens D, Dufrêne YF. 2009. Force probing surfaces of living cells to molecular resolution. *Nat. Chem. Biol.* **5**: 383–390.

Orlean P. 2012. Architecture and Biosynthesis of the Saccharomyces cerevisiae Cell Wall. *Genetics* **192**: 775–818.

Phillips R, Ursell T, Wiggins P, Sens P. 2009. Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. *Nature* **459**: 379–385.

Ragni E, Piberger H, Neupert C, García-Cantalejo J, Popolo L, Arroyo J, Aebi M, Strahl S. 2011. The genetic interaction network of CCW12, a Saccharomyces cerevisiae gene required for cell wall integrity during budding and formation of mating projections. *BMC Genomics* **12**: 107.

Ragni E, Sipiczki M, Strahl S. 2007. Characterization of Ccw12p, a major key player in cell wall stability of Saccharomyces cerevisiae. *Yeast* **24**: 309–319.

Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weis WI, Kobilka BK. 2007. Crystal structure of the human β2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**: 383–387.

Rief M, Gautel M, Oesterhelt F, Fernandez JM, Gaub HE. 1997b. Reversible Unfolding of Individual Titin Immunoglobulin Domains by AFM. *Science* **276**: 1109–1112.

Rief M, Oesterhelt F, Heymann B, Gaub HE. 1997a. Single Molecule Force Spectroscopy on Polysaccharides by Atomic Force Microscopy. *Science* **275**: 1295–1297.

Robinson CV, Sali A, Baumeister W. 2007. The molecular sociology of the cell. *Nature* **450**: 973–982.

Ros R, Schwesinger F, Anselmetti D, Kubon M, Schäfer R, Plückthun A, Tiefenauer L. 1998. Antigen binding forces of individually addressed single-chain Fv antibody molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 7402–7405.

Seidel J, Tanner W. 1997. Characterization of two new genes down-regulated by alpha-factor. *Yeast Chichester Eng.* **13**: 809–817.

Sonnino S, Prinetti A. 2012. Membrane Domains and the Lipid Raft Concept. *Curr. Med. Chem.* **20**: 4–21.

Whorton MR, Bokoch MP, Rasmussen SGF, Huang B, Zare RN, Kobilka B, Sunahara RK. 2007. A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 7682–7687.

Wildling L, Unterauer B, Zhu R, Rupprecht A, Haselgrübler T, Rankl C, Ebner A, Vater D, Pollheimer P, Pohl EE, Hinterdorfer P, Gruber HJ. 2011. Linking of Sensor Molecules with Amino Groups to Amino-Functionalized AFM Tips. *Bioconjug. Chem.* **22**: 1239–1248.

Zhang X, Shi X, Xu L, Yuan J, Fang X. 2013. Atomic force microscopy study of the effect of HER 2 antibody on EGF mediated ErbB ligand–receptor interaction. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **9**: 627–635.

Zocher M, Zhang C, Rasmussen SGF, Kobilka BK, Müller DJ. 2012. Cholesterol increases kinetic, energetic, and mechanical stability of the human β2-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: E3463–E3472.

Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

233. Etude par spectroscopie de force à l'échelle de la molécule unique de l'architecture oligomérique de protéines membranaires

Lachaize V, Formosa-Dague C, Poirot M, Galandrin S, Sénard JM, Galés C, Dague E

"La Spectroscopie de Force à l'échelle de la molécule unique appliquée aux RCPGstaggés HA révèle l'organisation et la dynamique des récepteurs à la surface de cellules vivantes"

(à soumettre)

La Spectroscopie de Force à l'échelle de la molécule unique appliquée aux RCPGs taggés HA révèle l'organisation et la dynamique des récepteurs à la surface de cellules vivantes

Véronique Lachaize[1,2,3,4], Cécile Formaosa-Dague[2,3,5], Mathias Charles Poirot[4], Ségolène Galandrin[4], Jean-Michel Sénard[4], Céline Galés[4, 3], Etienne Dague[1,2,3]

[1] CNRS, ITAV-USR3505 ; F-31100 Toulouse, France
[2] CNRS, LAAS, 7 avenue du colonel Roche, F-31400 Toulouse, France
[3] Université de Toulouse, UPS, ITAV, LAAS, F-31000 Toulouse, France
[4] Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, INSERM UMR 1048, Toulouse, France.
[5] Université de Lorraine, UMR 7565, Faculté de Pharmacie, Nancy, France

Introduction

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) composent une des plus grandes familles de récepteurs transmembranaires chez les eucaryotes, codés par plus de 800 gènes. Cette super famille de protéines a été sous divisée en 6 familles (de A à F) selon une classification basée sur l'homologie de séquence et les similarités fonctionnelles appelé GRAFS[1] (Glutamate, Rhodopsin, Adhesion, Frizzled/Tats2, Seretin). La famille A est la plus importante et regroupe 85% de tous les RCPG. Elle se caractérise par une série de résidus fortement conservés, avec un pont disulfure reliant deux boucles extracellulaire (E2 et E3) ainsi qu'une cystéine palmitoylé dans sa région C-term[1,2]. Tous les RCPGs présentent une structure commune de 7 domaines transmembranaires (TM1 – TM7) alternativement liés entre eux par des boucles extracellulaire (EL1 – EL3) et intracellulaires (IL1 - IL3)[3,4]. Ces récepteurs peuvent tout aussi bien être responsables de la détection du goût sucré : des récepteurs sensoriels (TIR Transport Inhibitor Response)[5], qu'être des récepteurs à la mélatonine qui est une hormone permettant la régulation des rythmes chronobiologiques[6] ou même des récepteurs aux chimiokines qui sont de courts peptides (8-14 kDa) permettant l'activation cellulaire et la stimulation de la migration des leucocytes[7]. Leur grand nombre, leur répartition ubiquitaire, et l'hétérogénéité des stimuli reconnus (sensoriels, hormonaux, neurotransmetteurs, facteurs de croissance, …) font des RCPGs les acteurs d'une grande variété de processus physiologiques[8]. Les RCPGs constituent par conséquent aujourd'hui la plus grande cible en pharmacologie avec environ 30% des médicaments sur le marché ciblant ces récepteurs[9]. Des études précises portant sur les mécanismes moléculaires des processus d'activation et de régulation de ces récepteurs devraient permettre de trouver de nouveaux

médicaments plus ciblés, limitant les effets secondaires des traitements. L'un des exemples qui illustre bien cette problématique, est celui de la morphine. En effet la morphine se fixe à un RCPG et plus spécifiquement au récepteur μ-opiacé, permettant une action sédative et analgésique. Cependant la morphine induit des effets secondaires graves tel que la dépression respiratoire, la constipation, et une dépendance physique et psychique. Ces conséquences peuvent être expliquées par le fait que la morphine déclenche une réponse différente de celle des endorphines (morphine endogène). Ces deux molécules ont la même cible, cependant la morphine active d'autres mécanismes de signalisation responsables des effets secondaires[10]. Sur ce constat, de nombreuses études ont été effectuées ces 30 dernières années pour tenter d'améliorer ces traitements, les rendre plus spécifiques et de mieux comprendre les raisons de ces effets secondaires afin de les diminuer voir de les supprimer. Ces recherches ont révélé de nombreux détails fondamentaux sur les mécanismes et la cinétique de signalisation, mais aussi des aspects inconnus sur la structure [3,4,11] des RCPGs. Dans le cas de la morphine, le récepteur μ-opiacé, liant la morphine, est stabilisé dans une conformation spatiale différente de celle prise par le récepteur liant l'endorphine. En effet, le récepteur liant l'endorphine est sous forme dimérique[10] alors que celui liant la morphine se retrouve sous forme monomérique La fixation de l'endorphine dans la cavité va se fixer spécifiquement à un résidu accessible seulement après dimérisation alors que la fixation de la molécule de morphine ne nécessite pas cette spécificité.

Cette question d'oligomerisation des RCPGs et d'architecture de ces récepteurs à la surface de la membrane plasmique des cellules reste aujourd'hui très controversée. Elle est cependant essentielle pour mieux comprendre les mécanismes d'activation de ces récepteurs puisqu'ils assurent la conversion des signaux extracellulaires en signaux intracellulaires au niveau de cette membrane plasmique. Est-ce que les RCPGs ont une activité régulée par leur organisation oligomérique en cellules vivantes comme semble sous-entendre l'exemple de la morphine[10] ? L'observation d'autres familles de récepteurs transmembranaires tel que les récepteurs protéine-tyrosine kinase (RTK), les récepteurs cytokine, les récepteurs TNF, ect…, montre que la forme active (c'est à dire capable de transduire le signal et initier la réponse physiologique[12]) est dimérique voir oligomérique[13]. Les mécanismes de dimérisation décrits sont de 3 sortes :

- Dimérisation ou oligomérisation faite par l'intermédiaire direct des ligands.

C'est le cas par exemple, des RTK : les ligands possèdent deux ou plusieurs sites de liaison pour les recepteurs, ce qui leur permet de regrouper plusieurs récepteurs entre eux

- Pour d'autres comme les récepteurs aux cytokines c'est la fixation du ligand qui induit un changement conformationnel du domaine extracellulaire du récepteur, révélant ainsi un site d'interaction entre deux récepteurs
- Dans d'autres cas, enfin, c'est un effecteur intracellulaire qui regroupe les récepteurs comme c'est le cas pour les récepteurs TNF, qui sont oligomérisés par une protéine

intracellulaire afin d'accueillir le ligand TNF qui finalisera l'activation du récepteur et la transduction du signal [14].

De par leur homologie en tant que récepteurs transmembranaires la forme active des RCPGs pourrait également reposer sur une forme dimérique ou oligomérique de ces récepteurs. Cette question n'est cependant pas tranchée expérimentalement et divise la communauté scientifique. En effet deux paradigmes s'opposent et sont débattus dans la littérature[15–21]. Le premier propose que les RCPG soient actifs en monomère sous la forme de complexe ternaire (le ligand, le récepteur, et sa protéine G liée) [22]. La seconde avance que les RCPGs sont actifs sous forme de dimères voire d'oligomères, comme pour la majeure partie des récepteurs transmembranaires [15,23].

Répondre à cette interrogation « les RCPGs présentent-ils ou non une activité différente selon leur degré d'oligomérisation ? » constitue un défi pour la recherche. Néanmoins, les technologies disponibles aujourd'hui pour étudier l'architecture des récepteurs à la surface cellulaire sont rares. La technologie de choix est la méthode de transfert d'énergie par résonance (RET) dont le principe est basé sur des mesures de proximités de distance grâce à un principe biophysique de transfert d'énergie. Cette méthode a permis de détecter le phénomène d'interaction protéique considéré comme preuve d'oligomérisation[24]. Deux autres méthodes dérivant de cette technologie RET sont encore aujourd'hui largement utilisées pour l'étude de l'oligomérisation des RCPGs, la Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) et la Bioluminescence Resonance Energy Transfer (or BRET), toutes deux utilisent une detection de formation d'un complexe entre les deux molécules grâce au marquage de la protéine A avec un donneur, qui une fois excité par une source externe, va dégager de l'énergie qui excitera la protéine B marquée par un accepteur si cette dernière est à une distance inférieur à 10 A. L'excitation de la molécule acceptrice pourra être détectée par mesure de la fluorescence[25–28]. Cependant leurs utilisations peuvent être pondéré par l'apparition d'un débat intense il y a quelques années sur la présence éventuelle de détection de phénomène de dimérisation en raison de collisions aléatoire[29,30]. Une autre stratégie a été développée pour marquer directement les RCPGs par des fluorophores de petites tailles, appelé SNAP tag, dans leur partie extracellulaire N-terminale et les détecter ensuite par microscope de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF). Cette étude a montré que selon la nature, et la quantité de RCPGs, leur organisation dans la membrane peut être différente[31]. En effet, les auteurs montrent qu'à faible densité, le récepteur adrénergique beta 1 (β1-AR) existe de façon prédominante à l'état de monomère mais que quand la densité de récepteurs dans la membrane augmente, la proportion de dimères augmente aussi. De façon similaire, pour le récepteur adrénergique beta 2 (β2-AR) quand la densité de récepteur augmente, la proportion de dimères augmente. De plus, et à la différence de β1-AR, les dimères β2-AR sont présents même à faible densité (0,15-0,3 particule/μm^2), et des oligomères d'ordre supérieur sont décrits à forte

densité (0,45 particule/μm^2). Dans cette étude, les auteurs suggèrent que la dimérisation ainsi que l'oligomérisation sont des phénomènes très dynamiques mais pas aléatoires en calculant la durée de vie des dimères issus de collision aléatoire (1,08 s) et celle des dimères issus d'interaction spécifique récepteur-récepteur (4,17-5,93 s). L'hypothèse de l'existence de RCPGs sous forme dimérique et oligomérique semble donc vérifiée. Cependant, dans cette étude, les auteurs n'ont pas identifié de modifications de l'organisation dimérique/oligomérique après stimulation par un agoniste. On est donc en droit de se demander pourquoi une telle organisation existe si cela n'est d'avoir un rôle de régulation de l'activité. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude, dans laquelle nous nous sommes proposés d'observer l'organisation des RCPGs à la surface de cellules vivantes. Nous avons choisi de travailler essentiellement sur deux récepteurs de la famille A : le récepteur de l'angiotensine II de type 1 (AT1) et le récepteur adrénergique beta 2 (β2-AR), ainsi que sur un RCPG de la famille C. Nous nous sommes intéressés à l'organisation de ces RCPGs à l'état basal. Mais également à leur organisation après une stimulation longue par leur agoniste synthétique et/ou endogène. En effet, sous activation chronique, les RCPGs sont, pour la plupart, rapidement internalisés après stimulation par leur ligand c'est à dire que le récepteur est endocyté et va disparaitre de la surface cellulaire soit pour être dégradé et marquer ainsi l'arrêt de la transduction du signal, soit pour initier une nouvelle signalisation intracellulaire. La voie majeure d'internalisation des RCPGs est la voie dite dépendante de la clathrine, qui passe par des structures en forme de puits insérées dans la membrane plasmique recouvertes de clathrine. Après avoir été internalisé, un RCPG peut également être recyclé à la membrane ou être dégradé[32]. Il sera donc intéressant d'étudier l'organisation de ces récepteurs après leur internalisation et également de voir si leur organisation est différente par rapport à la condition basale ou selon le type d'agoniste (synthétique ou endogène). Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé la microscopie à force atomique (AFM) et plus particulièrement le mode spectroscopie de force à l'échelle de la molécule unique.

Cette technologie a été développée en 1986 par Binning et al.[33] , et permet d'accéder à l'échelle nanométrique. Son principe repose sur l'application d'une force, maintenue constante, entre une pointe et un échantillon, la pointe AFM effectuant un balayage de la surface de l'échantillon afin d'obtenir une image tridimensionnelle. Le grand avantage de cette microscopie est que les mesures peuvent se faire en milieu liquide et en atmosphère contrôlée (CO_2 et température) donc sur cellules vivantes. De plus, l'AFM n'est pas qu'une technologie d'imagerie, c'est d'abord une machine de force de haute résolution (à l'échelle du pN). Le mode force volume permet d'obtenir des courbes de forces en chaque point d'une matrice définissant les contacts entre la pointe et l'échantillon. Ces courbes nous donnent accès à la nanomécanique et aux propriétés adhésives de l'échantillon sondé. La Spectroscopie de Force à l'échelle de la Molécule Unique (SMFS) [31–36] s'est développée dans ce contexte grâce aux progrès en chimie de surface. Dans ce mode de SMFS les

pointes AFM interagissent avec des biomolécules immobilisées sur des substrats ou des biomembranes artificielles ou présentes à la surface de cellules vivantes afin d' en étudier les interactions intra et inter-moléculaires [39,40]. Pour rendre l'interaction entre la pointe et la molécule étudiée spécifique, il est nécessaire de fonctionnaliser la pointe[34,41–45]. La fonctionnalisation consiste à lier à la pointe un anticorps spécifique ciblant la protéine d'intérêt, cependant il peut être difficile d'obtenir l'anticorps reconnaissant la protéine membranaire native avec une spécificité assez élevée ce qui limite l'utilisation de cette méthode. Pour contourner cette difficulté, les biologistes ont développé une stratégie génétique consistant à marquer leurs protéines d'intérêts en N- ou C-terminal avec de petites « étiquettes » spécifiques. La pointe AFM est donc fonctionnalisée par un anticorps dirigé contre ces « étiquettes ». En général, les plus utilisés sont des épitopes tels que Human influenza hemagglutinin (HA) (YPYDVPDYA), tag FLAG (DYKDDDDK) ou tag myc (EQKLISEEDL)[46–50].

Dans cette étude, nous avons utilisé nos RCPGs d'intérêts (B2-AR AT1, et mGlu3) fusionnés à une étiquette HA dans leur partie en N-terminale extracellulaire et donc de fonctionnaliser notre pointe avec un anticorps anti-HA. Cette interaction a été validée dans le chapitre 2,dans l'article « Mapping HA-tagged protein at the surface of living cells by atomic force microscopy »[51]. Lorsque l'interaction entre la pointe et la molécule a lieu, les courbes de retrait montrent un événement adhésif spécifique du RCPG, que nous caractériserons par la force de rupture et la distance de rupture entre la pointe et la surface. La distance de rupture sera analysée pour déduire l'organisation des récepteurs dans différentes conditions (quantité d'expression de récepteur, présence d'un ligand etc).

Nous nous intéresserons dans un premier temps, à l'analyse de nos courbes de force afin d'observer la distribution des distances de déploiements, et de vérifier si ce pattern de distributions est reproductible chez tous nos RCPGs étudiés (HA_AT1, HA- ARβ2 HA-mGlu3). Puis, grâce à une protéine chimérique, le récepteur AT1 fusionné dans sa partie C-terminale intracellulaire à une protéine G qui aura un rôle d'ancrage, nous chercherons à vérifier que l'on accroche spécifiquement un récepteur. Une fois ces paramètres validés, nous avons étudié l'effet de la densité de récepteurs présents sur la surface membranaire grâce à des quantités transfectées de plasmides codant pour des RCPGs croissantes (0.01 µg /0.1 µg/1 µg/) afin d'observé l'impact de la densité de récepteurs sur la surface cellulaire sur leur organisation oligomérique. Puis sera étudié l'influence de différents ligands synthétiques et endogènes (Angiotensine II pour AT1, Isoprotérenol/Epinephrine/Norepinephrine pour ARβ2) sur l'architecture de ces récepteurs à la membrane plasmique afin de tenter de comprendre si une des formes oligomériques de ces récepteurs présente la conformation active du RCPGs et pourra donc fixer le ligand.

Matériels & Méthodes

Conditions de culture et de transfection CHO

Les cellules utilisées sont des Chinese Hamster Ovary WTT (Wild Type Toronto, WTT, ATCC) modifiées par une suite d'electroporations spécifiques permettant d'augmenter le taux de transfection[52]. Ces cellules ont été choisies au détriment d'autres car elles présentent de meilleurs conditions d'acquisitions AFM, en effet elles n'adhérent pas à la pointe AFM lors de l'enregistrement Ces cellules ont été cultivées dans un milieu Minimum Eagle's Medium (MEM) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, 1% Peniciline/Streptavidine (100 u.mL-1) Strepatvidine (100 mg.mL-1) et incubées à 37°C dans une atmosphère à 5 % de CO_2.

Les expérimentations se déroulaient sur 4 jours :

Jour 1 : ensemencement des cellules CHO à 120 000 cellules/mL

Jour 2 : transfection du plasmide contenant l'ADN codant pour le RCPG d'intérêt (AT1/AT1-Gq/Arβ2/mGlu3) à différentes concentration 0,01µg/0,1µg/1µg par l'agent transfectant Xtrem (X-tremeGENE™ 9 DNA Transfection Reagent)

Jour 3 : ensemencement des cellules transfectées dans un Petri (JPK) à 75 000 cellules / mL

Jour 4 : Acquisitions AFM après remplacement du milieu MEM précèdent par du DMEM-HEPES (HEPES 15mM) afin d'apporter les nutriments nécessaires à la cellule

Fonctionnalisation de la pointe AFM

Les pointes AFM ont été fonctionnalisées avec un dendrimère selon la technologie brevetée des dendritips[53,54]. Brièvement des fonctions amines sont greffées par de l'ethanolamine (Fig. 1B8) sur la pointe nue, puis le dendrimère aldhéhydique de 4ème génération est liée de façon covalente à la pointe (Fig. 1B9). Le dendrimère présente à ses 96 extrémités une fonction CHO permettant de réaliser une fonction amide avec l'anticorps-HA. Pour cela, le dendritip (dendrimère lié à la pointe AFM) est incubée 1h dans une solution d'anticorps-HA à une concentration de 0.01 mg/ml (LifeProTein, LT0422, HA.C5 clone monoclonal antibody), puis la liaison nouvellement formée sera réduite par une incubation de 1h30 de $NABH_4$ à 20mM (Fig. 1B10). Une fois l'incubation terminée, le dendritip est rincé 3 fois pendant 5 min dans le milieu DMEM-HEPES avant de commencer les acquisitions AFM.

Acquisition AFM

Le Petri est placé sur le PetriDishHeater (JPK) pour maintenir une température de 37°C tout au long de l'expérience. Les acquisitions de spectroscopie de force en molécule unique (SFMS) ont été faites avec une force maximum d'appui de 0,5 nN, et un temps de pause, sur une matrice de

16x16 points sur une surface de 9 μm^2. Chaque point de la matrice représente une courbe de force (Fig. 1A). Chaque courbe est composé de la courbe d'approche sur laquelle il est possible de retrouver le point de contact (Fig. 1A2) afin de reconstruire la topographie, et obtenir l'indentation grâce à la pente (Fig. 1A3). La courbe de retrait quant à elle va permettre de caractériser les adhésions entre la pointe et l'échantillon (Fig. 1A5), et c'est ces motifs adhésifs que nous avons analysés dans cette étude.

Stimulation par les agonistes des RCPGs

Les CHO transfectées et exprimant des RCPG spécifiques ont été traitées pendant 20 min avec 10 µM des différents ligands Isoprotérénol (Sigma-Aldrich^R), ou Norépinephrine (Sigma-Aldrich^R), ou Epinephrine (Sigma-Aldrich^R), pour le récepteur B2-AR et Angiotensine II (Sigma-Aldrich^R) pour le récepteur AT1. Les cellules ont été ensuite rincées 2 fois au Phosphate Buffered Saline (PBS), réincubées dans un milieu DMEM-HEPES puis analysées immédiatement en AFM

Blocage de l'internalisation des RCPG

Ce blocage a été réalisé par un prétraitement des cellules pendant 1h avec une solution de sucrose 200 mM. Les cellules ont ensuite été rincées deux fois avec du PBS puis réincubées dans un milieu MEM complet avant stimulation par les différents ligands.

Traitements des données

Après l'acquisition AFM, nous obtenons une carte de 256 courbes de forces (CF). Ces CF sont analysées avec le logiciel JPK Data Processing (SPM 5.1.8), soit 256 CF par cellules, avec 3 cellules par transfections, 3-4 transfections par condition, et nous avons testé16 conditions, soit environ 37 632 CF analysées dont 34 835 (92,57%) ont été traitées. Certaines CF ont été écartées de l'analyse car elles ne répondaient pas aux critères préalablement établis c'est-à-dire présentant: un point de contact déterminé, une force d'adhésion supérieure à 60 pN (force de liaison entre tag-HA fusionné au RCPG et d'un anticorp anti HA du dendritip) et enfin un retour à la ligne de base à la fin du déploiement (Fig. annexe 1). Notre étude c'est intéressée plus spécifiquement aux courbes de retrait (CR) présentant, après liaison entre l'étiquette HA du RCPG et l'anticorps anti-HA du dendritip, un plateau d'adhésion d'une force d'environ 60 pN et d'une distance variable. La distance entre le point de contact et le point de rupture a été mesuré à l'aide du logiciel JPK Data Processing (SPM 5.1.8), puis une distribution de ces distances de déploiements a été générée avec des classes de 5 nm en fonction de fréquence préalablement normalisée. C'est-à-dire que les fréquences d'apparition de chaque classe ont été divisées par la fréquence de distance de déploiement nul (la classe de 0 nm).

Quantification des récepteurs de surface cellulaire par ELISA.

Vingt-quatre heures après la transfection de cellules CHO WTT avec pcDNA3.1 (+) (témoin) ou HA-β2-AR, les cellules ont été divisées dans des plaques 24 puits (120,000 cellules / puits) coatées avec poly D-Lysine. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules ont été traitées ou non avec Isoproterenol (10 μM) pendant 15 min à 37 ° C et ensuite fixées dans paraformaldehyde (4%) pendant 15 minutes. Toutes les étapes ultérieures ont été réalisées à température ambiante. Après une incubation dans une solution de blocage (PBS / 1% de BSA) pendant 45 minutes, les cellules ont été incubées avec l'anticorps primaire anti-HA (clone 16B12, Covance), puis avec un anticorps secondaire marqué à la HRP (Sigma), après le lavage, l'immunoréactivité a été révélée par l'ajout du HRP substrat 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine (BD Bioscience San Diego, CA) selon les instructions du fabricant et les plaques ont été lues à 450 nm dans Envision lecteur (Envision, Tecan). Pour chaque expérience, les conditions témoins correspondent aux cellules transfectées avec un vecteur vide. Le pourcentage de récepteur de surface cellulaire est défini comme étant 100 x [(DObasal - DOtémoin) - (DOstimulé - DOtémojn)] / (DObasal - DOtémoin) où DOstimulé et DObasal correspondent à la DO obtenue, respectivement avec des cellules traitées et non traitées par l'Isoprotérénol.

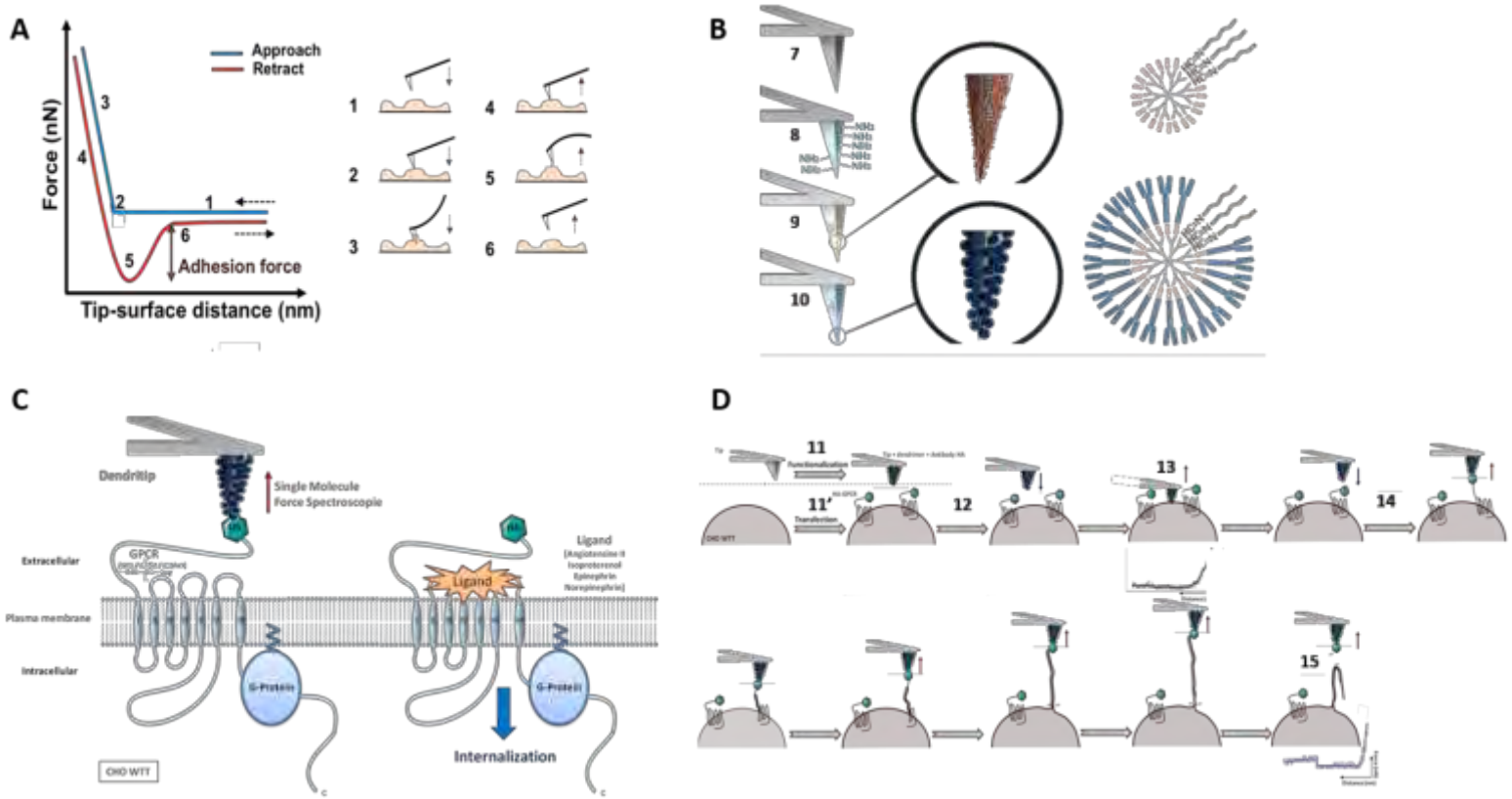
Résultats

Dans cette étude, nous cherchons à étudier l'architecture des RCPGs à la surface de cellules vivantes à l'aide de la SMFS. Les courbes de retrait ont été analysées manuellement une par une et les distances de déploiements ont été mesurées puis classées en distribution de fréquence. La taille de classe choisie est de 5 nm. La distance de rupture ou de déploiement est mesurée entre le point de contact et le point de rupture et nous renseigne sur la taille des molécules déployées alors que le pourcentage de courbes non adhésives donne un renseignement sur la densité des récepteurs sur la membrane. Ces analyses ont été réalisées pour chacune des conditions décrites sur des cellules issues de 3 transfections distinctes. Pour chaque transfection, 3 cellules ont été cartographiées par 256 courbes (matrice 16 x 16 µm).

Tout d'abord, nous décrirons les expériences de validation de la stratégie. C'est en effet, la première fois à notre connaissance, que la SMFS est utilisée pour sonder l'organisation de RCPGs à la surface de cellules de mammifères vivantes. Ensuite, nous analyserons l'effet de la quantité de plasmides codant pour les RCPGs transfectée (effet de la densité en récepteurs) sur l'organisation de ces récepteurs. Enfin, nous étudierons l'impact de la stimulation par un agoniste sur l'architecture des récepteurs.

Validation des déploiements

Afin de déterminer si les RCPGs possèdent une organisation particulière sur la surface membranaire pouvant être détectée par SMSF (Fig. 1C), nous avons analysé les distances entre le point de contact et les points de rupture des motifs adhésifs (Fig. 1D) présents sur la courbe de retrait obtenue par spectroscopie de force (Fig. 1A) en mode Force Volume (Cf. Mat & Met) à l'aide d'une dendritip anti-HA.



<u>Figure 1</u> : ***Adaptation de la spectroscopie de force à l'échelle de la molécule unique pour sonder les RCPGs à la surface de cellules vivantes. A) Schéma d'une Courbe de Force (CF)*** *: La ligne bleue représente la courbe d'approche et la courbe rouge celle de retrait. A droite la position de la pointe par rapport à l'échantillon est représentée* ***1)*** *La pointe s'approche à vitesse constante de l'échantillon* ***2)*** *Point de contact entre la pointe et l'échantillon* ***3)*** *La pente représente l'indentation de la pointe dans l'échantillon.* ***4)*** *Retrait de la pointe de l'échantillon* ***5)*** *Adhésion entre la pointe et l'échantillon. Il faut appliquer une force plus importante pour séparer la pointe et l'échantillon, c'est la force de rupture.* ***6)*** *La pointe s'éloigne de l'échantillon à vitesse constante.* ***B) Fonctionnalisation de la pointe AFM par un anticorps selon le procédé breveté***[54,55] ***Dendritip*** *:* ***7)*** *Pointe AFM en nitrure de silicium* ***8)*** *Ajout d'une fonction amine par incubation dans l'éthanolamine* ***9)*** *Fonctionnalisation de la pointe* NH_2 *avec un dendrimère phosphoré-aldhéhyde de quatrième génération présentant 96 fonctions aldéhydes libres* ***10)*** *Liaison covalente (base de Shiff) des anticorps anti HA à la dendritip.* ***C) Récapitulatif des récepteurs et conditions expérimentales testés. Récepteurs :*** *AT1 / AT1-Gq, AR β2, mGlu3 marqués d'un tag HA, différentes conditions expérimentales : 0.01µg / 0.1 µg / 1µg d'ADN transfecté ; après stimulation par des ligands Angiotensine II / Isoproterenol / Epinephrine / Norepinephine (10µM, 20min) ; préalablement traité ou non au Sucrose (200µM,1h).****D)*** ***Spectroscopie de force à l'échelle du RCPG unique 11)*** *Transfection de CHO WTT avec le RCPG tagué HA en N-term ;* ***11')*** *en parallèle fonctionnalisation de la pointe avec un dendrimère de quatrième génération aldéhyde sur lequel est fixé un anticorps anti HA ;* ***12)*** *Acquisition des courbes de force ;* ***13)*** *Interaction de la dendritip anti HA avec la membrane, obtention d'une courbe de force sans motif adhésif.* ***14)*** *Liaison de la dendritip anti HA avec HA-RCPG ;* ***15)*** *Obtention d'un courbe de force typique d'une interaction.*

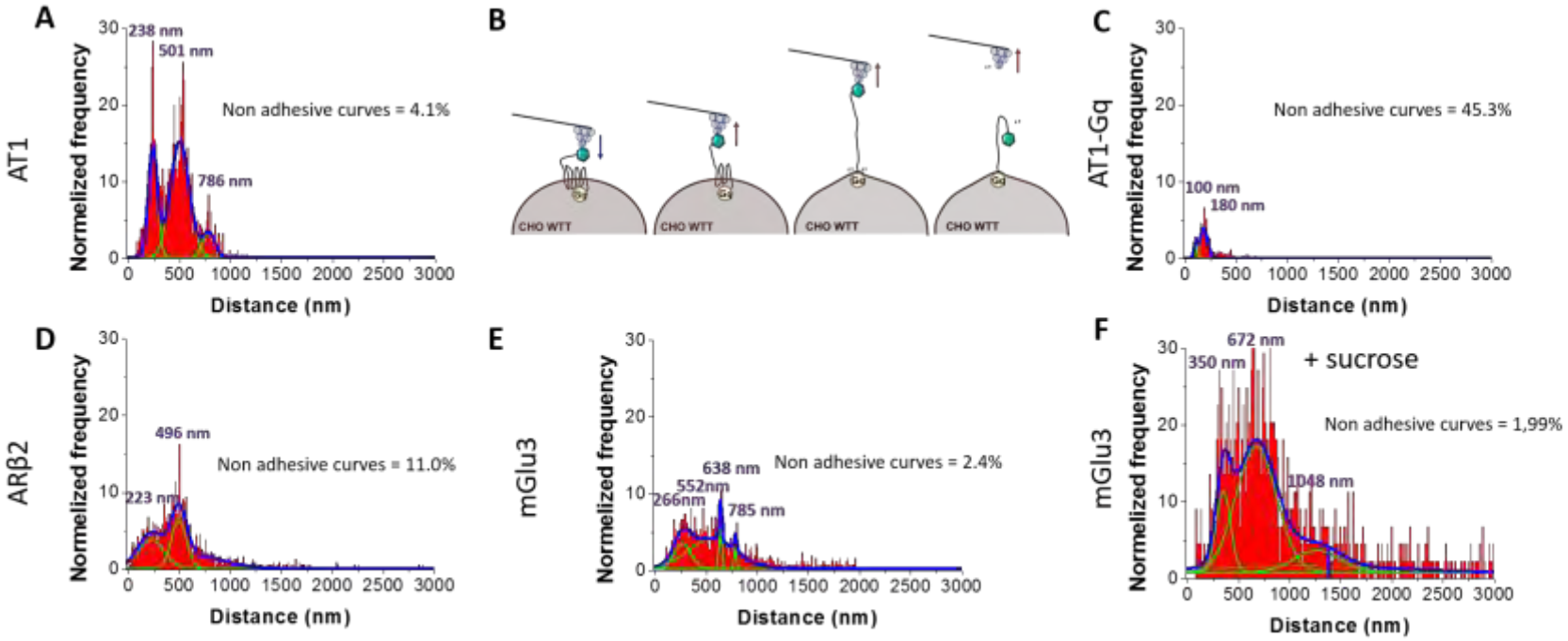
Pour le récepteur HA-AT1 transfecté avec une quantité de 1 µg de plasmide codant, qui sera considéré par la suite comme la condition basale de ce récepteur, nous avons représenté la distribution des distances de rupture en fonction de la fréquence d'apparition sur les 95,9 % (soit 2228 CF) de courbes présentant un motif adhésif. Nous avons choisi de répartir ces distances en classes de 5 nm (Fig. 2A). La figure 2A montre des distances de rupture allant de 5 nm à environ 1000 nm. Cette répartition a pu être analysée par un fit global correspondant à la somme d'une ou plusieurs gaussiennes. Ici, la répartition peut être déconvoluée en 3 gaussiennes respectivement centrées sur 238 nm, 501 nm et 786 nm, et présentant respectivement un maximum de fréquence normalisée de 14,0, 15,5 et 4,2. Ces distances présentent un pas d'environ 250 nm (+/- 25), nous pouvons faire l'hypothèse que cette distance représenterait la longueur entre oligomères de degrés supérieurs exprimé à la membrane. En effet, une étude de 2015 montre que l'interaction entre deux récepteurs se ferait par plusieurs résidus au niveau des domaines transmembranaires, c'est-à-dire par un entrelacement des deux récepteurs[56]. Ainsi, lorsqu'il y a déploiement d'un dimère, la distance va être inférieure au double de la longueur d'un monomère. En effet, lorsque le premier récepteur se déplie le second commence à être déplié avant la fin du premier. Mais, les résultats seuls de HA-AT1 (1 µg) ne peut nous permettre de dire si la distances 250 nm est la distance de déploiement d'un monomère ou d'un oligomère.

Donc tout d'abord, il a fallu vérifier que les déploiements correspondent spécifiquement à des RCPGs monomériques et/ou oligomères de RCPG. Pour cela, nous avons utilisé un récepteur HA-AT1 fusionné en C-terminal à une protéine Gq (HA-AT1-Gq). L'utilisation de cette protéine chimérique permet de déployer un premier récepteur mais d'empêcher tout déploiement d'autre récepteur associé. En effet, la protéine Gq est une protéine cytoplasmique au caractère hydrophile incapable de traverser la bicouche lipidique de la membrane qui est hydrophobe. En conséquence, lors du déploiement d'HA-AT1-Gq, l'interaction devrait être interrompue entre la dendritip anti-HA et l'étiquette HA du récepteur lorsque le déploiement arrivera au niveau de la protéine Gq qui restera bloquée dans la partie intracellulaire de la membrane plasmique (Fig. 2B). Ainsi, en théorie, seul le récepteur sous forme monomérique pourra être déplié. Les résultats obtenus montrent une différence à la fois dans (Fig. 2C) :

- le pourcentage de courbes non adhésives, qui passe de 4,1% (sans protéine Gq, Fig. 2A) à 45,3% (en présence de la protéine Gq). Ce phénomène peut être expliqué par la mauvaise expression à la surface cellulaire de la fusion HA-AT1-Gq comparé au HA-AT1 que nous avons démontré par test ELISA dans l'équipe.
- la distribution des distances de déploiement réalisée donc sur 54,7% de courbes de retrait (soit 2093 CF) présentant un motif adhésif. En effet, la répartition des distances de rupture en présence de la protéine Gq peut être déconvoluée en 2 gaussiennes respectivement centrées sur 100 nm et 180 nm ayant respectivement une fréquence

normalisée maximum de 2.1 et 4.3 (Fig. 2C) alors que sans la protéine Gq (Fig. 2A), la répartition est déconvoluée en 3 gaussiennes centrées sur 238, 501 et 786 nm, et un maximum de fréquence normalisée 14,0 ; 15,5 ; 4,2.

Ces résultats indiquent ainsi que les déploiements réalisés à l'aide de la pointe AFM anti-HA sont spécifiques des RCPGs et que ces nouvelles populations de distances identifiées avec la fusion HA-AT1-Gq pourraient correspondre à la distance de déploiement du tag HA seulement pour la distance la plus courte associée à des déploiements interrompue entre le DendriTip et le HA-RCPG (100 nm) et le déploiement d'un HA-AT1 monomérique pour la distance de 180 nm. Sachant que le récepteur AT1 compte 359 acides aminés[57], la distance théorique de cette protéine est donc de (359 x 0,4) [51]143.6 nm. Cependant, la seconde population est à 180 nm. Cette différence entre la distance théorique et la distance trouvée expérimentalement peut être expliquée car le récepteur a été déplié sur cellule vivante, il est alors possible que le déploiement de HA-AT1-Gq entraine avec lui de petits segments de membrane plasmique qui allongerait la distance théorique. On ne peut pas non plus exclure le déploiement d'autres protéines transmembranaires "non RCPG" de type chaperonnes par exemple qui sont connues pour pouvoir interagir directement avec cette famille de récepteurs.



<u>Figure 2</u> ***Validation du déploiement des RCPG à la surface des cellules CHO vivantes en spectroscopie de force.***

A) Histogramme de répartition des distances *de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules transfectées* ***HA-AT1(****quantité d'ADN transfectée 1 µg). Les fréquences ont été normalisées par rapport au nombre d'évènements non adhésifs et les distances de rupture, réparties en classe de 5 nm. La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvoluée en 3 gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 238, 501 et 786 nm. Il reste 4,1 % de courbes non adhésives.*

B) Schéma explicatif de la spectroscopie de force en présence d'un récepteur HA-AT1-Gq*. La fusion Gq, en C terminal, intracellulaire, blocage stérique et théoriquement la sortie de la membrane de plus d'un récepteur.*

C) Histogramme de répartition des distances *de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules transfectées* ***HA-AT1-Gq*** *(quantité d'ADN transfectée 1 µg). La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvoluée en 2 gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 100 et 180 nm. Il reste 45,3% de courbes non adhésives.*

D) Histogramme de répartition des distances *de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules* ***transfectées HA- ARβ2*** *(quantité d'ADN transfectée 1 µg). La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvoluée en 2 Gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 223 et 496 nm. Il reste 11,0 % de courbes non adhésives.*

E) Histogramme de répartition des distances *de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules* ***transfectées HA- mGlu3*** *(quantité d'ADN transfectée 1 µg). La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvoluée en 4 Gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 266, 552, 638 et 785 nm. Il reste 2,4 % de courbes non adhésives.*

F) Histogramme de répartition des distances *de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules transfectées* ***HA-mGlu3*** *(quantité d'ADN transfectée 1 µg) préalablement* ***traitées au sucrose*** *afin de bloquer l'internalisation constitutive de ce récepteur. La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvoluée en 3 gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 350, 672 et 1048 nm. Il reste 2,0 % de courbes non adhésives.*

Une fois cette validation faite, nous nous sommes demandés si cette distribution particulière des distances, ainsi que la présence d'un pas régulier entre les centres des gaussiennes étaient reproductibles avec un autre RCPG de la même famille (A) que AT1. Nous nous sommes ainsi intéressés à la distribution des distances de rupture du récepteur HA-β2-AR dans les mêmes conditions que précédemment réalisé pour le récepteur AT1 (1µg d'ADN transfecté). Le fit global de cette distribution réalisée sur 89,0 % des courbes de retrait (soit 2787 CF) correspond comme précédemment à différentes Gaussiennes centrées respectivement sur 223 nm et 496 nm avec une fréquence maximale normalisée de 4,1 et 8,5. (Fig. 2D). De ces résultats, deux remarques peuvent être faites. La présence de centres de gaussiennes à des distances semblables (~250 nm et 500 nm) à celles d'HA-AT1 démontre un comportement similaire entre des RCPGs de la même famille. Il est vrai que l'on n'observe pas de gaussiennes centrées sur 750 nm comme visible chez AT1, seulement une tendance qui ne ressort pas mathématiquement. La seconde remarque qui peut être faite est le taux plus important de courbes non adhésives, en effet il est de 11,0 % pour le HA-β2-AR alors que pour le HA-AT1 il n'est que de 4,1 %. Cette différence traduit encore une fois un nombre de récepteurs HA-β2-AR exprimés à la surface membranaire moins important que le HA-AT1. Néanmoins, contrairement à la fusion HA-AT1-Gq qui présente un problème de trafic/expression à la surface cellulaire, la moindre expression du récepteur β2-AR pourrait illustrer une activité constitutive (activation en absence de ligand agoniste) de ce récepteur qui a été déjà été bien décrite dans la litterature[58,59]. En effet, lors de son activation chronique, et ce comme mécanisme adaptatif à une sur-stimulation interrompant son activité, le récepteur β2-AR subit classiquement un phénomène d'internalisation intracellulaire[60–63] via des vésicules se détachant de la membrane plasmique et conduisant à la disparition du récepteur de la surface cellulaire. Ainsi, l'augmentation du pourcentage de courbes de retrait ne présentant aucun motif adhésif illustrant la diminution du nombre de récepteur β2-AR sur la membrane peut être expliqué par ce mécanisme d'internalisation du récepteur. Il est intéressant de noter que, contrairement au HA-AT1, le profil de déploiement du β2-AR ne présente pas de Gaussienne centrée sur la longueur autour de 750 nm. Ce résultat pourrait illustrer que l'activité constitutive du β2-AR et donc son internalisation concerne spécifiquement la population oligomérique du récepteur.

AT1 et β2-AR étant de la même famille de RCPG classe A, ils présentent donc des homologies de structure et vraisemblablement également des homologies d'architecture de surface en accord avec la répartition des distances de rupture qui est, comme attendue, très similaire entre les 2 récepteurs (Table1). Pour s'assurer que les différents pics de Gaussiennes correspondent bien à des dépliements uniques de différentes populations oligomériques de RCPGs, nous avons alors étudié la distribution des distances de rupture d'un récepteur de la famille C, le récepteur au glutamate de type mGlu3. La séquence protéique de ce récepteur est en

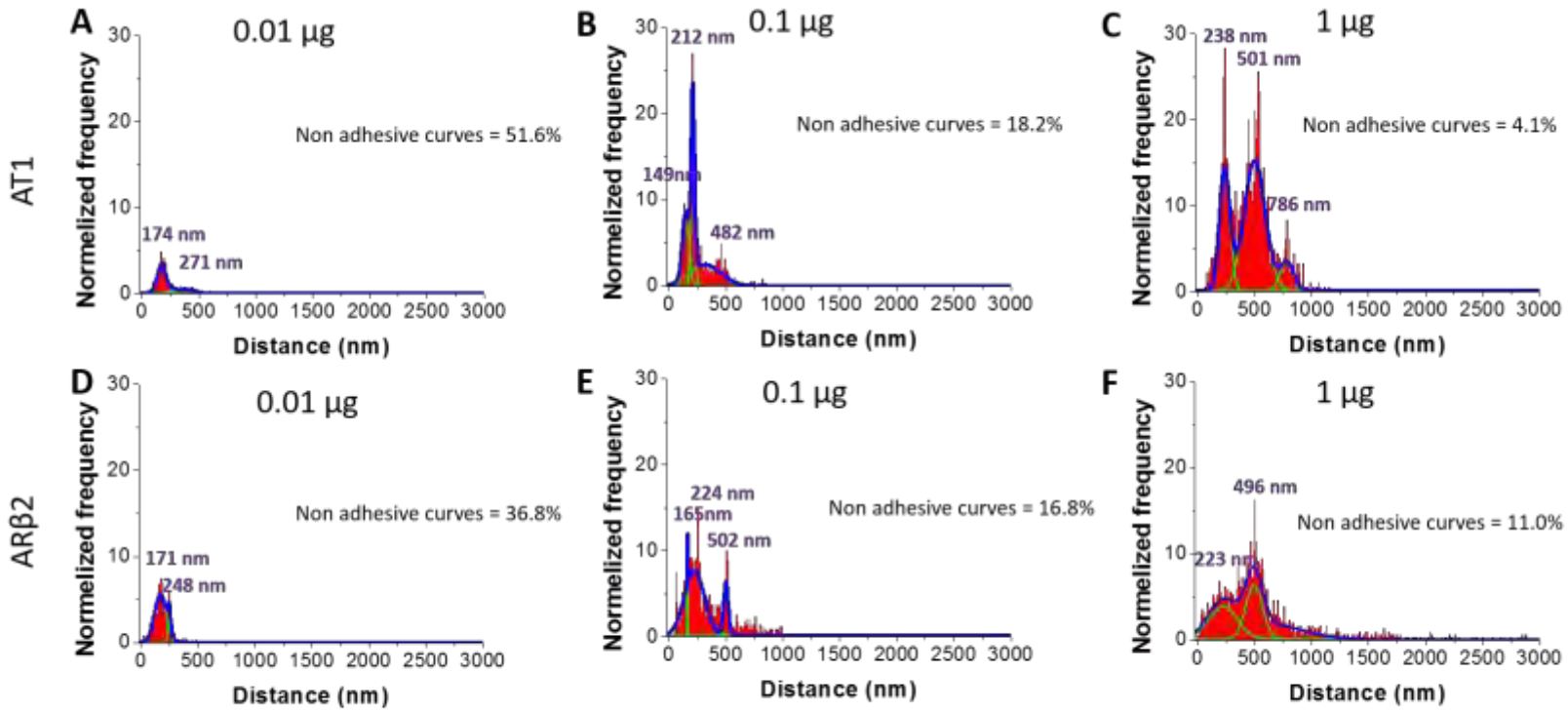
effet plus longue (879 acides aminés) que celles des récepteurs AT1 (359 acides aminés), ou β2-AR (413 acides aminés). La distribution des distances de rupture pour le HA-mGlu3, réalisée sur 97,6 % de courbes de retrait (soit 2107 CF) (Fig. 2E) montre grossièrement un profil similaire, c'est-à-dire que le fit global peut être déconvolué en 4 Gaussiennes centrées respectivement sur 255, 552 638 et 785 nm à une fréquence normalisée de 5,5 ; 4,9 ; 9,8 et 5,1. Nous pouvons constater que la distribution de distances de déploiement du HA-mGlu3 présente une discordance avec nos attentes. En effet, il aurait été logique de retrouver des populations de distance de déploiement avec une périodicité d'un pas supérieur à celui retrouvé chez les RCPG-de classe A que nous avons étudiés au vu de la taille de mGlu3. Cependant, il est connu dans la littérature que les récepteurs métabotropiques présentent, comme le β2-AR, une activité constitutive très forte[64,65]. Aussi, pour comparer les distances de déploiements des 2 familles de RCPGs à l'état basal inactif du système, nous avons bloqué le mécanisme d'internalisation du récepteur mGlu3 grâce à un traitement des cellules transfectées par du sucrose (200 µM, 1h)[66]. Pour le récepteur HA-mGlu3 transfecté avec une quantité de 1µg de plasmide codant puis traité au sucrose, nous avons réalisé une distribution des distances de rupture en fonction de la fréquence d'apparition sur les 98,01% (soit 1518 CF) de courbes présentant un motif adhésif (Fig. 2F). Cette distribution montre des distances de rupture allant de 5 nm à environ 3000 nm. Cette répartition a pu être analysée par un fit global correspondant à la somme de 3 gaussiennes respectivement centrées sur 350 nm, 672 nm et 1048 nm avec respectivement un maximum de fréquence normalisée de 10,6 ; 17,2 et 10,1. Ces distances présentent une périodicité d'un pas d'environ 350 nm (+/- 30), pouvant correspondre à la taille théorique d'un monomère de récepteur mGlu3. Ainsi, nous pouvons faire l'hypothèse que la distance des pics des gaussiennes représenterait la longueur de dépliement d'oligomères de HA-mGlu3 d'ordres supérieurs, avec des monomères à une distance de 350 nm, les dimères à 672 nm et la population tétramérique à 1048nm. De plus, la présence d'une périodicité d'un pas plus important pour le HA-mGLu3 confirme le fait que les différentes tailles de déploiements observées pour les différents RCPGs correspondraient à des populations de ces récepteurs plus ou moins oligomérisées.

Effet de la quantité de RCPGs exprimée sur les tailles de déploiements.

Il a déjà été montré que la quantité de RCPG à la surface des cellules de mammifères influe sur leur organisation[67]. Nous avons donc voulu étudier par SMFS l'effet de la quantité de plasmides codant pour les RCPGs transfectée sur les mesures de distances de rupture. Pour cela, des doses croissantes de vecteurs codant pour AT1 ou β2-AR ont été transfectées dans les cellules CHO WTT. La figure 3 présente les histogrammes de distribution des distances de rupture pour les récepteurs AT1 et -β2-AR pour des quantités croissantes de plasmides transfectées de 0,01 µg, 0,1 µg et 1 µg.

Le récepteur HA-AT1 transfecté avec une quantité de plasmide codant de 0.01 µg présente une distribution, réalisée sur 48.4% des courbes de retrait (soit 2117 CF), avec un maximum d'évènements à une distance de 174 nm et 271 nm avec une fréquence normalisée à 4,2 et 1,5 (Fig. 3A). La population des déploiements présentant une longueur de 174 nm rappelle la distance retrouvée dans la distribution de la protéine HA-AT1-Gq (Fig. 2C). Cette distance aux alentours de 180 nm représenterait le déploiement monomérique de HA-AT1. La population d'une longueur de 271 nm, quant à elle, représenterait la distance de déploiement de HA-AT1 avec un degrés oligomérique supérieur, il s'agit certainement de la forme dimérique de ce récepteur.

Lorsque la quantité de plasmide codant pour le HA-AT1 est augmentée à 0,1 µg (Fig. 3B), les courbes de retrait (soit 2176 CF) présentant des motifs adhésifs passent de 48,4 % à 81,8 %. La distribution extraite de ces courbes présente un fit global pouvant être déconvolué en Gaussiennes centrées respectivement sur 149 nm, 212 nm et 482 nm à une fréquence de 9,3 ; 23,5 et 3,1. Il apparait une troisième gaussiennes centrée sur une distance représentative d'un degré oligomérique supérieur, pouvant être la forme tétramérique de récepteur AT1 pour la population à 501 nm. En comparant ces données avec la condition basale de HA-AT1 transfectée avec une quantité de plasmide de 1µg (Fig. 3C), nous constatons que les courbes de retrait présentant des motifs adhésifs augmentent à 95,9 %. Cette répartition peut être déconvoluée en 3 gaussiennes respectivement centrées sur 238 nm, 501 nm et 786 nm, et ayant respectivement un maximum de fréquence normalisée de 14,0 ; 15,5 et 4.2(Fig. 3C). Cette augmentation du nombre de récepteurs sur la membrane montre une baisse de courbes non adhésives ainsi qu'une augmentation des longueurs représentant le centre des Gaussiens extraites des histogrammes de distributions. En effet, il semble que l'augmentation de la densité de récepteurs sur la membrane induit une augmentation du nombre de récepteurs sous forme oligomérique d'ordre supérieur.



<u>Figure 3</u> ***Effet de la quantité d'ADN transfectée sur les distributions de distance de rupture***

A) *Histogramme de répartition des distances de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules transfectées* ***HA-AT1****(quantité d'ADN transfectée* ***0,01 µg****). La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvolué en 2 gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 174 et 271 nm. Il reste 51,6 % de courbes non adhésives.* ***B)*** *Histogramme de répartition des distances de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules transfectées* ***HA-AT1*** *(quantité d'ADN transfectée* ***0,1 µg****). La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvolué en 3 Gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 149, 212 et 482 nm. Il reste 18,2 % de courbes non adhésives.* ***C)*** *Histogramme de répartition des distances de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules transfectées* ***HA- AT1*** *(quantité d'ADN transfectée* ***1 µg****). Les distances ont été normalisées par rapport au nombre d'évènements non adhésifs et réparties en classe de 5 nm. La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvoluée en 3 Gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 238, 501 et 786 nm. Il reste 4.1 % de courbes non adhésives.* ***D)*** *Histogramme de répartition des distances de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules transfectées* ***HA- ARβ2*** *(quantité d'ADN transfectée* ***0,01 µg****). La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvoluée en 2 Gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 171 et 248 nm. Il reste 36,8 % de courbes non adhésives.* ***E)*** *Histogramme de répartition des distances de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules transfectées* ***HA- ARβ2*** *(quantité d'ADN transfectée* ***0,1 µg****). Les distances ont été normalisées par rapport au nombre d'évènements non adhésifs et répartis en classe de 5 nm. La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvoluée en 3 Gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 165, 224 et 502 nm. Il reste 16,8 % de courbes non adhésives.* ***F) Histogramme de répartition des distances*** *de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules transfectées* ***HA- ARβ2*** *(quantité d'ADN transfectée* ***1 µg****).. La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvoluée en 2 Gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 223 et 496 nm. Il reste 11,0 % de courbes non adhésives.*

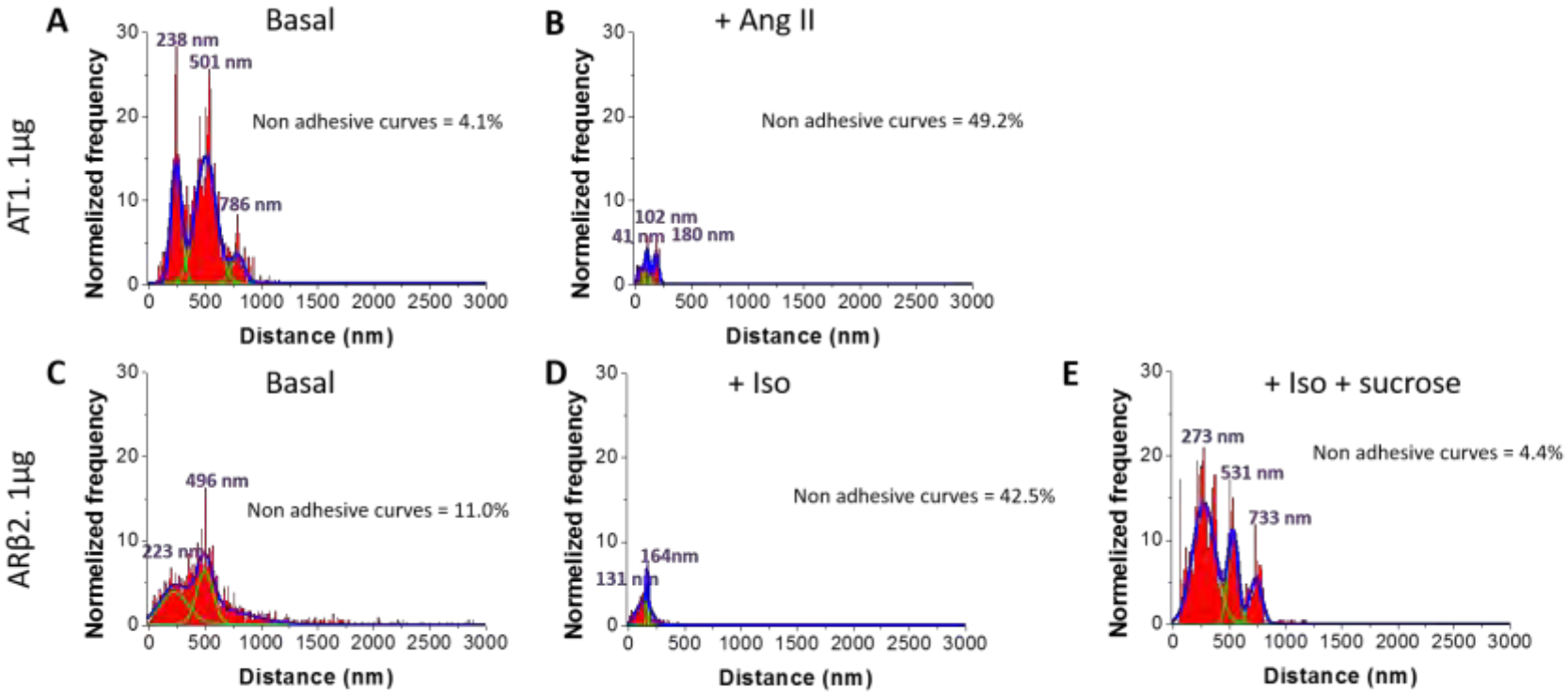
Nous avons ensuite cherché à observer si ce phénomène était reproductible avec un autre RCPG de classe A, le β2-AR. Pour la condition de transfection avec une quantité de plasmide codant pour HA-β2-AR à 0,01 µg, la distribution réalisée sur 63,2 % des courbes de retrait (soit 2117 CF) montre une population à 171 nm et une à 248 nm avec une fréquence normalisée respectivement de 5,3 et 4,1 (Fig. 3D). Comme le récepteur HA-AT1, lorsque l'on augmente la quantité de plasmide transfectée codant pour HA-ARβ2 à 0,1 µg, nous observons une distribution réalisée sur 83.2 % des courbes de retrait (soit 2080 CF) décalée vers de plus longues distances de déploiements avec l'apparition d'une population à 500 nm (Fig. 3E). En effet pour 0,1 µg, nous obtenons 3 Gaussiennes centrées sur 165 nm, 224 nm et 502 nm avec une fréquence normalisée de 11.9, 8.2 et 6.0 (Fig. 3E). Les résultats obtenus pour HA-β2-AR 1 µg montre une distribution de déploiements, réalisée sur 89 % de courbes de retrait, dont la courbe globale peut être déconvoluée en 2 Gaussiennes centrées sur 223 nm et 496 nm avec respectivement une fréquence de 4 et 8.5 (Fig. 3F). Tout comme HA-AT1, lorsque l'on augmente la quantité de transfection de HA-β2-AR, nous observons une augmentation des courbes présentant un motif adhésif, ainsi que l'apparition de populations de déploiements plus longs. En effet, à faible densité, nous pouvons constater la présence de récepteurs sous forme monomérique avec les populations présentant une distance d'environ 180 nm (± 20), mais aussi dimérique avec les distances de déploiements aux alentours de 250 nm (± 20). Plus la densité de récepteurs à la surface de la membrane plasmique augmente, plus on observe l'apparition de population de degrés oligomériques supérieurs. Ces observations pour le β2-AR ont confirmé des études réalisées dans ce domaine par une technologie de SNAP-tag couplé au TIRFm[67]. Dans ces travaux, l'équipe du Dr Lohse a suivi la dynamique des RCPGs à la surface de la membrane plasmique grâce au couplage de ces deux technologies. Ces observations ont montré la présence de dimères ainsi que d'oligomères de plus hauts degrés avec l'augmentation du nombre de récepteur exprimés sur la membrane. A faible densité, les résultats montrent une proportion de 40 % de monomères et 60 % de dimères et à une densité plus importante, les proportions sont de 50 % de dimères, 30% de trimères, 15% de tétramères et une perte des monomères. De plus, ces résultats confirment la reproductibilité et le comportement similaire chez un autre RCPG de la famille A.

Effets de la stimulation des RCPG par un agoniste

L'activation des RCPG à la surface cellulaire après stimulation d'un agoniste est un domaine très largement étudié et bien défini. Il est connu que la liaison du ligand agoniste sur un récepteur inactif induit un changement de conformation de ce dernier. Il passe alors en conformation active lui permettant de s'associer aux protéines G héterotrimeriques intracellulaires, l'effecteur commun à tous les RCPGs, qui entraine une cascade de réactions permettant la transduction du signal intracellulaire [8,32,68]. L'activation chronique du récepteur entraîne aussi une régulation de

son activité. Cette régulation via le découplage du récepteur aux protéines G, appelée désensibilisation, permet un contrôle de la durée d'activation. Dans un second temps ou bien de façon indépendante, le récepteur peut internaliser c'est à dire que le complexe RCPG/Agoniste est endocyté ce qui marquera l'arrêt de la transduction du signal pour ce récepteur à la surface cellulaire. Après avoir été internalisé, un RCPG peut être recyclé à la membrane ou être dégradé[32] mais ces dernières années il a aussi été montré que le récepteur pouvait également signaliser au niveau de la vésicule d'endocytose. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'effet sur nos distributions de courbes de déploiements à la surface cellulaire après internalisation de nos RCPGs d'intérêts.

Dans un premier temps, nous avons comparé la distribution des distances de rupture mesurée sur des cellules transfectées avec1 µg de plasmide codant pour le récepteur HA-AT1 avant et après stimulation pendant 20 min avec son ligand naturel, l'Angiotensine II (10 µM). Nous avons pu traiter 50,8 % de courbes (soit 2046 CF) présentant des motifs adhésifs et donc constituer une distribution de ces distances de rupture. L'angiotensine II (Fig. 4B) induit une modification des distributions de distances de rupture caractérisée par une perte des populations prédominantes à 238 nm et 501 nm à l'état basal (Fig.4A), mais aussi par l'apparition de nouvelles Gaussiennes, après déconvolution du fit global, centrées sur 41 nm, 102 nm et 180 nm avec des maximums des fréquences normalisées respectives de 1,5 ; 4,7 et 4,5. (Fig.4B). Le même protocole de stimulation a été réalisé sur des cellules exprimant 1µg de HA-β2-AR à mais en utilisant un agoniste synthétique et spécifique de ce récepteur, l'Isoporotérenol. Nous pouvons observer des résultats similaires que pour le récepteur HA-AT1 stimulé, à savoir une perte des populations de grande distance de l'état basal (ici 223 nm et 496 nm) (Fig.4C) et apparition de populations de plus faible distance de déploiement maximum de 131 nm et 164 nm et une fréquence respectivement de 3,0 et 7,5 sur la distribution réalisée sur 57,5 % de courbes de retrait (soit 2811 CF). (Fig.4D). Ces nouvelles courbes de déploiements pouvaient cependant déjà exister à l'état basal mais étaient tout simplement "noyées" dans le signal autour de 200 nm (Fig. 4C). Cette distribution semble montrer qu'après activation des récepteurs par l'agoniste, seuls les récepteurs sous une forme monomérique (représenté par la population à 164 nm) restent à la surface cellulaire alors que les oligomères d'ordre supérieurs sont internalisés. On ne peut pas non plus exclure que les récepteurs internalisés recyclent au bout de 20 min à la surface sous forme monomérique La population à 131 nm peut une moyenne de distances entre des déploiements du tag HA ou des déploiements interrompus de récepteurs.



<u>Figure 4</u> : ***Effets sur la distribution des distances de rupture après stimulation d'un agoniste.***
A) *Histogramme de répartition des distances de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules transfectées* ***HA-AT1 (quantité d'ADN transfectée 1 µg)****. Les distances ont été normalisées par rapport au nombre d'évènements non adhésifs et réparties en classe de 5 nm. La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvoluée en 3 Gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 238, 501 et 786 nm. Il reste 4,1 % de courbes non adhésives.* ***B)*** *Histogramme de répartition des distances de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules transfectées* ***HA-AT1 (quantité d'ADN transfectée 1 µg) stimulées par Angiotensine II (10µM, 20min****). Les distances ont été normalisées par rapport au nombre d'évènements non adhésifs et réparties en classe de 5 nm. La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvoluée en 3 Gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 41, 102 et 180 nm. Il reste 49 % de courbes non adhésives.* ***C)*** *Histogramme de répartition des distances de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules transfectées* ***HA- ARβ2*** *(quantité d'ADN transfectée* ***1 µg****). Les distances ont été normalisées par rapport au nombre d'évènements non adhésifs et réparties en classe de 5 nm. La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvoluée en 2 Gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 223 et 496 nm. Il reste 11,0 % de courbes non adhésives.* ***D)*** *Histogramme de répartition des distances de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules transfectées* ***HA- ARβ2*** *(quantité d'ADN transfectée* ***1 µg****) stimulées par de l'****Isoproterenol*** *(10µM, 20min). Les distances ont été normalisées par rapport au nombre d'évènements non adhésifs et réparties en classe de 5 nm. La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvoluée en 2 Gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 131 et 164 nm. Il reste 42, 5 % de courbes non adhésives.* ***E)*** *Histogramme de répartition des distances de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules transfectées* ***HA- ARβ2*** *(quantité d'ADN transfectée* ***1 µg****) préalablement traité au sucrose (200µM, 1h) puis stimulées par de l'****Isoproterenol*** *(10µM, 20min). La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvoluée en 3 Gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 273, 531 et 733 nm. Il reste 4,4 % de courbes non adhésives.*

Afin de vérifier le phénomène d'internalisation des RCPGs, nous avons traité préalablement nos cellules transfectées avec du sucrose (200 µM, 1h) afin de bloquer l'internalisation[66]. L'observation de la distribution des courbes de déploiements dans les cellules préalablement traitées au sucrose puis stimulées à l'Isoprotérénol montre un profil proche de la condition basale avec seulement 4.4 % de courbes non adhésives parmi les courbes de retrait (soit 2201 CF), et l'émergence de 3 populations prédominantes à 273 nm, 531 nm et 733 nm à une fréquence de 14,5 ; 11,1 et 6,2 (Fig. 4E). Cette condition nous permet de valider que l'augmentation des courbes non adhésives après stimulation par un agoniste reposerait sur le mécanisme d'internalisation des RCPGs. De plus, une condition témoin a été effectuée afin de vérifier que le sucrose n'a pas d'impact sur la distribution des distances de déploiements. Pour la condition basale de HA-β2-AR après un traitement au sucrose (200 µM, 1h), la distribution réalisée sur 96,6 % de courbes présentant un motif adhésif parmi les CF (soit 2249) montre la présence des mêmes populations de distances de rupture. Une population dimérique avec une distance de 254 nm d'une fréquence normalisée de 7,3 et une population tétramérique de distance de 536 nm avec une fréquence de 9,1 (Annexe Fig. 2D). Nous pouvons tout de même constater la baisse du nombre de courbes non adhésives qui peut être expliqué par le blocage de l'internalisation au sucrose liée à l'activité constitutive de β2-AR[59]. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences en ELISA en parallèle, pour mesurer la quantité de récepteur HA-β2-AR à la surface cellulaire, (Fig. Annexe 4). Les résultats montrent une diminution significative ($P< 0.05$) du nombre de récepteurs HA-β2-AR après 20 min de stimulation à l'Iso (10 µM) à la surface des cellules par rapport à la densité de récepteurs sur la surface des cellules transfectées non stimulées.

Comparaison d'effets d'une stimulation par différents agonistes d'un RCPG

Après avoir constaté une disparité dans la distribution des distances déployées avant et après stimulation par un agoniste, nous nous sommes intéressés aux différences de comportement d'un même récepteur pouvant exister après stimulation par différents agonistes. Pour cela, le récepteur HA-β2-AR (1 µg) a été stimulé (10 µM, 20 min) par l'Isoprotérénol, qui est un agoniste synthétique, ou par deux autres agonistes naturels de ce récepteur, l'Epinephrine et la Norepinephrine. Comme précédemment décrit, la distribution de distances de déploiement après stimulation réalisée sur 57.,5 % des CF avec Isoprotérénol montre une perte des dimères et tétramères (représenté respectivement par les populations de distance de 223 nm et 496 nm) (Fig.5A) et apparition de la population monomérique avec une distance de déploiements d'environ 164 nm pour une fréquence normalisée de 7,5 (Fig.5B). Dans le cas d'une stimulation avec l'Epinephrine (Fig. 5C), le résultat est plus modéré, c'est-à-dire que l'histogramme de répartition des distances de rupture entre la pointe anti-HA et HA- β2-AR réalisée sur 73,9 % des

courbes de retrait (soit 2207 CF) montre un fit gaussien global de la distribution pouvant être déconvolué en 3 gaussiennes centrées respectivement sur 164, 285 et 517 nm. Pour la stimulation par la Norépinephrine, la distribution de ces distances réalisée sur 82,4 % des CF (soit 2133 CF) engendre des gaussiennes centrées respectivement sur 127, 229 et 421 nm de fréquence normalisée de 11,5 ; 9,6 et 2,4 (Fig.5D). Ces observations montrent un nombre de courbes non adhésives moins important après une stimulation par un agoniste endogène qu'avec une stimulation avec l'agoniste synthétique, l'Isoproterenol. En effet, on passe de 26,1 % et 17,6 % pour l'Epinephrine et la Norepinephrine contre 42,5 % pour l'Isoprotérénol, mais reste pour autant plus important qu'en condition basale, qui n'est que de 11,0 % de CF sans motifs adhésifs. Ces résultats illustrent la densité de récepteurs à la surface membranaire, et permettent donc de démontrer que l'internalisation induite par un agoniste endogène est moins importante que celle produite par un agoniste synthétique. De plus, nous pouvons constater après stimulation par des agonistes dits naturels, une conservation des populations dimérique (caractérisées par des distances de déploiement d'environ 250 nm) et tétramérique (avec des distances de 500 nm) sans pour autant perdre la population monomérique (caractérisées par des distances de déploiement d'environ 180 nm). Il est aussi important de remarquer que l'effet de la Norepinephrine est plus modéré que l'effet de l'Epinephrine. En effet, l'Epinephrine semble activer plus de récepteurs β2-AR que la Norepinephrine, ce phénomène étant illustré par le nombre de CF non adhésives plus important. Pour la condition de l'Epinephrine, les CF ne présentant aucun motif adhésif sont de 17,6 % alors que pour la Norepinephrine ces CF augmentent à 26,1 %ce qui est en faveur d'une internalisation plus importante. Nous pouvons observer également une perte plus importante des formes oligomériques tel que la forme dimérique et tétramérique pour la condition de stimulation de l'Epinephrine par rapport à la condition Norépinephrine,. En effet, la fréquence normalisée du centre de la gaussienne représentant la population dimérique est de 4,3 et celle de la population tétramérique est de 1,2, alors que pour la Norepinephrine elles sont respectivement de 9,6 et 2,4. Ces résultats semblent montrer que les forme oligomérisées et plus particulièrement les formes dimériques et tétramériques sont les formes actives de ces RCPGs. En effet la perte de récepteurs est couplée par la diminution de la population dimérique et tétramérique avec une perte plus marquée pour les tétramères.

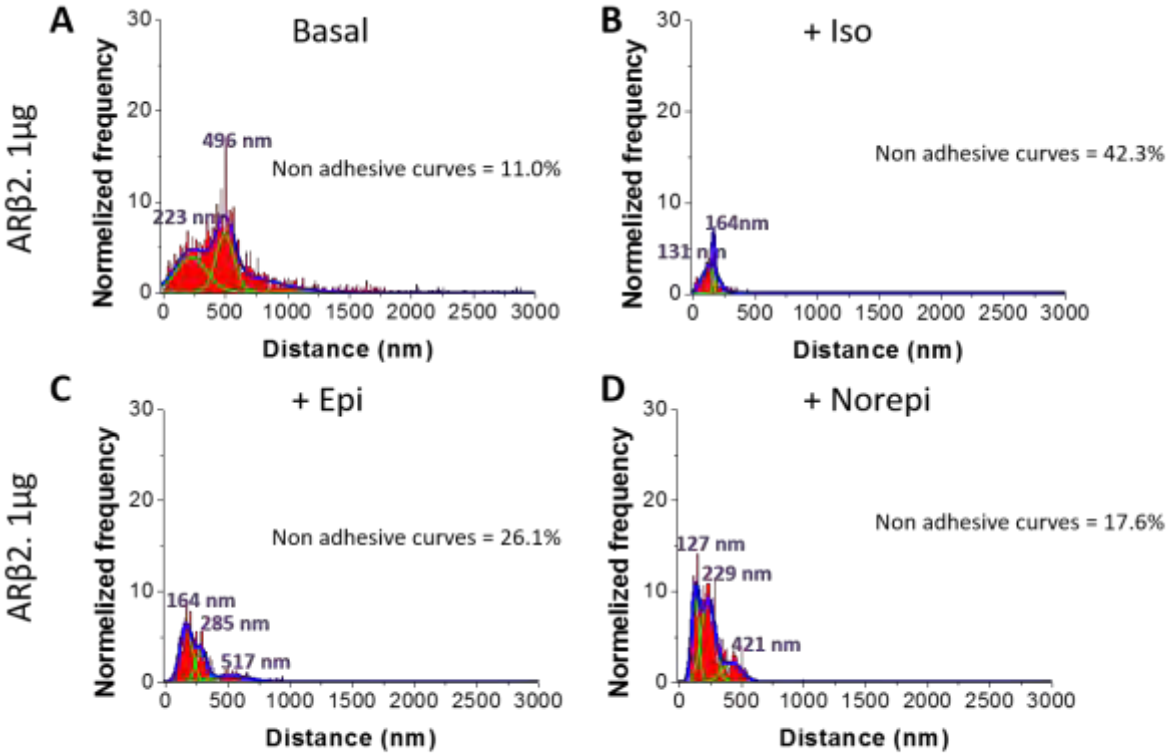


Figure 5 : Comparaison d'effets sur la distribution des distances de déploiements après stimulation d'un agoniste synthétique et d'un agoniste endogène

A) Histogramme de répartition des distances de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules transfectées **HA- ARβ2** (quantité d'ADN transfectée **1 µg**). Les distances ont été normalisées par rapport au nombre d'évènements non adhésifs et réparties en classe de 5 nm. La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvoluée en 2 Gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 223 et 496 nm. Il reste 11.0 % de courbes non adhésives. **B)** Histogramme de répartition des distances de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules transfectées **HA- ARβ2** (quantité d'ADN transfectée **1 µg**) stimulées par de l'**Isoproterenol** (10µM, 20min). Les distances ont été normalisées par rapport au nombre d'évènements non adhésifs et réparties en classe de 5 nm. La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvoluée en 2 Gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 131 et 164 nm. Il reste 42,5 % de courbes non adhésives. **C)** Histogramme de répartition des distances de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules transfectées **HA- ARβ2** (quantité d'ADN transfectée **1 µg**) stimulées par de l'Epinephrine (10µM, 20min). Les distances ont été normalisées par rapport au nombre d'évènements non adhésifs et réparties en classe de 5 nm. La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvoluée en 3 Gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 164, 285 et 517 nm. Il reste 26,1 % de courbes non adhésives. **D)** Histogramme de répartition des distances de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules transfectées **HA- ARβ2** (quantité d'ADN transfectée **1 µg**) stimulées par de la **Norepinephrine** (10µM, 20min). La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvoluée en 3 Gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 127, 229 et 421 nm. Il reste 17,6 % de courbes non adhésives.

Discussion

La question de l'oligomérisation des RCPGs et d'une activité de ces récepteurs différente selon leur état d'oligomérisation est fortement débattue. En effet, en considérant les nombreuses données disponibles de la littérature, les RCPGs ont été décrit tout autant actif sous forme monomérique qu'actif[17,22] sous des formes oligomérique de plus hauts degrés[69,70,18,15,20,20]. Dans cette étude, nous avons tenté d'apporter de nouvelles réponses dans ce domaine encore très controversé à l'aide la spectroscopie de force à l'échelle de la molécule unique couplé à l'aide de pointes AFM fonctionnalisées avec des anticorps anti-HA.

Nos résultats ont montré que les RCPG présentent une architecture particulière à la surface de la cellule de mammifère vivante. En effet, les récepteurs de la famille A (AT1 et β2-AR) tout comme les récepteurs de la famille C (mGlu3) présentent une organisation en oligomères, plus particulièrement en dimères et tétramères en condition définie comme basale (c'est-à-dire transfectée avec une quantité de 1µg de plasmide codant pour les récepteurs et en absence d'agoniste). Cependant ces observations ont été faites sur des doses de transfection à 1 µg de de plasmide codant, lorsque nous observons à des densités plus faibles nous observons la présence prédominante de monomères, ce biais biologique sera développé dans la suite. Ces états d'oligomérisation ont pu être déterminés d'après les populations majeures de distances de rupture entre le dendritip Anti-HA et l'étiquette HA fusionnée en N-terminal du RCPG étudié. La population de distance la plus représentée chez les récepteurs de la famille A est de 500 nm (+/- 50), cette longueur représenterait celle d'un tétramère d'après le calcul théorique d'un monomère de ces récepteurs. Cette donnée pourrait confirmer l'idée que la forme tétramérique des RCPG de classe A soit la plus stable et donc la forme prédominante[71]. En effet, cette étude de FRET, réalisée avec le β2-AR purifié et reconstitué en bicouche lipidique, montre que la forme tetramérique de ce récepteur serait la forme oligomérique la plus stable au vu de sa prédominance dans les conditions d'analyse. Cependant, cette organisation serait un équilibre entre les différents degrés d'oligomérisation (monomère/dimère/tétramère/hexamère/…). Une question fondamentale sur le sujet d'oligomérisation des RCPGs reste la dynamique de ce phénomène. Dans ce contexte, une étude utilisant des RCPGs étiquetés à l'aide de SNAP-Tag et couplé à la microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRFm) a permis le suivi de récepteurs dans le temps à l'état basal est a pu déterminer le temps de d'association entre les deux particules lors d'une interaction dimérique de RCPG qui est d'environ 5 s (+/- 0.20) dans des cellules CHO[67]. Ce temps montre bien le caractère transitoire d'une forme oligomérique. La forme tétramérique est donc probablement la plus stable et la plus représentée mais à un temps donné.

Cependant, lors d'une stimulation par agoniste des RCPG de classe A, cette architecture à la surface membranaire est modifiée, puisque nous avons pu constater suite au mécanisme d'internalisation,

une diminution du nombre de récepteurs exprimés à la membrane plasmique, illustré par l'augmentation de courbes ne présentant aucun motif adhésif. Associé à cette diminution des récepteurs de surface, nous avons pu observer en particulier une perte des populations oligomérisées, c'est-à-dire les populations de dimères, tétramères et hexamères avec des distances de déploiements respectivement de 250, 500 et 750 nm, qui étaient majoritaires avant la stimulation. De plus, les récepteurs restant exprimés à la membrane plasmique sont sous forme monomériques, identifiés par des déploiements de 180 nm (± 25). D'après ces observations, nous pouvons imaginer que lorsque l'agoniste va se lier à son récepteur, préférentiellement à des oligomères du récepteur, le complexe va être internalisé, puis si le RCPG est, par la suite, recyclé afin de retourner sur la membrane, il sera sous forme monomérique mécanisme permettant une sorte de désensibilisation de la cellule. La désensibilisation est un mécanisme chez les RCPGs permettant un contrôle de la durée d'activation de manière à éviter les effets néfastes d'une stimulation prolongée du récepteur pour la cellule. Pour être effective cette régulation nécessite un découplage physique entre le récepteur et la protéine G. Mais si la forme monomérique est une forme inactive du récepteur, l'augmentation de la proportion de la population monomérique du récepteurs permettrait un autre contrôle de la durée d'activation de la cellule[72]. Mais la possibilité que cette population monomérique soit toujours exprimée à la surface de la cellule mais ne soit pas mis en évidence par notre approche n'est pas négligeable. Il est possible que cette population soit estompée dans le bruit de nos distributions de distances de déploiements. Ces résultats peuvent confirmer une étude réalisée par une méthode de complémentation bimoléculaire de fluorescence (BiFC) chez les récepteurs à la dopamine appartenant à la famille A. En effet, dans ces travaux, les auteurs fournissent les premières démonstrations de la modulation de l'effet de ligands sur l'oligomérisation des RCPG [73]. Cette étude a visualisé simultanément les récepteurs de l'Adénosine A2 (A_{2A}) et de la dopamine D 2 (D_2) récepteurs associés dans les complexes homo- et hétéromères en cellules vivantes (CAD[74]) et d'examiner les changements oligomèriques des récepteurs induits par des agonistes Une stimulation prolongée par l'agoniste Quinpirole (médicament psychotrope qui agit comme un agoniste des récepteurs D_2 et D_3) provoque l'internalisation de l'homodimère de D_2 / D_2 et l'heterodimère A_{2A} / D_2 oligomères entrainant donc une augmentation relative de la formation d'oligomères. A_{2A} / $A_{2A.}$ L'application d'un autre agoniste, la 5' N -methylcarboxamidoadenosine, provoque l'effet opposé. Ces observations soutiennent l'hypothèse que l'exposition à un agoniste modifie l'oligomérisation de A_{2A} / D_2. Mais nos résultats peuvent aussi être contradictoires avec d'autres études qui démontrent l'absence d'effet de la stimulation d'agoniste sur l'oligomérisation des RCPGs [63]. Dans cette étude en TIRFm, les auteurs n'observent aucun effet sur l'organisation du β2-AR, dans des conditions proches de notre étude, à la surface de la cellule (CHO) après stimulation par 10 µM d'Isoproterenol . Cependant, dans cette étude, le dispositif expérimental nécessaire au TIRF limite peut être l'accès

du ligand au niveau du RCPG. Dans la littérature, une différence dans le mécanisme d'internalisation selon la nature de l'agoniste est bien décrite, et va amener à un taux d'internalisation des récepteurs differents[75]. Nous avons pu observer également une différence de comportement dans l'oligomérisation après une stimulation avec un agoniste synthétique ou endogène. En effet, il semble que les agonistes endogènes ciblent une population d'oligomères plus spécifique. Lors de la stimulation avec l'Isoproterenol, l'agoniste synthétique, il y a une perte de toutes les populations oligomériques, que ce soit les dimères, les tétramères et les hexamères. Au contraire, une stimulation avec l'Epinephrine et Norepinephrine va préférentiellement faire internaliser les récepteurs oligomérisés en tétramères. Il est possible qu'il y ait une régulation des voies de signalisations par l'oligomérisation des récepteurs activés. La structure du récepteur plus ou moins oligomérisé pourrait présenter des différences dans leur conformation spatiale ce qui permettrait au ligand de se fixer plus ou moins sur ce récepteur et d'activer plus ou moins une voie de signalisation spécifique sans déclencher les autres. La différence d'activité possible de chaque population oligomérique (monomère/dimère/tétramère/hexamère) semble d'autant plus visible lorsque ces dernières sont comparées l'une à l'autre selon les différentes conditions. C'est ce que nous avons cherché à représenter dans la figure 6. Sur cet histogramme représentant les distributions des différentes populations, nous pouvons constater que lors d'une stimulation par un agoniste, les tétramères (vert) diminuent le plus fortement suivis des dimères (bleu). La différence d'une stimulation entre différents types d'agonistes (synthétique ou naturel) se fait, semble-t-il, au niveau de l'internalisation de population oligomériques spécifiques.

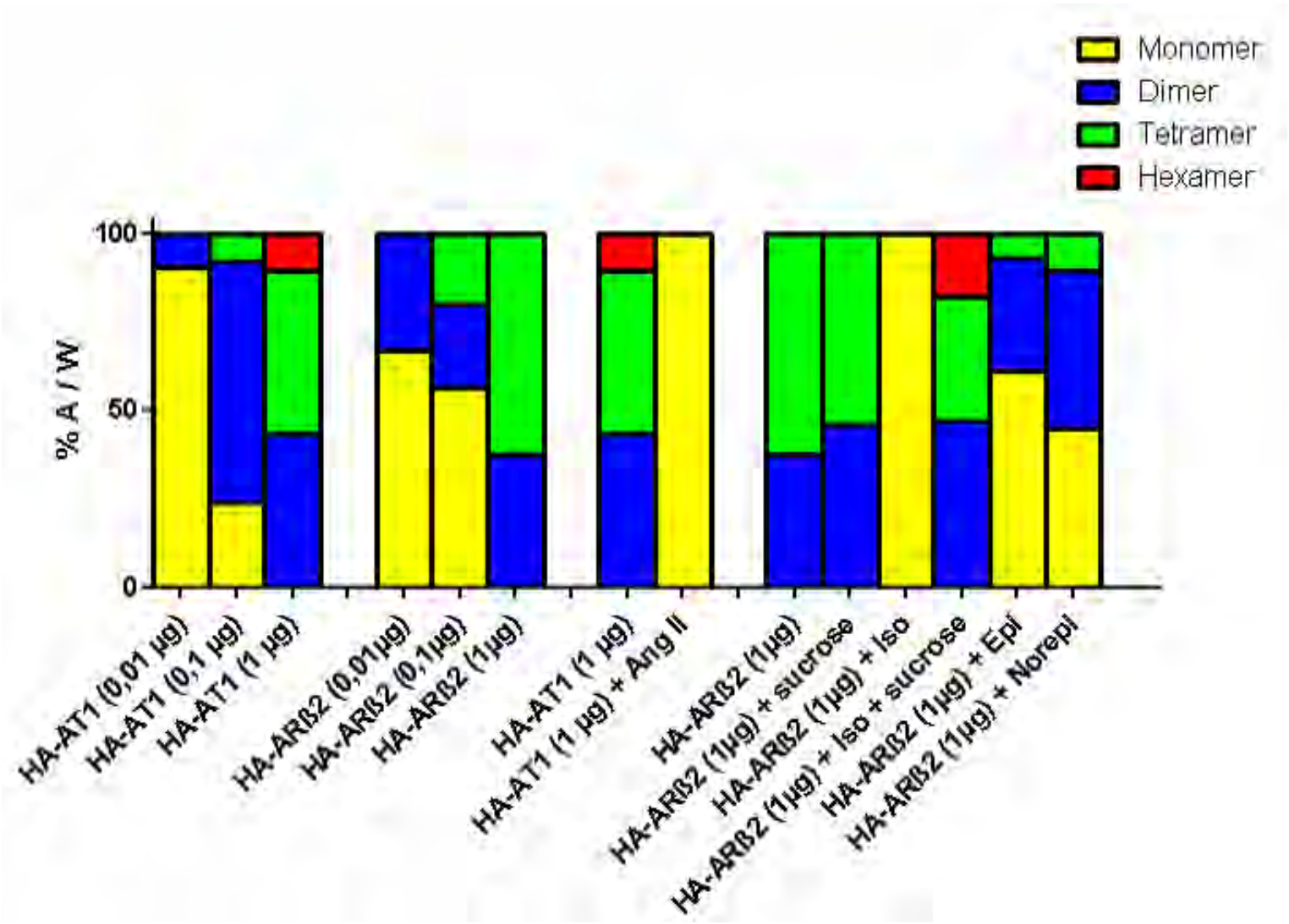


Figure 6 : ***Répartition des différentes populations oligomérique selon les conditions.***
Chaque population oligomérique est représentée par l'aire sous la courbe gaussienne associée à cette dernière pondérée par la largeur à i hauteur afin de tenir compte de la largeur de la distribution. Les valeurs obtenues ont été mis sous forme de pourcentage en divisant par l'aire totale de la courbe de la distribution des distances de rupture de la condition.

Cependant, toutes ces hypothèses doivent être pondérées par les limites de notre approche. En ce qui concerne ces limites, elles sont de 2 types : les limites dites « biologiques » et les limites « techniques ». Au niveau biologique, notre biais le plus important est celui de l'incapacité à connaître le taux de récepteurs naturellement exprimés à la surface cellulaire. Ainsi, nos conditions basales d'expression de récepteurs pourraient être largement supérieures à la quantité physiologique et donc la formation d'oligomères peut avoir été forcée dû aux grands nombres de récepteurs présents sur la membrane. Cependant, l'observation d'effets différents selon les conditions de stimulation montre que même si ces oligomères ont été induits par la surexpression ; ils présentent une activité modulée selon leurs degrés. Il serait intéressant de tester dans le futur l'effet de l'internalisation des récepteurs dans des conditions de cellules exprimant moins de récepteurs et ne présentant pas de populations oligomériques de très haut degré (transfection 0,1 µg) pour savoir si les populations monomériques ou dimériques sont réellement dénuées de processus d'internalisation en présence de l'agoniste;

L'utilisation de l'AFM dans le domaine des RCPGs n'est pas une première, puisqu'il y a eu deux études récentes qui ont utilisé une méthode d'analyse des courbes forces-distances générées par AFM[76,77]. Elles ont eu pour objectif de quantifier la force de liaisons des RCPGs à des ligands synthétique et endogène. Mais nous avons été les premiers à utiliser l'AFM pour étudier le comportement des RCPGs en cellules vivantes, ce qui est à l'origine de plusieurs difficultés. En travaillant sur cellules vivantes, nous sommes confrontés à des données AFM moins « propres », les CF présentent du bruit parasite et les distances de déploiements s'écartent des distances théoriques qui peut être expliqué par le fait, les RCPGs sont ancrés dans une membrane cellulaire et donc en interaction avec un environnement moléculaires riche avec de nombreuses autres protéines, lipides ou sucres pouvant interagir avec les récepteurs. Ce paramètre va impacter sur nos déploiements, en effet associé aux HA-RCPGs nous allons potentiellement déplier aussi d'autres substances et même des nanotubes de membranes[78,79]. Cette pollution est très certainement la raison du bruit observé sur nos distributions ainsi que lors d'un dépliement d'un monomère puisque nous ne trouvons pas la distance théorique mais souvent une distance plus longue. Nous avons pu exclure l'hypothèse que nos déploiements de longues distances, que nous avons attribué à des oligomères de RCPGs, ne sont pas des nanotubes de membranes par le fait que ces dernières disparaissent avec l'internalisation des récepteurs après stimulation par un agoniste. De plus, lorsque la densité de récepteur sur la membrane diminue par une diminution de la quantité d'ADN transfectée, il y a un bruit sur la distribution qui persiste. Certes le bruit diminue légèrement avec la diminution du nombre de récepteurs sur la membrane, ce qui peut être expliqué par la nécessité d'une « accroche » pour former un nanotube de membrane ce qui est fourni par l'interaction de la pointe fonctionnalisée et le RCPG.

Notre étude a permis, malgré certaines limites de notre approche, de pouvoir étudier l'organisation des RCPGs ainsi que l'implication de leur oligomérisation dans leur activité. Ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives dans le domaine des RCPGs, et pourrait permettre de comprendre et potentiellement limiter les effets secondaires des nombreux médicaments ciblant les RCPGs en augmentant la spécificité afin de cibler une certaines population oligomérique de ces récepteurs ciblés et/ou en concevant de nouvelles molécules thérapeutiques ayant cette capacité.

Références

1. Schiöth, H. B. & Fredriksson, R. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* **142,** 94–101 (2005).
2. Palczewski, K. *et al.* Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289,** 739–745 (2000).
3. Hill, S. J. G-protein-coupled receptors: past, present and future. *Br. J. Pharmacol.* **147 Suppl 1,** S27-37 (2006).
4. Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F. & Kobilka, B. K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459,** 356–363 (2009).
5. Matsunami, H., Montmayeur, J.-P. & Buck, L. B. A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature* **404,** 601–604 (2000).
6. Lewy, A. J. Melatonin and human chronobiology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **72,** 623–636 (2007).
7. Murdoch, C. & Finn, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* **95,** 3032–3043 (2000).
8. Hill, S. J. G-protein-coupled receptors: past, present and future. *Br. J. Pharmacol.* **147 Suppl 1,** S27-37 (2006).
9. Wise, A., Gearing, K. & Rees, S. Target validation of G-protein coupled receptors. *Drug Discov. Today* **7,** 235–246 (2002).
10. Manglik, A. *et al.* Crystal structure of the μ-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* **485,** 321–326 (2012).
11. Rasmussen, S. G. F. *et al.* Crystal structure of the β2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477,** 549–555 (2011).
12. Heldin, C. H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* **80,** 213–223 (1995).
13. Heldin, C.-H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* **80,** 213–223 (1995).
14. Yves, C. *Communications et signalisations cellulaires (4e ed)*. (Lavoisier, 2013).
15. Lohse, M. J. Dimerization in GPCR mobility and signaling. *Curr. Opin. Pharmacol.* **10,** 53–58 (2010).
16. Chabre, M. & le Maire, M. Monomeric G-Protein-Coupled Receptor as a Functional Unit. *Biochemistry (Mosc.)* **44,** 9395–9403 (2005).
17. Gurevich, V. V. & Gurevich, E. V. GPCR monomers and oligomers: it takes all kinds. *Trends Neurosci.* **31,** 74–81 (2008).
18. Gurevich, V. V. & Gurevich, E. V. How and why do GPCRs dimerize? *Trends Pharmacol. Sci.* **29,** 234–240 (2008).
19. Whorton, M. R. *et al.* A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104,** 7682–7687 (2007).
20. Kasai, R. S. *et al.* Full characterization of GPCR monomer–dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging. *J. Cell Biol.* **192,** 463–480 (2011).
21. Terrillon, S. & Bouvier, M. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep.* **5,** 30–34 (2004).
22. Chabre, M. & le Maire, M. Monomeric G-protein-coupled receptor as a functional unit. *Biochemistry (Mosc.)* **44,** 9395–9403 (2005).
23. Hébert, T. E. & Bouvier, M. Structural and functional aspects of G protein-coupled receptor oligomerization. *Biochem. Cell Biol.* **76,** 1–11 (1998).
24. Chapter 13 - Resonance Energy Transfer-Based Approaches to Study GPCRs. Available at: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091679X15002010. (Accessed: 13th July 2016)
25. Periasamy, A. & Day, R. N. Visualizing protein interactions in living cells using digitized GFP imaging and FRET microscopy. *Methods Cell Biol.* **58,** 293–314 (1999).
26. Sekar, R. B. & Periasamy, A. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *J. Cell Biol.* **160,** 629–633 (2003).
27. Bonanni, B. *et al.* Single molecule recognition between cytochrome C 551 and gold-immobilized azurin by force spectroscopy. *Biophys. J.* **89,** 2783–2791 (2005).
28. Borroto-Escuela, D. O., Flajolet, M., Agnati, L. F., Greengard, P. & Fuxe, K. BIOLUMINISCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (BRET) METHODS TO STUDY G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR - RECEPTOR TYROSINE KINASE HETERORECEPTOR COMPLEXES. *Methods Cell Biol.* **117,** 141–164 (2013).
29. James, J. R., Oliveira, M. I., Carmo, A. M., Iaboni, A. & Davis, S. J. A rigorous experimental framework for detecting protein oligomerization using bioluminescence resonance energy transfer. *Nat. Methods* **3,** 1001–1006 (2006).
30. Bouvier, M., Heveker, N., Jockers, R., Marullo, S. & Milligan, G. BRET analysis of GPCR oligomerization: newer does not mean better. *Nat. Methods* **4,** 3–4 (2007).
31. Calebiro, D. *et al.* Single-molecule analysis of fluorescently labeled G-protein–coupled receptors reveals complexes with distinct dynamics and organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110,** 743–748 (2013).
32. Koenig, J. A. & Edwardson, J. M. Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **18,** 276–287 (1997).
33. Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56,** 930–933 (1986).
34. Kienberger, F., Kada, G., Mueller, H. & Hinterdorfer, P. Single molecule studies of antibody-antigen interaction strength versus intra-molecular antigen stability. *J. Mol. Biol.* **347,** 597–606 (2005).
35. Puntheeranurak, T. *et al.* Substrate specificity of sugar transport by rabbit SGLT1: single-molecule atomic force microscopy versus transport studies. *Biochemistry (Mosc.)* **46,** 2797–2804 (2007).

36. Tang, J. *et al.* Atomic force microscopy imaging and single molecule recognition force spectroscopy of coat proteins on the surface of Bacillus subtilis spore. *J. Mol. Recognit. JMR* **20,** 483–489 (2007).
37. Tang, J. *et al.* Detection of metal binding sites on functional S-layer nanoarrays using single molecule force spectroscopy. *J. Struct. Biol.* **168,** 217–222 (2009).
38. Stroh, C. M. *et al.* Simultaneous topography and recognition imaging using force microscopy. *Biophys. J.* **87,** 1981–1990 (2004).
39. Dufrêne, Y. F. *et al.* Five challenges to bringing single-molecule force spectroscopy into living cells. *Nat. Methods* **8,** 123–127 (2011).
40. Müller, D. J., Helenius, J., Alsteens, D. & Dufrêne, Y. F. Force probing surfaces of living cells to molecular resolution. *Nat. Chem. Biol.* **5,** 383–390 (2009).
41. Ebner, A. *et al.* A new, simple method for linking of antibodies to atomic force microscopy tips. *Bioconjug. Chem.* **18,** 1176–1184 (2007).
42. Ebner, A., Hinterdorfer, P. & Gruber, H. J. Comparison of different aminofunctionalization strategies for attachment of single antibodies to AFM cantilevers. *Ultramicroscopy* **107,** 922–927 (2007).
43. Verbelen, C., Gruber, H. J. & Dufrêne, Y. F. The NTA-His6 bond is strong enough for AFM single-molecular recognition studies. *J. Mol. Recognit. JMR* **20,** 490–494 (2007).
44. Kamruzzahan, A. S. M. *et al.* Antibody linking to atomic force microscope tips via disulfide bond formation. *Bioconjug. Chem.* **17,** 1473–1481 (2006).
45. Gamsjaeger, R. *et al.* Oriented binding of the His6-tagged carboxyl-tail of the L-type Ca2+ channel alpha1-subunit to a new NTA-functionalized self-assembled monolayer. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **20,** 5885–5890 (2004).
46. Formosa, C. *et al.* Mapping HA-tagged protein at the surface of living cells by atomic force microscopy. *J. Mol. Recognit.* **28,** 1–9 (2015).
47. Nonaka, H., Fujishima, S., Uchinomiya, S., Ojida, A. & Hamachi, I. Selective Covalent Labeling of Tag-Fused GPCR Proteins on Live Cell Surface with a Synthetic Probe for Their Functional Analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **132,** 9301–9309 (2010).
48. Schembri, L. *et al.* The HA tag is cleaved and loses immunoreactivity during apoptosis. *Nat. Methods* **4,** 107–108 (2007).
49. Hopp, T. P. *et al.* A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification. *Nat. Biotechnol.* **6,** 1204–1210 (1988).
50. Einhauer, A. & Jungbauer, A. The FLAG™ peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods* **49,** 455–465 (2001).
51. Formosa, C. *et al.* Mapping HA-tagged protein at the surface of living cells by atomic force microscopy. *J. Mol. Recognit. JMR* **28,** 1–9 (2015).
52. Rols, M.-P., Coulet, D. & Teissié, J. Highly efficient transfection of mammalian cells by electric field pulses. *Eur. J. Biochem.* **206,** 115–121 (1992).
53. E. Dague, Trevisiol, E. & Jauvert, E. Pointe de microscope à force atomique modifiée et biomodifiée. (2010).
54. Jauvert, E. *et al.* Probing single molecule interactions by AFM using bio-functionalized dendritips. *Sens. Actuators B Chem.* **168,** 436–441 (2012).
55. Dague, E., Jauvert, E. & Trevisiol, E. Pointe de microscope à force atomique modifiée et biomodifiée. (2010).
56. Cordomí, A., Navarro, G., Aymerich, M. S. & Franco, R. Structures for G-Protein-Coupled Receptor Tetramers in Complex with G Proteins. *Trends Biochem. Sci.* **40,** 548–551 (2015).
57. Guo, D. F., Sun, Y. L., Hamet, P. & Inagami, T. The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins. *Cell Res.* **11,** 165–180 (2001).
58. Chidiac, P., Hebert, T. E., Valiquette, M., Dennis, M. & Bouvier, M. Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists. *Mol. Pharmacol.* **45,** 490–499 (1994).
59. de Vries, B. *et al.* β-Agonist-induced constitutive β2-adrenergic receptor activity in bovine tracheal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* **131,** 915–920 (2000).
60. Ferguson, S. S. G. *et al.* Role of β-Arrestin in Mediating Agonist-Promoted G Protein-Coupled Receptor Internalization. *Science* **271,** 363–366 (1996).
61. Duvernay, M. T., Filipeanu, C. M. & Wu, G. The regulatory mechanisms of export trafficking of G protein-coupled receptors. *Cell. Signal.* **17,** 1457–1465 (2005).
62. Wolfe, B. L. & Trejo, J. Clathrin-Dependent Mechanisms of G Protein-coupled Receptor Endocytosis. *Traffic* **8,** 462–470 (2007).
63. Calebiro, D., Nikolaev, V. O., Persani, L. & Lohse, M. J. Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **31,** 221–228 (2010).
64. Pin, J.-P. & Acher, F. The Metabotropic Glutamate Receptors: Structure, Activation Mechanism and Pharmacology. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets Former. Curr. Drug Targets - CNS Neurol. Disord.* **1,** 297–317 (2002).
65. Nicoletti, F. *et al.* Metabotropic glutamate receptors: new targets for the control of tumor growth? *Trends Pharmacol. Sci.* **28,** 206–213 (2007).
66. Park, R. D., Sullivan, P. C. & Storrie, B. Hypertonic sucrose inhibition of endocytic transport suggests multiple early endocytic compartments. *J. Cell. Physiol.* **135,** 443–450 (1988).
67. Calebiro, D. *et al.* Single-molecule analysis of fluorescently labeled G-protein–coupled receptors reveals complexes with distinct dynamics and organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110,** 743–748 (2013).

68. Hiller, C., Kühhorn, J. & Gmeiner, P. Class A G-Protein-Coupled Receptor (GPCR) Dimers and Bivalent Ligands. *J. Med. Chem.* **56,** 6542–6559 (2013).
69. Gether, U. & Kobilka, B. K. G Protein-coupled Receptors II. MECHANISM OF AGONIST ACTIVATION. *J. Biol. Chem.* **273,** 17979–17982 (1998).
70. Breitwieser, G. E. G Protein–Coupled Receptor Oligomerization Implications for G Protein Activation and Cell Signaling. *Circ. Res.* **94,** 17–27 (2004).
71. Fung, J. J. *et al.* Ligand-regulated oligomerization of β2-adrenoceptors in a model lipid bilayer. *EMBO J.* **28,** 3315–3328 (2009).
72. Kelly, E., Bailey, C. P. & Henderson, G. Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br. J. Pharmacol.* **153,** S379–S388 (2008).
73. Vidi, P.-A., Chemel, B. R., Hu, C.-D. & Watts, V. J. Ligand-Dependent Oligomerization of Dopamine D2 and Adenosine A2A Receptors in Living Neuronal Cells. *Mol. Pharmacol.* **74,** 544–551 (2008).
74. Qi, Y., Wang, J. K. T., McMillian, M. & Chikaraishi, D. M. Characterization of a CNS Cell Line, CAD, in which Morphological Differentiation Is Initiated by Serum Deprivation. *J. Neurosci.* **17,** 1217–1225 (1997).
75. Reiner, S., Ambrosio, M., Hoffmann, C. & Lohse, M. J. Differential Signaling of the Endogenous Agonists at the β2-Adrenergic Receptor. *J. Biol. Chem.* **285,** 36188–36198 (2010).
76. Alsteens, D. *et al.* Imaging G protein-coupled receptors while quantifying their ligand-binding free-energy landscape. *Nat. Methods* **12,** 845–851 (2015).
77. Pfreundschuh, M. *et al.* Identifying and quantifying two ligand-binding sites while imaging native human membrane receptors by AFM. *Nat. Commun.* **6,** 8857 (2015).
78. Sun, M. *et al.* Multiple Membrane Tethers Probed by Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.* **89,** 4320–4329 (2005).
79. Frederix, P. L. T. M., Bosshart, P. D. & Engel, A. Atomic Force Microscopy of Biological Membranes. *Biophys. J.* **96,** 329–338 (2009).

Annexes

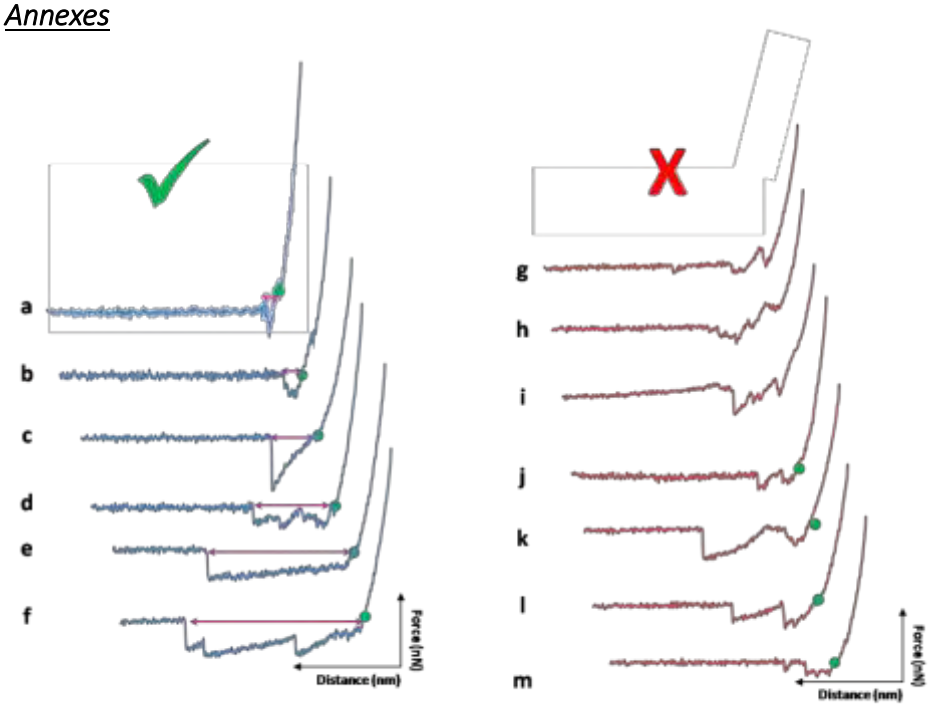
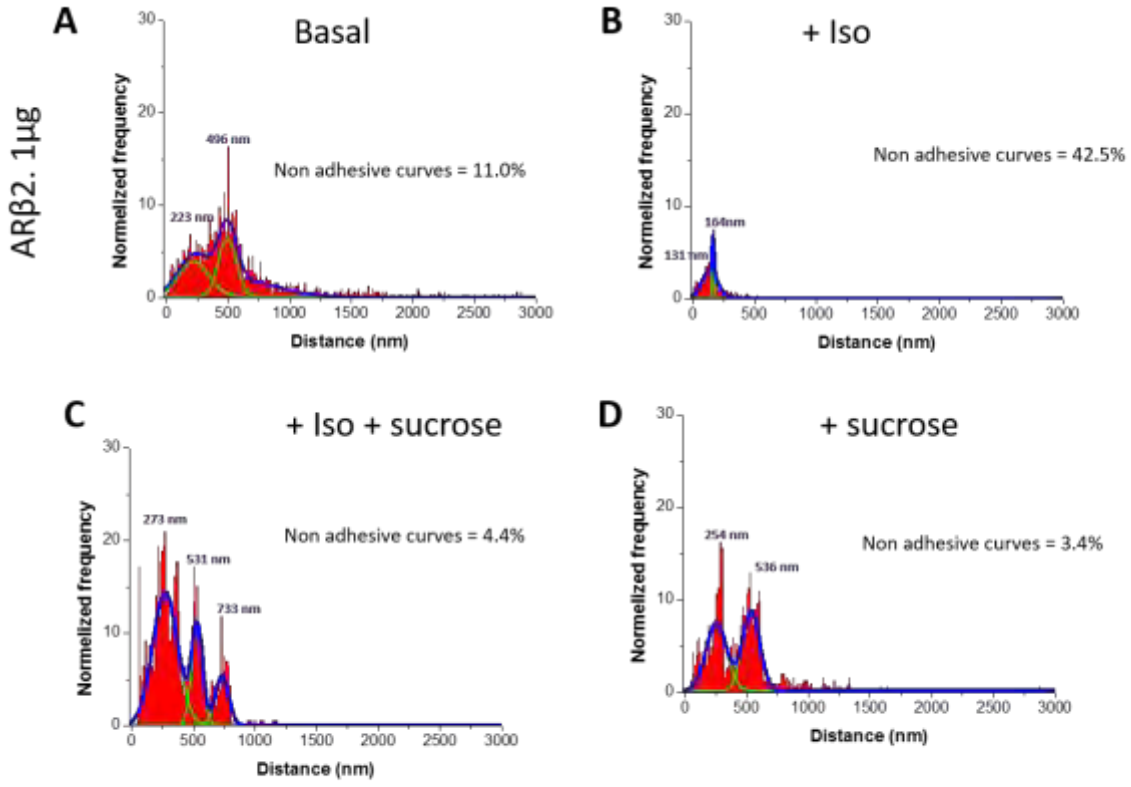


Figure annexe 1 : ***Panel de courbes de retrait présentant un motif adhésif :***
Les courbes bleues sont les courbes retenues et mesurées, en rouge celles qui sont rejetées.
*Les courbes **a**, **b**, **c**, **d**, **e** et **f** sont retenues pour avoir présentées les critères suivant :*

- *Point de contact déterminé*
- *Force d'adhésion supérieure à 60pN*
- *Retour à la ligne de base à la fin du déploiement*

*Les courbes **g**, **h** et **i** sont rejetées car le point de contact ne peut être déterminé et donc impossibilité de mesurer la distance du déploiement.*
*Les courbes **l**, et **m** sont aussi rejetées car il y a un retour à la ligne de base dans le motif adhésif.*



<u>Figure annexe 2</u> : ***Contrôle de l'effet d'un traitement au sucrose sur les déploiements***

A) *Histogramme de répartition des distances de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules transfectées* ***HA- ARβ2*** *(quantité d'ADN transfectée* ***1 µg****). Les distances ont été normalisées par rapport au nombre d'évènements non adhésifs et réparties en classe de 5 nm. La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvoluée en 2 Gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 223 et 496 nm. Il reste 11,0 % de courbes non adhésives.* ***B)*** *Histogramme de répartition des distances de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules transfectées* ***HA-ARβ2*** *(quantité d'ADN transfectée* ***1 µg****) stimulées par de l'****Isoproterenol*** *(10µM, 20min). Les distances ont été normalisées par rapport au nombre d'évènements non adhésifs et réparties en classe de 5 nm. La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvoluée en 2 Gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 131 et 164 nm. Il reste 42,5 % de courbes non adhésives.* ***B)*** *Histogramme de répartition des distances de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules transfectées* ***HA- ARβ2*** *(quantité d'ADN transfectée* ***1 µg****) préalablement traité au sucrose (200µM, 1h) puis stimulées par de l'****Isoproterenol*** *(10µM, 20min). La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvoluée en 3 Gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 273, 531 et 733 nm. Il reste 4,4 % de courbes non adhésives.* ***D)*** *Histogramme de répartition des distances de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules transfectées* ***HA- ARβ2*** *(quantité d'ADN transfectée* ***1 µg****) traitées au sucrose (200µM, 1h). La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvoluée en 2 Gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 254 et 536 nm. Il reste 3,4 % de courbes non adhésives.*

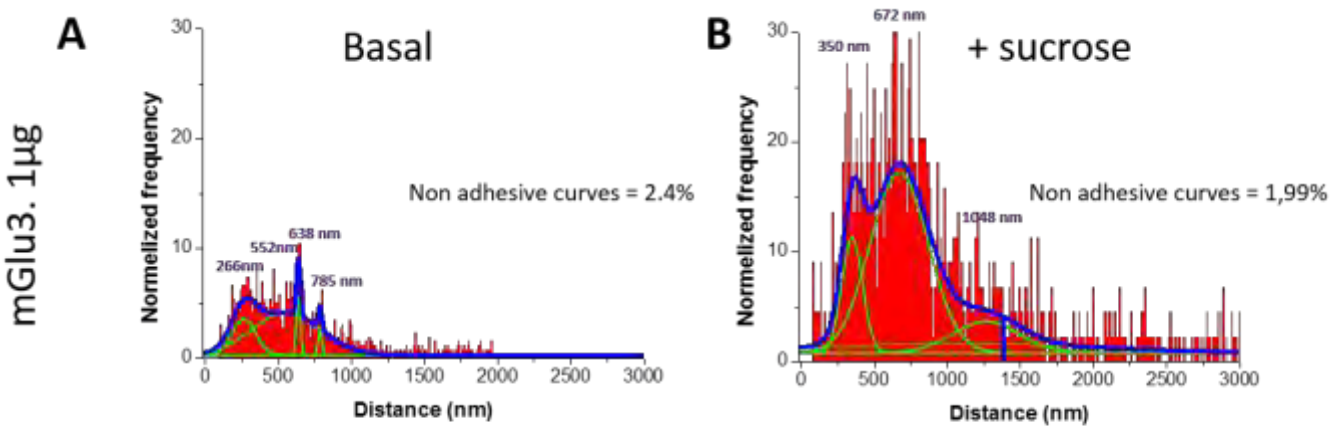
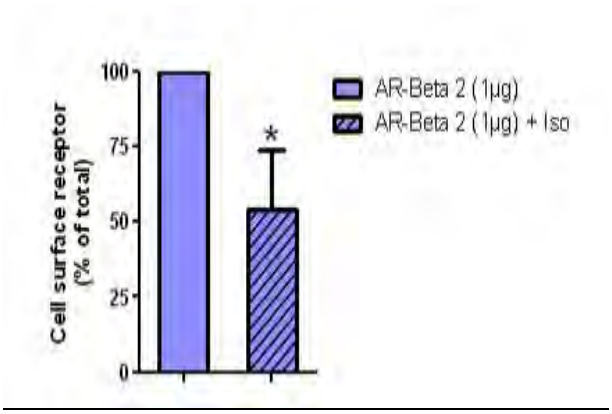


Figure Annexe 3 : ***Cas mGlu3 avant et après traitement du sucrose :***
A) *Histogramme de répartition des distances de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules transfectées* ***HA-mGlu3 (quantité d'ADN transfectée 1 µg).*** *Les fréquences ont été normalisées par rapport au nombre d'évènements non adhésifs et les distances de rupture, réparties en classe de 5 nm. La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvoluée en 4 gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 266, 552, 638 et 785 nm. Il reste 2,4 % de courbes non adhésives.*
B) *Histogramme de répartition des distances de rupture entre la pointe anti-HA et des cellules transfectées* ***HA-mGlu3 (quantité d'ADN transfectée 1 µg)*** *préalablement* ***traitées au sucrose*** *afin de bloquer l'internalisation. La courbe bleue représente le fit gaussien global de la distribution qui peut être déconvoluée en 3 gaussiennes, représentées par les courbes vertes, centrées respectivement sur 350, 672 et 1048 nm. Il reste 2,0 % de courbes non adhésives.*



<u>Figure Annexe 4 :</u> ***Evaluation quantitative de l'internalisation de ARβ2*** *induite par stimulation d'Isoprotérénol. Les cellules CHO WTT exprimant la β2-AR ont été traitées ou non avec 10 µM d'Iso pendant 15 min à 37 ° C pour favoriser l'internalisation des récepteurs. Les récepteurs exprimés à la surface cellulaire ont été détectés par ELISA et exprimée dans chaque expérience en pourcentage de la totalité des récepteurs de la surface cellulaire, comme décrit dans Matériels et Méthodes. Les valeurs correspondent à la moyenne ± écart-type calculé à partir de trois expériences indépendantes. Comparaisons des deux groupes ont été effectuées à l'aide du test statistique de Student associé à un t test. * P <0,05.*

Annexes

Annexe 1. Demande d'autorisation de Projet utilisant des animaux à des fins scientifiques

Annexe 2. Biophysical properties of cardiomyocytes surface explored by multiparametric AFM

Demande d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques

Demande d'Autorisation de Projet utilisant des Animaux à des Fins Scientifiques

Ce formulaire a pour objectif de rassembler les informations permettant au comité d'éthique dont relève l'établissement utilisateur où sera réalisé le projet utilisant des animaux à des fins scientifiques, d'évaluer éthiquement le projet et au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche d'autoriser le projet suite à l'évaluation éthique.

Le fichier de ce formulaire ainsi que la notice d'aide pour le renseigner peuvent être demandés à :
autorisation-projet@recherche.gouv.fr

Le projet est défini comme un programme de travail répondant à un objectif scientifique défini, utilisant un ou plusieurs modèles animaux et impliquant une ou plusieurs procédures expérimentales (article R-214-89 du Code rural et de la pêche maritime).

Le formulaire renseigné sera envoyé par lettre recommandée avec accusé de réception à l'adresse suivante :
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche – Direction Générale pour la Recherche et l'Innovation – Secrétariat « Autorisation de projet » - 1, rue Descartes, 75231 PARIS cedex 5

N.B. A l'exception des duplications des blocs permises et repérées par …, aucune modification des items de ce formulaire ne doit être effectuée.

1. INFORMATIONS GÉNÉRALES

1.1. TITRE DU PROJET :

Etude de l'effet de la doxorubicine sur l'architecture et l'ultrastructure des membranes des cardiomyocytes chez la souris (DoxoCard)

1.2. Durée du projet :

~ 18 mois

1.3. Date prévue de début du projet :

30/06/2014

2. RÉSUMÉ NON TECHNIQUE

L'équipe porteuse du projet (Equipe 8, I2MC) a récemment mis en évidence dans un modèle d'insuffisance cardiaque ischémique une désorganisation très précoce de l'architecture de la membrane du cardiomyocyte (CM) secondaire une mort des mitochondries sub-sarcolemmales (Dague et al, JMCC, en révision). Ces anomalies

mises en évidence à la fois par microscopie à force atomique (AFM) et microscopie électronique MET, MEB) précèdent la désorganisation des tubules T, l'atteinte du système contractile et la survenue d'une insuffisance cardiaque.
La question qui est maintenant posée est de savoir si ces anomalies sont spécifiques de l'ischémie ou génériques des processus, quel qu'en soit le mécanisme, qui conduisent à l'insuffisance cardiaque. Nous souhaitons donc étudier chez 5 cohortes de 22 souris (13 traitées et 9 contrôles) les conséquences au cours du temps (analyses à J3, J15, J28, J36 et J56 après le début du traitement) de l'exposition à la doxorubicine (5 mg/kg 1 fois par semaine pendant 5 semaines) sur l'architecture et l'ultrastructure de la membrane des CMs. La doxorubicine est un médicament anticancéreux dont l'utilisation est limitée chez l'Homme par le risque de cardiotoxicité, La dose choisie est connue pour induire à une insuffisance cardiaque chez la souris 8 semaines après le début du traitement.

3. INFORMATIONS ADMINISTRATIVES ET RÉGLEMENTAIRES

3.1. L'établissement utilisateur (EU)

3.1.1. Agrément de l'EU où seront utilisés les animaux :

- Nom : Zootechnie Expérimentale de Rangueil US06
- Numéro d'agrément : C31 55507
- Date de délivrance de l'agrément : 22/06/2012
- Nom et prénom du responsable : Yara Barrera
- Adresse électronique du responsable : yara.barreira@inserm.fr
- Nom et prénom de la personne délégataire du responsable présente dans l'EU : Cédric Baudelin
- Adresse électronique de ce délégataire : cedric.baudelin@inserm.fr

3.1.2. Comité d'éthique agréé par le MESR dont relève l'EU :

(us006-ethique@inserm.fr) #agrément: CEEA-122

3.1.3. Responsable(s) de la mise en œuvre générale du projet dans l'EU et de sa conformité à l'autorisation de projet :

Nombre de responsables :

1

Responsable :

- Nom et prénom : SENARD Jean-Michel
- Adresse postale (avec le nom du laboratoire) : Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires (I2MC). Inserm U1048/Université Paul Sabatier Equipe n°08 (Bat L3, rdc, porte 3.209).1 avenue Jean Poulhès BP 84225. 31432 Toulouse Cedex

- Adresse électronique : jean-michel.senard@inserm.fr
- Téléphone : 0561322921

3.1.4. Responsable(s) du bien-être des animaux :

Nombre de responsables :

1

Responsable :

- Nom et prénom : Baudelin Cédric
- Adresse postale (avec le nom du laboratoire) : Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires (I2MC). Inserm U1048/Université Paul Sabatier Equipe n°08 (Bat L3, rdc, porte 3.209).1 avenue Jean Poulhès BP 84225. 31432 Toulouse Cedex
- Adresse électronique : cedric.baudelin@inserm.fr
- Téléphone : 0567113476

- Nom et prénom : Yara Barreira
- Adresse postale (avec le nom du laboratoire) : Transgenèse/Zootechnie/Exploration Fonctionnelle (Anexplo) 195, Route d'Espagne - B.P 13 669. 31036 - Toulouse - Cedex 1
- Adresse électronique : yara.bareira@inserm.fr
- Téléphone : 0534633730

- 3.2. Le personnel

- **Compétences des personnes participant au projet :**

  - **la conception des procédures expérimentales et des projets** ● **oui** ○ **non**
  - **l'application de procédures expérimentales aux animaux** ● **oui** ○ **non**
  - **les soins aux animaux** ● **oui** ○ **non**
  - **la mise à mort des animaux** ● **oui** ○ **non**

3.3. Le projet

3.3.1. L'objectif du projet :

Est-il :

- **justifié du point de vue éducatif ?** ○
- **requis par la loi ?** ○
- **justifié du point de vue scientifique ?** ●
- **Informations sur cette justification :**

L'insuffisance cardiaque est une maladie fréquente (environ 500 000 personnes en France) dont le pronostic reste mauvais malgré les nombreux progrès réalisés ces dernières années dans son diagnostic et sa prise en charge. En effet si les thérapeutiques actuellement disponibles améliorent les symptômes et diminuent la morbidité associée, elles n'ont pas d'impact réel sur l'évolution inéluctable de la maladie vers l'aggravation. Ces observations permettent de souligner que les mécanismes lésionnels intimes du cardiomyocyte (CM) conduisant à l'insuffisance

cardiaque sont encore incomplètement compris. La mise en évidence récente par l'équipe de lésions spécifiques et très précoces de la membrane latérale du CM au cours de l'ischémie myocardique laisse supposer qu'il s'agit là de lésions fondamentales conduisant à terme au développement de l'insuffisance cardiaque. Il s'agit maintenant de démontrer que ces altérations précoces de la membrane du CM se retrouvent dans tous les modèles d'insuffisance cardiaque. Ainsi le présent projet vise à démontrer, dans un modèle bien établi de cardiotoxicité et d'insuffisance cardiaque induite par la doxorubicine, que les anomalies rencontrées lors de l'ischémie sont aussi présentes.

3.3.2. Description du projet :

L'objectif principal est la caractérisation, comparativement au véhicule, des effets sur l'architecture et l'ultrastructure de la membrane de CM isolé de souris exposées à un traitement chronique par la doxorubicine (5 mg/kg 1 fois par semaine pendant 5 semaines au maximum). Les objectifs secondaires sont l'analyse de la cinétique des anomalies membranaires induites par la doxorubicine à J3, J15, J28, J36 et J56 après la première injection.
A chaque temps, les animaux subiront une échocardiographie sous anesthésie pour mesurer la fraction d'éjection, puis seront sacrifiés et le cœur sera immédiatement prélevé pour isolement des CMs. Les caractéristiques biomécaniques et topographiques de la membrane seront étudiées en Microscopie à force atomique (AFM) sur cellules vivantes (Genet et al, Circ Res 2012). L'ultrastructure sera étudiée en microscopie électronique. Les résultats obtenus seront confrontés à la sévérité de l'insuffisance cardiaque mesurée en échographie, à la désorganisation du réseau de tubules T appréciée en IF, aux modifications histomorphologiques du tissu cardiaque.

3.3.3. Précisez, le cas échéant, la ou les méthodes de mise à mort prévue(s) :

Injection intrapéritonéale d'une dose létale de Pentobarbital Sodique

3.3.4. Précisez, le cas échéant, les éléments scientifiques justifiant la demande de dérogation concernant la méthode de mise à mort envisagée :

3.3.5. Stratégie d'expérimentation ou d'observation et approche statistique utilisée afin de réduire au minimum le nombre d'animaux, la douleur, la souffrance et l'angoisse, infligées et l'impact environnemental, le cas échéant – si une étude statistique est prévue, indiquez et justifiez les tests choisis :

1/ Pour chaque temps d'analyse, l'exposition à la doxorubicine ou au véhicule se fera dans un premier temps sur un lot de 6 animaux dans chaque groupe. Ce nombre est a priori suffisant pour détecter la présence d'anomalies significatives de l'élasticité de la membrane en AFM (module de Young, ANOVA) ou de l'ultrastructure en microscopie électronique (5% d'anomalie chez les contrôles à type de perte partielle ou totale des mitochondries subsarcolemmales ou d'amas sous-membranaires, Test exact de Fisher) (Dague et al, JMCC en révision). En l'absence de différence significative, la cohorte

(animaux traités ou contrôles) sera augmentée de 3 animaux supplémentaires dans chaque groupe (soit 9 souris traitées et 9 animaux contrôles au maximum par temps d'analyse). Quatre souris supplémentaires seront exposées à la doxorubicine dans les mêmes conditions pour l'analyse histomorphologique du tissu cardiaque.
2/ Le suivi et l'analyse au cours du temps des anomalies membranaires recherchées chez les animaux exposés à la doxorubicine ou au véhicule seront poursuivis jusqu'à ce qu'au moins 75% des souris traitées (voir cinétique des mesures en 3.3.2) présentent une insuffisance cardiaque caractérisée par une fraction d'éjection < 40%.

3.4. Les animaux

3.4.1. Justifiez la nécessité d'avoir recours à des animaux pour atteindre les objectifs du projet :

Le but du projet est l'étude des anomalies de la membrane des cardiomyocytes et de l'insuffisance cardiaque induite par la doxorubicine. Ceci ne peut se faire que chez l'animal en l'absence de modèles in vitro approprié.

3.4.2. Espèces animales ou types d'animaux utilisés :

Souris (*Mus musculus*)	■
Rats (*Rattus norvegicus*)	☐
Cobayes (*Cavia porcellus*)	☐
Hamsters (syriens) (*Mesocricetus auratus*)	☐
Hamsters (chinois) (*Cricetulus griseus*)	☐
Gerbilles de Mongolie (*Meriones unguiculatus*)	☐
Autres rongeurs (*Rodentia*)	☐
Lapins (*Oryctolagus cuniculus*)	☐
Chats (*Felis catus*)	☐
Chiens (*Canis familiaris*)	☐
Furets (*Mustela putorius furo*)	☐
Autres carnivores (*carnivora*)	☐
Chevaux, ânes et croisements (*Equidae*)	☐
Porcs (*Sus scrofa domesticus*)	☐
Caprins (*Capra aegagrus hircus*)	☐
Ovins (*Ovis aries*)	☐
Bovins (*Bos primigenius*)	☐
Prosimiens (*prosimia*)	☐
Ouistitis et tamarins (*par exemple, Callithrix jacchus*)	☐
Singe cynomolgus (*Macaca fascicularis*)	☐
Singe rhésus (*Macaca mulatta*)	☐
Vervets *chlorocebus* spp. (généralement soit *pygerythrus*, soit *sabaeus*)	☐
Babouins (*Papio* spp.)	☐
Saïmiris (par exemple, *Saimiri sciureus*)	☐
Autres espèces de primates non humains (autres espèces de *Ceboidea* et *Cercopithecoidea*)	☐

Singes anthropoïdes (*Hominoidea*) ☐
Autres mammifères (autres *Mammalia*) ☐
Poules domestiques (*Gallus gallus domesticus*) ☐
Autres oiseaux (autres *Aves*) ☐
Reptiles (*Reptilia*) ☐
Grenouilles Rana (*Rana temporaria* et *Rana pipiens*) ☐
Grenouilles Xenopus (*Xenopus laevis* et *Xenopus tropicalis*) ☐
Autres amphibiens (autres *Amphibia*) ☐
Poissons zèbres (*Danio rerio*) ☐
Autres poissons (autres *Pisces*) ☐
Céphalopodes (*Cephalopoda*) ☐

3.4.3. Justifiez la pertinence de l'(des) espèce(s) animale(s) choisie(s) :

La souris est un modèle animal validé de cardiotoxicité et d'insuffisance cardiaque induite par la doxorubicine

3.4.4. S'agit-il de spécimens d'espèces menacées énumérées à l'annexe A du règlement (CE) n° 338/97 du Conseil du 9 décembre 1996 relatif à la protection des espèces de faune et de flore sauvages par le contrôle et leur commerce ?

○**oui** ● **non**

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres espèces que celles énumérées dans cette annexe :

3.4.5. S'agit-il de spécimens de primates non humains ?

○**oui** ● **non**

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres espèces de primates non humains

3.4.6. S'agit-il d'animaux capturés dans la nature ?

○**oui** ● **non**

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres animaux que ceux capturés dans la nature :

3.4.7. S'agit-il d'animaux d'espèces domestiques, errants ou vivant à l'état sauvage ?

○**oui** ● **non**

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte qu'en utilisant ces animaux.

3.4.8. Catégorie des animaux utilisés dans le projet :

Animaux tenus en captivité (domestiques ou non domestiques) ■
Animaux non domestiques non tenus en captivité ☐
Animaux génétiquement altérés ☐

- **Animaux non domestiques non tenus en captivité**
- **Si les animaux utilisés sont des spécimens d'espèces protégées en application de l'article L. 411-1 du Code de l'environnement, indiquez les références de la dérogation accordée pour effectuer la capture des animaux dans le milieu naturel (4° de l'article L. 411-2 du Code de l'environnement) :**

/

- **Si les animaux utilisés sont des spécimens d'espèces dont la chasse est autorisée, indiquez ici les références de l'autorisation de prélèvement accordée pour effectuer la capture des animaux dans le milieu naturel (article L. 424-11 du Code de l'environnement) :**

/

- **Justification scientifique montrant que l'objectif de la procédure expérimentale ne peut être atteint en utilisant un animal élevé en vue d'une utilisation dans des procédures expérimentales :**

/

- **Animaux génétiquement altérés**
  - **Animaux génétiquement modifiés** ○oui ●non

  Si oui :
  - **Création d'une lignée** ○oui ●non
  - °**Maintien d'une lignée établie et/ou utilisation**
    - **Phénotype non dommageable**
    - **Phénotype dommageable**

  - **Souche mutante autre** ○oui ●non
- **Si oui :**
  - **Création d'un mutant**
  - **Maintien d'une lignée établie et/ou utilisation**
    - **Phénotype non dommageable**
    - **Phénotype dommageable**

3.4.9. Origine des animaux tenus en captivité :

○ **Les animaux destinés à être utilisés dans les procédures expérimentales appartenant aux espèces dont la liste est fixée réglementairement sont-ils élevés à cette fin et proviennent-ils d'éleveurs ou de fournisseurs agréés ?**

●**oui** ○**non**

- **Si oui, nombre d'établissements éleveur ou fournisseur agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet :**

1

Etablissement :

- **Nom :**

Charles River Laboratories

- **Adresse postale :**

Les Ocins, BP 109, Domaines des Oncins. 69210 St Germain L'arbresle

- **Animaux fournis :**

Souris C57Bl6 de 8 semaines

- **Si non, justifier scientifiquement l'utilisation d'animaux qui ne proviennent pas d'éleveurs ou de fournisseurs agréés :**

○ **Votre propre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ?** ○**oui** ●**non**

○ **Un autre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ?** ○**oui** ●**non**

○ **Nombre d'établissements éleveur occasionnel non agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet ?**

aucun

Etablissement :

- **Nom :**

/

- **Adresse postale :**

/

- **Animaux fournis :**

/

…

○ **Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur localisés dans des Etats membres autres que la France fournissant tout ou partie des animaux du projet ?**

0

Etablissement :
Nom de cet éleveur ou fournisseur et pays :

…

○ **Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur localisés dans des pays tiers fournissant tout ou partie des animaux du projet ?**

/

Etablissement :
Nom de cet éleveur ou fournisseur et pays :

/

○ **Les animaux sont-ils des animaux réutilisés d'un projet précédent ?**

○**oui** ●**non**

Si oui, veuillez compléter le chapitre 4.3 de ce formulaire.

3.4.10. Nombre estimé d'animaux utilisés dans le projet :

130 animaux maximum

○ **Justification de ce nombre pour chacune des espèces animales utilisées :**

13 souris traitées et 9 contrôles maximum par cohorte (5 cohortes d'analyse) soit 110 souris auxquelles il faut rajouter 20 souris en raison du taux de mortalité attendu avec le protocole de traitement par la doxorubicine (15-18%).

3.4.11. Indiquez à quel(s) stade(s) de développement les animaux seront utilisés et le justifier :

adultes de 8-10 semaines

3.4.12. Indiquez le sexe des animaux utilisés et le justifier :

Mâles afin de limiter la variabilité liée au sexe.

3.4.13. Indiquez pour chaque espèce les points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces pour permettre de limiter la douleur à son minimum, sans

remettre en cause les résultats du projet :

Les souris seront observés quotidiennement afin d'évaluer le bien-être ou la douleur des animaux. Les points limites sont définis ci-dessous :

- Signes de choc persistants après l'injection : salivation, plaques d'urticaire, prurit, tremblements.
- Perte d'appétit et/ou une diminution de la consommation d'eau (pendant 24 ou 48h entraînant une perte de poids et une déshydratation.
- Perte de poids supérieure à 10% du poids initial.
- Posture de prostration ou léthargie au-delà de 24 heures après l'injection.
- Difficulté respiratoire prolongée.

En cas de dépassement d'un point limite, les animaux seront euthanasiés selon la méthode prévue décrite au paragraphe § 3.3.3. (Injection intrapéritonéale d'une dose élevée de Pentobarbital Sodique).

4. LES PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

4.1 Objet(s) visés par les procédures expérimentales

4. LES PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

4.1 Objet(s) visés par les procédures expérimentales

A - La recherche fondamentale. ■

B - Les recherches translationnelle ou appliquées menées pour :
- la prévention, la prophylaxie, le diagnostic ou le traitement de maladies, de mauvais états de santé ou d'autres anomalies ou de leurs effets chez l'homme, les animaux ou les plantes ;
- l'évaluation, la détection, le contrôle ou les modifications des conditions physiologiques chez l'homme, les animaux ou les plantes ;
- le bien-être des animaux et l'amélioration des conditions de production des animaux élevés à des fins agronomiques. ☐

C - L'une des finalités visées au point précédent (B) lors de la mise au point, de la production ou des essais de qualité, d'efficacité et d'innocuité de médicaments à usage humain ou vétérinaire, de denrées alimentaires, d'aliments pour animaux et d'autres substances ou produits. ☐

D - La protection de l'environnement naturel dans l'intérêt de la santé ou du bien-être de l'homme ou de l'animal. ☐

E- La recherche en vue de la conservation des espèces. ☐

F- L'enseignement supérieur, ou la formation professionnelle ou technique conduisant à des métiers qui comportent la réalisation de procédures expérimentales sur des animaux ou les soins et l'entretien de ces animaux, ainsi que la formation professionnelle continue dans ce domaine. ☐

G - Les enquêtes médico-légales. ☐

4.2 Nombre de procédures expérimentales :

1

4.2.1 NOM DE LA PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE N° 1 :

Induction d'une cardiotoxicité et d'une insuffisance cardiaque par injection intrapéritonéale de doxorubicine

- PROPOSITION DE CLASSIFICATION DE LA PROCÉDURE SELON LE DEGRÉ DE SÉVÉRITE (conformément à l'annexe de l'arrêté relatif à l'autorisation de projet) **:**
○ classe légère
● classe modérée
○ classe sévère
○ classe sans réveil

- Description détaillée de la procédure expérimentale :

- ¥ - Pertinence et justification de la procédure expérimentale :

Le schéma expérimental a choisi a été validé chez la souris. Il détermine une insuffisance cardiaque chez 75% des animaux 8 semaines après le début de l'exposition (1 injection ip de 5 mg/kg (~250µL de doxorubicine dans 750µL de tampon phosphate salin *PBS*) par semaine pendant 5 semaines et s'accompagne d'un taux de mortalité limité (15-18%). Un groupe contrôle recevant un même volume du solvant de la doxoubicine (1mL de PBS) est prévu. 5 temps d'analyse sont prévus (J3, J15, J28, J36 et J56) mais l'expérience pourra s'arrêter plus tôt si dans une cohorte, le taux d'animaux insuffisants cardiaques atteint 75%.

A chaque temps les animaux auront une évaluation de la fraction d'éjection par échocardiographie sous anesthésie (10pg/g étomidate) puis seront sacrifiés par injection d'une dose létale de pentobarbital. Le cœur sera immédiatement prélevé puis les cardiomyocytes seront isolés (méthode Langendorff) pour analyse en AFM ou Immunofluorescence (IF) (tubules T) sur cellules vivantes ou fixés (microscopie électronique). Pour 4 animaux le cœur entier sera fixé pour analyse histomorphologique.

- ¥ - Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lots, et les justifier :

Les 5 cohortes prévues comporteront au maximum 13 animaux dans le groupe traité et 9 dans le groupe contrôle (en se basant sur les données disponibles et un taux de mortalité de 15-18%, le nombre maximum de souris utilisées sera de 130):
Cohorte J3 : 13 animaux maximum traités par doxorubicine et 9 animaux maximum dans le groupe contrôle
Cohorte J15 : 13 animaux maximum traités par doxorubicine et 9 animaux maximum dans le groupe contrôle
Cohorte J28 : 13 animaux maximum traités par doxorubicine et 9 animaux maximum dans le groupe contrôle
Cohorte J36 : 13 animaux maximum traités par doxorubicine et 9 animaux maximum dans le groupe contrôle
Cohorte J56 : 13 animaux maximum traités par doxorubicine et 9 animaux maximum dans le groupe contrôle

- Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés :

/

- Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médications - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires…en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

Dès leur arrivée, un examen clinique est réalisé par une personne compétente et les animaux sont placés dans des cages adaptées.
Dès le début de la période d'acclimatation, une surveillance quotidienne des animaux et un contact humain quotidien (préhension, caresses…) sont réalisés.
Avant l'injection par une personne habilitée et entraînée, le liquide à injecter sera dilué avec du PBS réchauffé. En raison du risque de choc histaminique au décours de l'injection, les animaux resteront sous observation pendant 30 minutes après l'injection intrapéritonéale. Si des signes cliniques du choc apparaissent (salivation, plaques d'urticaire, prurit, tremblements), une injection de methyprednisolone (1 mg/mL) sera réalisée en sous cutanée.

- Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

Le contrôle des animaux sera renforcé après chaque injection. De façon quotidienne une évaluation de l'état de santé des animaux participant à l'étude sera réalisée à la recherche des points limites (cf § 3.4.13) :
- Poids corporel,
- Troubles digestifs,
- Troubles cutanés (alopécie en cm^2, prurit),
- Tremblements,
- Comportement général : Posture de prostration ou léthargie, piloérection, ptose, dos voûté.

Si un point limite est atteint, les animaux concernés seront euthanasiés selon la procédure décrite dans le paragraphe §3.3.3.

- ¥ - Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :

/

- ¥ - Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

/

- Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :

- Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale :

- mise à mort ? Oui

précisez les animaux concernés :

Tous les animaux sont concernés

- animal gardé en vie ? Non

précisez les animaux concernés et si la décision a été prise par le vétérinaire ou toute autre personne compétente désignée par le responsable du projet :

/

- placement ou mise en liberté des animaux ?

précisez les animaux concernés :

/

4.2.2 NOM DE LA PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE N° 2 :

- PROPOSITION DE CLASSIFICATION DE LA PROCÉDURE SELON LE DEGRÉ DE SÉVÉRITE (conformément à l'annexe de l'arrêté relatif à l'autorisation de projet) **:**

classe légère
classe modérée
classe sévère
classe sans réveil

- Description détaillée de la procédure expérimentale :

- ¥ - Pertinence et justification de la procédure expérimentale :

- ¥ - Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lots, et les justifier :

- ¥ - Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés :

Néant

- ¥ - Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médications - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires…en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

néant

- ¥ - Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

néant

- ¥ - Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :

néant

- ¥ - Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

néant

- Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :

- Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale :

- ¥ o mise à mort ? NON

précisez les animaux concernés :

néant

- ¥ o animal gardé en vie ? OUI

précisez les animaux concernés et si la décision a été prise par le vétérinaire ou toute autre personne compétente désignée par le responsable du projet :

- ¥ ○ placement ou mise en liberté des animaux ?
  précisez les animaux concernés :

néant

…

4.2.3 NOM DE LA PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE N° 3 :

- PROPOSITION DE CLASSIFICATION DE LA PROCÉDURE SELON LE DEGRÉ DE SÉVÉRITE (conformément à l'annexe de l'arrêté relatif à l'autorisation de projet) **:**

classe légère
classe modérée
classe sévère
classe sans réveil

- Description détaillée de la procédure expérimentale :

- ¥ - Pertinence et justification de la procédure expérimentale :
- ¥ - Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lots, et les justifier :
- ¥ - Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés :

Néant

- ¥ - Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médications - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires…en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

néant

- ¥ - Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :
- ¥ - Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :

néant

- ¥ - Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

néant

- Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :

- Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale :

- ¥ ○ mise à mort ?

précisez les animaux concernés :

- ¥ ○ animal gardé en vie ?

précisez les animaux concernés et si la décision a été prise par le vétérinaire ou toute autre personne compétente désignée par le responsable du projet :

- ¥ ○ placement ou mise en liberté des animaux ?

précisez les animaux concernés :

4.2.4 NOM DE LA PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE N° 4 :

- PROPOSITION DE CLASSIFICATION DE LA PROCÉDURE SELON LE DEGRÉ DE SÉVÉRITE (conformément à l'annexe de l'arrêté relatif à l'autorisation de projet) **:**

classe légère
classe modérée
classe sévère
classe sans réveil

- Description détaillée de la procédure expérimentale :

- ¥ - Pertinence et justification de la procédure expérimentale :

- ¥ - Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lots, et les

justifier :

- ¥ - Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés :

- ¥ - Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médications - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires…en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

néant

- ¥ - Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

- ¥ - Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :

néant

- ¥ - Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

néant

- Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :

- Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale :

- ¥ ○ mise à mort ? NON

précisez les animaux concernés :

- ¥ ○ animal gardé en vie ?

précisez les animaux concernés et si la décision a été prise par le vétérinaire ou toute autre personne compétente désignée par le responsable du projet :

néant

- ¥ ○ placement ou mise en liberté des animaux ?

précisez les animaux concernés :

néant

4.2.5 NOM DE LA PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE N° 5 :

- PROPOSITION DE CLASSIFICATION DE LA PROCÉDURE SELON LE DEGRÉ DE SÉVÉRITE (conformément à l'annexe de l'arrêté relatif à l'autorisation de projet) **:**

classe légère
classe modérée
classe sévère
classe sans réveil

- Description détaillée de la procédure expérimentale :

- ¥ - Pertinence et justification de la procédure expérimentale :
- ¥ - Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lots, et les justifier :
- ¥ - Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés :
- ¥ - Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médications - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires…en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :
- ¥ - Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :
- ¥ - Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :
- ¥ - Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

- Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :

- Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale :

- ¥ ○ mise à mort ?

précisez les animaux concernés :

- ¥ ○ animal gardé en vie ?

précisez les animaux concernés et si la décision a été prise par le vétérinaire ou toute autre personne compétente désignée par le responsable du projet :

- ¥ ○ placement ou mise en liberté des animaux ?

précisez les animaux concernés :

4.3. Si le projet utilise des animaux réutilisés d'un projet antérieur :

- GRAVITÉ RÉELLE DES PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES ANTÉRIEURES :

légère
modérée
sévère

Précisez les éléments scientifiques justifiant la demande de dérogation pour autant que les animaux n'aient pas été utilisés plus d'une fois dans une procédure expérimentale entrainant une douleur intense, de l'angoisse ou une souffrance équivalente :

- Effet cumulatif de cette réutilisation sur les animaux :

- L'avis vétérinaire est-il favorable en prenant en considération le sort de l'animal concerné sur toute sa durée de vie ? **oui** **non**

- L'animal réutilisé a-t-il pleinement recouvré son état de santé et de bien-être général ? **oui** **non**

4.4. Cas particulier des projets contenant une procédure expérimentale impliquant

une douleur, une angoisse ou une souffrance sévère et susceptible de se prolonger sans qu'il soit possible de les soulager

- ¥ - De quelle(s) procédure(s) expérimentale(s) du projet s'agit-il ?

- ¥ - Justifiez scientifiquement les raisons à l'origine d'une demande de dérogation :

Biophysical properties of cardiomyocytes surface explored by multiparametric AFM

*Manuscript

Biophysical properties of cardiomyocyte surface explored by multiparametric AFM

Georgiy Smolyakov[a,b,e], Marie Cauquil[c,e] , Childerick Severac[a], Véronique Lachaize[a,b,c,e] , Céline Guilbeau-Frugier[c,d,e], Jean-Michel Sénard[c,e], Céline Galés[a,c,e*], Etienne Dague[a,b,e*].

[a]ITAV, Université de Toulouse, CNRS, France

[b]LAAS-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, France

[c]Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, INSERM UMR1048, Université de Toulouse, France

[d]Centre de Microscopie Électronique Appliquée à la Biologie, Université de Toulouse, France

[e]Service de Pharmacologie, CHU de Toulouse, Université de Toulouse, Toulouse, France

*These authors contributed equally to this work and are corresponding authors.

Corresponding author 1: Dr Etienne Dague

Address: LAAS-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, France ,
7 av du Colonel Roche
31000 TOULOUSE, FRANCE

Phone: +33 5 61 33 78 41

Email: edague@laas.fr

Corresponding author 2: Dr Céline Galés

Address: INSERM UMR1048
Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires - I2MC
1, avenue Jean-Poulhès - BP84225
31432 Toulouse cedex 4
France

Phone: +33 5 61 32 40 81

Email: celine.gales@inserm.fr

ABSTRACT

PeakForce Quantitative Nanomechanical Mapping (PeakForce QNM) multiparametric AFM mode was adapted to qualitative and quantitative study of the lateral membrane of cardiomyocytes (CMs), extending this powerful mode to the study of soft cells. On living CM, PeakForce QNM depicted the crests and hollows periodic alternation of cell surface architecture previously described using AFM Force Volume (FV) mode. PeakForce QNM analysis provided better resolution in terms of pixel number compared to FV mode and reduced acquisition time, thus limiting the consequences of spontaneous living adult CM dedifferentiation once isolated from the cardiac tissue. PeakForce QNM mode on fixed CMs clearly visualized subsarcolemmal mitochondria (SSM) and their loss following formamide treatment, concomitant with the interfibrillar mitochondria climbing up and forming heaps at the cell surface. Interestingly, formamide-promoted SSM loss allowed visualization of the sarcomeric apparatus ultrastructure below the plasma membrane. High PeakForce QNM resolution led to better contrasted mechanical maps than FV mode and provided correlation between adhesion, dissipation, mechanical and topographical maps. Modified hydrophobic AFM tip enhanced contrast on adhesion and dissipation maps and suggested that CM surface crests and hollows exhibit distinct chemical properties. Finally, two-dimensional Fast Fourier Transform to objectively quantify AFM maps allowed characterization of periodicity of both sarcomeric Z-line and M-band. Overall, this study validated PeakForce QNM as a valuable and innovative mode for the exploration of living and fixed CMs. In the future, it could be applied to depict cell membrane architectural, mechanical and chemical defects as well as sarcomeric abnormalities associated with cardiac diseases.

1. Introduction

Atomic force microscopy (AFM) (Binnig et al., 1982; Binnig and Quate, 1986) is a powerful tool for nanoscale research in biology (Muller et al., 2009; Dufrêne et al., 2008; Cross et al., 2007; Liu and Wang, 2010; Pillet et al., 2014). Since the development of the Force Volume (FV) AFM mode in 1994 (Radmacher et al., 1994), it became possible to obtain the force curves related to the interaction between the AFM tip and the sample surface with a spatial resolution. In this particular mode, the tip approaches the surface, comes in contact and presses until a predefined force, called peak force, is reached. Then, the tip is retracted and moves to the next position. The force curves thus measured allow extracting the topography, as well as the mechanical and adhesive properties of the sample (Fig. 1A). Hence, classical AFM analysis gives access to both structural and mechanical information from the same force curves (Formosa et al., 2012a; Formosa et al., 2012b).

Recently, multiparametric AFM modes were developed (Hu et al., 2011; Alsteens et al., 2012; Dufrêne et al., 2013; Martín-Rodríguez et al., 2014; Formosa et al., 2015; Chopinet et al., 2013 ; Smolyakov et al., 2016). In these modes, the tip pathway is modified, allowing faster acquisition of force curves (Fig. 1B) and sample imaging with high resolution ($\geq 128^2$ pixels^2) in reasonable time scale (5-10 min) (Fig. 1C). This is not the case in the FV mode, due to a negative relationship between resolution level and acquisition time because of the low tip oscillation frequency. In the PeakForce QNM multiparametric mode developed by Bruker Corporation, the scanning parameters can be adjusted according to that each pixel value and data represent an average over several force curves whereas in the FV, each pixel value relates to only one force curve. Nevertheless, today, experience of PeakForce QNM for analysis of soft mammalian cells remains rather limited relying essentially on two reasons. First, the oscillation amplitude of the cantilever in this mode (currently up to 4 µm) remains lower compared to the FV (7.5 µm) thus potentially leading to incomplete tip retraction on very soft and adhesive cells. Second, the very high frequency of tip oscillations ($\geq$250 Hz) may result in viscoelastic effects (Costa, 2003; Guilak, 2000; Huang et al., 2004) and in mechanical behaviour not consistent with that observed with FV mode in quasi-static conditions (Smolyakov et al., 2016). It follows that the adaptation of PeakForce QNM for mammalian cells analysis still remains challenging (Slade et al., 2014; Hozic et al., 2012; Heu et al., 2012; Calzado-Martín et al., in press).

Adult cardiomyocytes (CMs), the contractile cellular entity of the heart, are highly differentiated mammalian cells measuring around 100-150 µm in length and 10-20 µm in width and exhibiting a typical rod-shape (Leu et al., 2011). Once isolated from the cardiac tissue, these non proliferative cells are highly unstable and quite fragile, thus requiring specific culture medium conditions and accurate temperature and CO_2 controlled atmosphere to stabilize their structure and viability over time. However, even in suitable culture conditions, CMs tend to spontaneously and quite rapidly dedifferentiate, thus loosing progressively their rod-shape (time scale range from minutes to several

hours) (Dague et al., 2014). Moreover, CMs are relatively soft (elastic modulus < 20 kPa) and highly adhesive to the AFM tip, susceptible to mechanical stress, and often contracting under mechanical or light stress even in the presence of contraction inhibitors. These characteristics make CMs challenging cells for AFM study requiring optimization of both the resolution and the acquisition time of AFM experiments. It is therefore not surprising that high resolution analysis of the living CMs surface using AFM is quite rare. Only few studies were performed on living CMs but they were not performed under controlled atmosphere and did not take into account cell dedifferentiation time following isolation (Lieber 2004, Benech 2014, Benech 2015). Despite these studies provided information about the global changes of CM elasticity, they did not inform about the topographic organization of the cell surface neither its accurate elasticity correlation.

The present study follows a previous work from our group (Dague et al., 2014) in which we used AFM FV mode to explore the topography and elasticity of the cell surface (lateral membrane) of living adult CMs and their potential modifications in heart failure following myocardial infarction in mice. This study revealed an extremely organized structure of CMs cell surface with periodic alternation of stiff crests linked to the presence of subsarcolemmal mitochondria (SSM) and soft hollows. Interestingly, shortly after infarction, CMs loose SSM resulting in cell surface smoothing and decreased elastic modulus. At long-term stage, interfibrillar mitochondria (IFM) migrate towards the surface, creating heaps and underlying general increase of the elastic modulus.

In the present work, we adapted for the first time the PeakForce QNM mode to both living and fixed adult CMs to study the topography and the mechanical properties of their lateral membrane. The living CMs are among the softest cells ever explored quantitatively by the PeakForce QNM and their fixation by chemical agents increases their relative stiffness but also stabilizes CMs morphology immediately after purification thus preventing cells from dedifferentiation, and allowing AFM measurements under non restrictive atmosphere/temperature conditions. The use of PeakForce QNM led to a significant decrease of the acquisition time, as well as to increased resolution in terms of pixels number and in terms of statistical significance of every pixel of the CMs surface maps. Moreover, both the adhesion and dissipation maps of the CM cell surface with well-defined contrast, not accessible in the FV mode due to its low resolution and tip oscillation frequency, could be further delineated by PeakForce QNM. The adhesion map represents the chemical surface contrast, while the dissipation map contrast may be considered as combination of chemical and viscous contributions. The use of modified hydrophobic tips (Dague et al., 2007; Dague et al., 2008; Alsteens et al., 2007) increased the contrast for the adhesion and dissipation maps, allowing us to depict very accurate structures of the CM surface, as well as to determine its relative chemical character. We also proposed in this study to use a two-dimensional Fast Fourier Transform (FFT) (Cooley and Tukey, 1965) to analyze the periodicity of the surface structures of the CM from the different maps. Finally, we used PeakForce QNM mode on fixed CMs to study alterations of the cell surface structure induced by

formamide treatment that we previously demonstrated to phenocopy those observed following infarction (Dague et al, 2014). Taken as a whole, our study indicates that the PeakForce QNM provides many advantages for the study of CMs structural, mechanical and adhesive properties.

2. Materials and methods

2.1. CMs isolation (Figure 2)

Adult CMs were isolated from 2-month old C57/Bl6 mice as previously described using the Langendorff method (Dague et al., 2014) (Fig. 2A). After isolation, living CMs were plated on laminin-coated glass Petri dishes at 37° C in 5 % CO_2 atmosphere in resuspension solution containing 10% bovine calf serum, 12.5 µM $CaCl_2$ and 10 mM BDM (2,3-butanedione monoxime) in order to inhibit spontaneous cell beating.

For the study of living CMs, the resuspension medium was then changed to MEM culture medium containing 1 % penicillin-streptomycin-glutamine, 4 mM $NaHCO_3$, 10 mM Hepes, 0.2 % BSA and 25 µM blebbistatin. The Petri dish was transferred to the AFM microscope and cells were subjected to the AFM experiment in a controlled chamber at 37° C in 5 % CO_2 atmosphere.

For the study of fixed CMs, after plating, cells were washed twice in the resuspension medium and fixed in ice-cold methanol for 10 minutes. Fixed CMs were further subjected to AFM experiment at ambient atmosphere.

2.3. Formamide treatment of CMs

CMs were submitted to formamide-induced osmotic shock in order to induce mitochondrial shift as previously described (Dague et al, 2014). Briefly, after isolation and plating, CMs were incubated in resuspension solution (See *2.1*) containing 0.25 M (low concentration) or 0.75 M (high concentration) formamide for 10 minutes at 37°C in 5 % CO_2 atmosphere. The cells were then washed with resuspension solution and fixed with ice-cold methanol for 10 minutes. Fixed CMs were washed with PBS and maintained in PBS until AFM analysis.

2.4. Conditions of AFM experiments

The AFM study was performed on the Bioscope Catalyst (Bruker Corporation). The choice of scanning parameters was the major step to adapt the PeakForce QNM for the soft and adhesive living CMs. In order to ensure complete tip withdrawal and to minimize viscoelastic effects, the maximum oscillation amplitude (4 µm) and the minimum frequency (250 Hz) were respectively applied. The applied peak force (1 nN) was chosen to detect a mechanical contrast between different structural elements but avoiding the high adhesion and incomplete tip retraction. The images resolution was 128^2 pixels^2, the scan size was 10^2 µm^2. As for the line rate, it can vary between 0.2-0.5 Hz, depending on the cell state, which influences the adhesion between tip and surface. The comparative FV

measurements were conducted using the same amplitude, peak force and scan size as for the PeakForce QNM analysis, but the tip frequency was 6 Hz and resolution was 64^2 pixels^2. The same PeakForce QNM parameters adapted for the living CMs were used to analyze fixed CMS. In these fixed cells, the line rate was kept constant (0.5 Hz) as the scanning is more stable compared to the living CMs.

2.5. AFM cantilevers

Two different cantilevers were used for living CMs. First, the MLCT-C cantilever with the nominal spring constant of 10 mN/m. The spring constant was systematically measured by means of the thermal tune (Emerson and Camesano, 2006). The nominal radius of the corresponding non modified tip was 20 nm. Second, for the hydrophobic interaction measurements (Dague et al., 2007; Dague et al., 2008; Alsteens et al., 2007) the NPG-10-D cantilever was applied, with the nominal spring constant of 60 mN/m and the nominal tip radius of 30 nm. In order to provide the hydrophobic character for this gold-coated NPG-10-D cantilever, the latter was immersed for 14 h in 1 mM $HS(CH_2)_{11}CH_3$ (Sigma-Aldrich) in ethanol, then rinsed with ethanol and dried with nitrogen. As fixed CMs are stiffer compared to the living ones, only the NPG-10-D cantilevers were used in this case.

2.6. Analysis of AFM data

As noted above, in the case of living CMs, the deformation was much larger compared to the tips radius. Thus, the Sneddon model for conical contact was applied in order to estimate the elastic modulus (Sneddon, 1965). The Sneddon model links the sample deformation d to the applied force F via the elastic modulus E and the tip half-angle α values: $F = 2/\pi*E/(1 - v^2)*tan\alpha*d^2$, with α equal to 17.5^o and v being the sample Poisson ration, arbitrary taken as 0.5.

For the fixed CMs, the deformation was around 100 nm and the nominal diameter of NPG-10-D tips is equal to 60 nm, being further slightly increased due to the thiol layer grafted to the tip surface, making the Sneddon model no longer valid. Thus, the Derjaguin-Muller-Toporov (DMT) model for the spherical tip-surface contact was applied (Derjaguin et al., 1975; Muller et al., 1983). This model links d to F via E and tip radius R values, by taking into account adhesion force F_{adh} as a contribution to the effective force: $F = 4/3*E/(1 - v^2)*R^{1/2}*d^{3/2} + F_{adh}$. To account for the adhesion, the retract force curve is fitted by this model.

The force curves in PeakForce QNM experiment were analyzed online, while in the FV measurements the curves were collected and then treated by SPIP software with the correction stage consisted in the noise reduction and the base line adjust.

In order to decompose the harmonic components of AFM signal, the Gwyddion software was used for image analysis by means of two-dimensional Fast Fourier Transform (2D-FFT) applied to series of data of arbitrary dimensions without resampling. Data are expressed as spectral modulus corresponding to the square root of the power spectrum density. Filtering was applied to exclude potential linear asymmetry and Hann windowing function was used to suppress the data at the edges of the image.

2.7. Transmission Electron Microscopy

Heart tissue samples were fixed with 2% glutaraldehyde in Sorensen's buffer and proceeded as described in Genet *et al* (Genet et al., Circ Res 2012).

2.8. Statistical analysis

Results are depicted as mean ± S.E.M. of 8-12 CMs from 3 mice performed on 3 different experiments. Comparisons were achieved using one-way ANOVA when appropriate. A P value < 0.05 was considered as significant.

3. Results and Discussion

3.1. PeakForce QNM versus FV analysis of living CMs

As discussed in subchapter 2.5., two different cantilevers (MLCT-C and NPG-10-D) were applied in this study. The use of modified NPG-10-D cantilever, due to the different surface character of the tip, only changed adhesion and dissipation compared to the MLCT-C cantilever. Both cantilevers possess the spring constant in an appropriate range (the cantilever deflection and the sample deformation are of the same order of magnitude). In its turn the tip radius in both cases is negligible with respect to the deformation (~700 nm). Thus, both MLCT-C and modified NPG-10-D tips gave approximately the same results (with a difference below the AFM measurements error) for the topography and elastic modulus. The latter was calculated from the approach curve, thus minimizing the adhesion effect.

Representative results of the PeakForce QNM on a living CM are shown in Fig. 3. The hydrophobic tip was used for these experiments in order to increase the contrast for the adhesion and dissipation. The acquisition time for a PeakForce QNM measurement was about 5-7 min for 10^2 μm^2 scan size with 128^2 $pixels^2$ resolution, while it was equal to 10 min in the FV for the same scan size, but with lower, 64^2 $pixels^2$ resolution. As shown in Fig. 3B, the PeakForce QNM force curves preserve indentation region for height measurements, mechanical or adhesion characteristics. At the same time, the non contact part of the curves is far away from flat. This could potentially be related to the viscosity of the aqueous medium inducing at very high speed of piezo displacement virtual repulsive forces while approaching and virtual attracting forces while retracting. Thus, the viscous medium may lead to the cantilever deflection during its fast oscillation. This hypothesis could explain as well the fact that the approach step takes longer times compared to the retraction one, and this is related only to the non contact part of the curves. When the tip and surface are in contact, the approach and withdraw parts of the curves become symmetrical with respect to the time. Indeed, according to this hypothesis, once reaching the contact point (the tip is fixed on a surface), this medium effect should decrease, if not disappear.

As shown, the PeakForce QNM provided a high structural contrast in terms of cell surface topography (Fig. 3C), as well as of elasticity (Sneddon elastic modulus, Fig. 3D), adhesion (Fig. 3E) and dissipation (Fig. 3F) when compared to the FV mode conducted in similar conditions on the same CM (Fig. 4). For the topography, despite the high resolution of PeakForce QNM, the sharpness of the image is not perfect, and a number of artefacts are present. Indeed, as the tip oscillates very quickly in this mode, a precise contact point determination on such soft CM's samples is rather complicated. On the contrary, the elasticity map displays very good quality without pixel artefact (Fig. 3D) and a better contrast between different structural elements of the surface compared to the FV mode used in this

study (Fig. 4D). The average Sneddon elastic modulus for the whole 10^2 µm^2 scanned area was 5.8 ± 2.8 kPa (5 cells; 3 mice). This is quite different from the study by Dague *et al* (Dague et al., 2014), in which the authors stated an average modulus for the living CM of 16.7 ± 7.1 kPa following similar CM preparation. These discrepancies between the two studies most probably arise from different scanning conditions (applied force and tip oscillation frequency), elastic model as well as the cell state that can highly fluctuate due to natural dedifferentiation of the living adult CMs as stated above.

Interestingly, adhesion force and the dissipation energy maps could be obtained with well-defined contrast by PeakForce QNM (Fig. 3E, F). These images were subjected to the "Flatten" correction for better visualisation of the contrast. As shown in Fig. 3G, a good correlation could be observed between adhesion, dissipation, elasticity and topography maps.

FV analysis was carried out on living CMs (Fig. 4) using the same oscillation amplitude and peak force as well as the same hydrophobic tip like for the PeakForce QNM scanning. The same cell surface area of the CM was probed using the two modes (Fig. 3 and Fig. 4). The results indicate that FV analysis resulted in topography maps with well-defined periodic structures (Fig. 4C). The Sneddon elastic modulus map displayed small contrast but a clear correlation with the height map (Fig. 4D). However, compared to the PeakForce QNM, the adhesion and dissipation demonstrated no contrast between structural elements (Fig. 4E, F) most probably due to the very poor statistical significance of each pixel (based on one force curve) in the FV, as well as low tip oscillation frequency.

3.2. PeakForce QNM analysis of fixed CMs: examination of formamide-induced cell surface architectural defects.

Once validated PeakForce QNM in adult living CMs at resting state, this mode was applied for its potential to explore their architectural cell surface defects that can be found in pathological conditions. Specifically, we decided to use chemical treatment with formamide that was previously validated to reproduce the loss of cell surface crests and hollows and the mitochondrial shift observed in CMs following myocardial infarction (Dague et al 2014). To prevent any cell surface mitochondrial defects due to the living cell natural dedifferentiation or stringency of heart digestion, fixed CMs were used for the AFM investigation. Depending on the formamide concentration, differential impact on the CM structural surface can be achieved as previously shown (Dague et al., 2014). Relatively low formamide concentration (0.25 M) promoted the SSM death, leading to the CM surface smoothing. At higher concentration (0.75 M), formamide led to further alteration of the interior of the cell with the IFM migration towards the surface resulting in heaps formation. Fig. 5 displays comparative PeakForce QNM study of fixed control CMs exposed or not to different formamide concentrations. In non formamide-treated fixed CMs (control) (Fig. 5A), regular crests periodicity structured by SSM (Fig.

5Aa), as well as a nice correlation between structure and mechanical properties were observed (Fig. 5Ae). Crests are always stiffer and less adhesive compared to the hollows. Some of the cells exhibit crests height up to 800 nm, which is in agreement with the transmission electron microscopy images (Dague et al., 2014). Excellent resolution of PeakForce QNM allows visualizing directly (Fig. 5A) that the crests in the fixed control CMs are formed by under-membrane rounded structures in agreement with the presence of mitochondria. Imprinting of these rounded mitochondria can also be very well deduced from adhesion and dissipation maps (Fig. 5Ac, d), Indeed, the hollows are more adhesive with respect to the crests, indicating different chemical properties of the cell membrane between crests and hollows. On one hand, as expected, the adhesion and the dissipation are correlated, since adhesion largely contributes to dissipation. On the other hand, the contrast is better for the dissipation compared to the adhesion. The last observation could be explained by the contribution of the viscoelastic response to dissipation, as well as adhesion does. The energy loss due to the viscous behaviour should be higher for the softer zones (hollows) compared to the harder ones (crests), which are more elastic (being harder in the same time). Thus, the differences in terms of adhesion, as well as in terms of viscoelastic behaviour, going in the same direction, provide high contrast for the dissipation. As the hollows on CMs surface are more adhesive with respect to the hydrophobic tip compared to the crests, it indicates that hollows are more hydrophobic.

It is quite puzzling that overall PeakForce QNM analysis of adult living CMs (Fig. 3) differs from similar analysis but on fixed CMs (Fig. 5A). The most evident difference is the presence of mitochondria imprinting visualized on the dissipation map obtained from fixed cells (Fig. 5Ad) that is completely absent from the same analysis on living cells. Moreover, clear differences in crest heights between fixed and living CMs could also be noticed with higher measurements in fixed cells, consistent with the presence of mitochondria as described in (Dague et al., 2014). Overall, these results most likely argue for the dedifferentiation process of the living CMs that lead to the natural loss of crest and associated SSM.

In Fig. 5Ba (topography), cell surface smoothing due to the loss of SSM was observed, thus confirming the action of low formamide concentration treatment. More interestingly, it was possible in all AFM maps (Fig. 5B) to distinguish subsarcolemmal myofibrills as well as periodic sarcomeric organization along longitudinal myofibrils. It is interesting to notice that these maps are highly similar to those obtained with living CMs (Fig. 3), thus confirming the dedifferentiation process with loss of cell surface crests and SSM. Following high formamide concentration treatment (Fig. 5Ca), heaps could be observed confirming the migration and the superimposition of IFM beneath cell surface that we previously described (Dague et al, 2014). Despite relatively low oscillation amplitude in PeakForce QNM (compared to the FV mode), large heaps with heights up to 1.4 µm were easily scanned without any image artefacts. Moreover, the elastic modulus appeared one order of magnitude higher for the fixed cells compared to the living ones. In particular, we measured an average elastic modulus on the

whole map of 108±9 kPa for control cells, 69 ± 6 kPa for low formamide concentration treatment in agreement with the SSM death, and 118 ± 16 kPa for high formamide concentration treatment ($P < 0.05$ control vs low concentration, $P < 0.05$ low concentration vs high concentration) confirming the cell surface accumulation of IFM heaps. Although the absolute modulus values are largely increased for fixed cells, their relative variations upon formamide treatment are relatively preserved as described for the living CMs (Dague et al., 2014).

3.3. Dissipation energy allows depicting ultrastructural components of the contractile myofibrills

As noticed above, an advantage of the use of PeakForce QNM for the analysis of the CM cell surface was to provide enough contrast for the adhesion and dissipation maps, which are together correlated (with better contrast for the dissipation). Surprisingly, under exposure to low formamide concentration leading to the CM surface smoothing, these dissipation maps (as well as the adhesion ones) gave access to accurate details of the sarcomere structure on the bottom of the membrane that FV mode was unable to depict (Fig. 6A). Indeed, from traces on the dissipation maps (Fig. 6A), periodically spaced (~2 µm) "camel" double-crests structures were identified. This ~2 µm space is in agreement with the size of the sarcomere (contractile entity of the myofibrills) measured using transmission electron micrographs (Fig. 6B). On this image, the sarcomeric structure is delimited by two Z-lines (~1.5-2 µm) with the M-band localized in the middle (~1 µm size) which probably corresponds to the medium hollow on the traces from dissipation maps. This result indicates that the chemical properties of the Z-line and the M-band are quite distinct. Each myofibrill is composed of a succession of sarcomeres thus alternating successively Z-lines and M-bands as most probably observed on the dissipation traces. When the surface of the CM was scanned at smaller scale so to more accurately visualize structural details, the height map (Fig. 6Cb) resulting from a 2.2^2 μm^2 zoom allowed identifying the presence of the contractile myofibrils-forming myofilaments. Up to now, such CM ultra-structures could only be visualized using electron microscopy resolution. The presence of myofilaments is even more clearly observed on the PeakForce error map (Fig.6Cc) which corresponds to the deviation of the real peak force from the requested one. This deviation is very sensitive to the mechanical behaviour of the sample, and although it cannot be directly interpreted in terms of sample properties, it often provides excellent structural contrast.

3.4. Periodicity of the sarcomere structure analysed by Fast Fourier Transform

Two-dimensional Fast Fourier Transform (2D-FFT) was used to analyse the periodicity of CM sarcomere on SSM-depleted CM obtained following low formamide concentration treatment on fixed CMs (Fig. 7). The FFT allows exploring the whole AFM images, providing frequency, periodicity as well as spectral modulus of CM membrane events on different PeakForce QNM maps. As shown on the Fig. 7, the AFM image (in the real space) (left panels) is transformed to the corresponding 2D-FFT image (the invert space) (middle panels). This latter displayed correlations between structural elements that were further traced in order to compute the corresponding characteristic lengths (Fig. 7, right panels). The graph of the corresponding trace is symmetrical with respect to a central peak and contains a number of correlation peaks to the left or to the right of the central reference peak.

Simultaneous analysis of QNM PeakForce maps and of corresponding 2D-FFT clearly indicates that, whatever the AFM map considered, spectral peaks are separated by a constant periodic distance (Fig. 7). From correlation with AFM maps, the *d* distance corresponds to the spacing between neighbour peaks. Intermediate peaks are separated by a distance equal to 2*d* (2.04 ± 0.04 µm) in agreement with the sarcomere size (Fig. 6B) delimited by two Z-lines, while the location of the M-band in between of two Z-lines is responsible for the *d* distance correlation (1.02 ± 0.02 µm). The intensity of the correlation peak may be considered as a measure of the image contrast, while the intensity of the alternation peak over the correlation peak (degree of alternation) ratio is related to the contrast between signals from Z-line and M-band. Concerning the height image (Fig. 7A), the correlation peak is rather small, as the quality of the height images is relatively low in the PeakForce QNM analysis. The alternation peak is present as well, indicating that a higher peak is followed by a smaller one. As for the DMT elastic modulus, the correlation between neighbour peaks is defined better compared to the height image. This demonstrates that PeakForce QNM provides better contrast for the elastic modulus compared to the topography map. The alternation peak is much less intense compared to the main correlation one. It means that Z-line and M-band regions exhibit approximately the same modulus despite different height. The alternation between Z-lines and M-bands was better defined on the adhesion map (Fig. 7C), while on the dissipation map this alternation profile is in between those for the elasticity and the adhesion maps. This was expected since both mechanical and adhesive behaviours contribute to the dissipation, as discussed above. Moreover, all 2D-FFT maps provided exactly the same *d* distance between peaks (Z-line and M-band) (1.02 ± 0.02 µm). Thus, Z-lines and M-bands are the most distinguishable in terms of adhesion, less in terms of height and display almost similar elastic behaviour. This discrimination between adhesion and elastic modulus is important to prove that observed differences in adhesion on CM surface are specific and not simply related to different surface deformation and consequently to contact area between the tip and cell

surface. So, it appears that the adhesion contrast is not the simple reflection of the elastic contrast, but has its own specific origin.

In conclusion, it follows that the FFT provides a fast and powerful tool for quantitative analysis of the periodicity of the sarcomere Z-band and M-band on smooth SSM-depleted CMs from height, mechanical and adhesion/dissipation AFM-based images.

4. Conclusion

The novel multiparametric PeakForce QNM AFM mode was adapted for the CMs study and further used to investigate changes in CM surface architecture induced by formamide and mimicking those observed after myocardial ischemia (Dague et al, 2014). Thus, we succeeded to extend the limits of this powerful mode to the quantitative study of softer cells.

On one hand, the use of PeakForce QNM for CMs provided higher resolution in terms of the pixels, as well as of statistical significance of every pixel with respect to the classical FV mode. On the other hand, the acquisition time in PeakForce QNM was dramatically decreased compared to the FV, which is extremely important for living CMs due to their rapid spontaneous dedifferentiation after isolation from the cardiac tissue.

PeakForce QNM was successfully used on fixed cells to follow the cell surface mitochondrial shift induced by a chemical agent. In these conditions, this AFM mode provided a highly resolutive tool to visualize ultrastructural (nanometer scale) components of the sarcomeric apparatus. Up to now, such structures could be only appreciated using transmission electron microscopy.

The use of PeakForce QNM resulted in higher contrast for the elastic modulus with respect to FV. More interestingly, the PeakForce QNM gave access to the adhesion and dissipation maps with well-defined contrast allowing observation of the most accurate details of the CM structure. In particular this analysis allowed us to clearly visualize SSM cell surface imprinting. These mitochondria were only described up to now from deduction of AFM height and elasticity data in combination with electron imaging. We showed that SSM/crests are less hydrophobic compared to the hollows. Moreover, dissipation maps in the absence of cell surface SSM depicted the periodic alternation of Z-lines and M-bands composing the sarcomeric contractile apparatus. The adhesion maps identified different biochemical properties of the cell surface located at the Z-line or the M-band while the differences were smaller in terms of cell surface height and almost absent in terms of elastic modulus.

The FFT is proposed as a fast and accurate tool for the objective analysis of a whole AFM image, providing quantitative analysis of the periodicity between different structural components of the sarcomeric apparatus, *i.e.* the Z-line and the M-band. In the future, such analysis could be useful to accurately depict sarcomeric defects in cardiac diseases.

Finally, the PeakForce QNM proved that fixed CMs were better suited for preservation of the native and pathological cell surface structures.

Overall, our study shows that PeakForce QNM is an innovative tool for the AFM study of CMs that could be extended for the analysis of specific cell surface defects associated with heart diseases.

Acknowledgements

This work was supported by the “Fondation pour la Recherche Médicale” (G.S.; grant ING21040129094) and Fondation Bettencourt Schueller (C.G.; Coup d'Elan pour la recherche Française 2013). ED is researcher at the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and CG is researcher at Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)

References

Alsteens, D., Dague, E., Rouxhet, P.G., Baulard, A.R., Dufrêne Y.F., 2007. Direct measurement of hydrophobic forces on cell surfaces using AFM. Langmuir 23, 11977-11979.

Alsteens, D., Dupres, V., Yunus, S., Latgé, J.-P., Heinisch, J.J., Dufrêne, Y.F., 2012. High-Resolution Imaging of Chemical and Biological Sites on Living Cells Using Peak Force Tapping Atomic Force Microscopy. Langmuir 28, n° 49, 16738-16744.

Benech, J.C., Benech, N., Zambrana, A.I., Rauschert, I., Bervejillo, V., Oddone, N., Damián, J.P., 2014. Diabetes increases stiffness of live cardiomyocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation. Am J Physiol - Cell Physiol 307, 910-919.

Benech, J.C., Benech, N., Zambrana, A.I., Rauschert, I., Bervejillo, V., Oddone, N., Alberro, A., Damián, J.P., 2015. Intrinsic nanomechanical changes in live diabetic cardiomyocytes. Cardiovascular Regenerative Medicine 2, e893.

Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C., Weibel, E., 1982. Tunneling through a controllable vacuum gap. Appl. Phys. Lett. 40, 178–180.

Binnig, G., Quate, C.F., 1986. Atomic force microscope. Phys. rev. lett. 56, 930–933.

Calzado-Martín, A., Encinar, M., Tamayo, J., Calleja, M., San Paulo, A., 2016. Effect of actin organization on the stiffness of living breast cancer cells revealed by peak-force modulation atomic force microscopy. ACSnano, in press.

Chopinet, L., Formosa, C., Rols, M.P., Duval, R.E., Dague, E., 2013. Imaging living cells surface and quantifying its properties at high resolution using AFM in QI™ mode. Micron 48, 26-33.

Cooley, J.W., Tukey, J.W., 1965. An algorithm for the machine calculation of complex Fourier series. Math. Comput. 19, 297–301.

Costa, K.D., 2003. Single-cell elastography: probing for disease with the atomic force microscope. Disease Markers 19, 139–154.

Cross, S.E., Jin, Y.-S., Rao, J., Gimzewski, J.K, 2007. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. Nat. Nanotechnol. 2, 780–783.

Dague, E., Alsteens, D., Latgé, J.-P., Verbelen, C., Raze, D., Baulard, A.R., Dufrêne Y.F., 2007. Chemical force microscopy of single live cells. Nano Lett. 7, n° 10, 3026-3030.

Dague, E., Alsteens, D., Latgé, J.-P., Dufrêne Y.F., 2008. High-resolution cell surface dynamics of germination aspergillus fumigatus conidia. Biophysical Journal 94 (2), 656–660.

Dague, E., Genet, G., Lachaize, V., Guilbeau-Frugier, C., Fauconnier, J., Mias, C., Payré, B., Chopinet, L., Alsteens, D., Kasas, S., Severac, C., Thireau, J., Heymes, C., Honton B.,, Lacampagne, A., Pathak, A., Sénard, J.-M., Galés, C., 2014. Atomic force and electron microscopic-based study of sarcolemmal surface of living cardiomyocytes unveils unexpected mitochondrial shift in heart failure. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 74, 162–172.

Derjaguin, B.V., Muller, V.M., Toporov, Y.P., 1975. Effect of contact deformations on the adhesion of particles. Journal of Colloid and Interface Science 53(2), 314-326.

Dokukin M., Sokolov I., 2015. High-resolution high-speed dynamic mechanical spectroscopy of cells and other soft materials with the help of atomic force microscopy. Scientific Reports 5, 12630.

Dufrêne, Y.F., Muller, D.J., 2008. Atomic Force Microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology. Nat. Nanotechnol. 3, 261–269.

Dufrêne, Y.F., Martínez-Martín, D., Medalsy, I., Alsteens, D., Müller, D.J., 2013. Multiparametric imaging of biological systems by force-distance curve-based AFM. Nat. Methods 10, n° 9, 847-854.

Emerson, R.J., Camesano, T.A., 2006. On the importance of precise calibration techniques for an atomic force microscope. Ultramicroscopy 106, 413–422.

Formosa, C., Grare, M., Duval, R.E., Dague, E, 2012a. Nanoscale effects of antibiotics on P. aeruginosa. Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med. 8, 12–16.

Formosa, C., Grare, M., Jauvert, E., Coutable, A., Regnouf-de-Vains, J.B., Mourer, M., Duval, R.E., Dague, E., 2012b. Nanoscale analysis of the effects of antibiotics and CX1 on a Pseudomonas aeruginosa multidrug-resistant strain. Scientific Reports 2, 575-583.

Formosa, C., Schiavone, M., Boisrame, A., Richard, M.L., Duval, R.E., Dague, E.. 2015. Multiparametric imaging of adhesive nanodomains at the surface of Candida albicans by atomic force microscopy. Nanomedicine 11(1), 57-65.

Genet, G., Guilbeau-Frugier, C., Honton, B., Dague, E., Schneider, M.D., Coatrieux, C., Calise, D., Cardin, C., Nieto, C., Payré, B., Dubroca, C., Marck, P., Heymes, C., Dubrac, A., Arvanitis, D., Despas, F., Altié, M.F., Seguelas, M.H., Delisle, M.B., Davy, A., Sénard, J.M., Pathak, A., Galés, C., 2012. Ephrin-B1 is a novel specific component of the lateral membrane of the cardiomyocyte and is essential for the stability of cardiac tissue architecture cohesion. Circ Res. 110(5), 688-700.

Guilak, F., 2000. The deformation behavior and viscoelastic properties of chondrocytes in articular cartilage. Biorheology 37, 27–44.

Heu, C., Berquand, A., Elie-Caille, C., Nicod, L., 2012. Glyphosate-induced stiffening of HaCaT keratinocytes, a Peak Force Tapping study on living cells. J Struct Biol. 178 (1), 1-7.

Hilal-Dandan, R., Kanter, J.R., Brunton, L.L., 2000. Characterization of G-protein signaling in ventricular myocytes from the adult mouse heart: differences from the rat. J Mol Cell Cardiol. 32, 1211-1221.

Hozic, A., Rico, F., Colom, A., Buzhynskyy, N., Scheuring, S., 2012. Nanomechanical characterization of the stiffness of eye lens cells a pilot study. Investigative Ophthalmology & Visual Science 53, n° 4, 2151-2156.

Hu, Y., Hu, S., Su, C., Shi, J., Ma, J., 2011. US Patent: US2011/0167524 A1.

Huang, H., Kamm, R.D., Lee, R.T., 2004. Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology. American Journal of Physiology—Cell Physiology 287, C1–C11.

Jacot, J.G., Martin, J.C., Hunt, D.L., 2010. Mechanobiology of cardiomyocyte development. J Biomech 43, 93–98.

Lachaize, V., Formosa, C., Smolyakov, G., Guilbeau-Frugier, C., Galés, C., Dague, E., 2015. Atomic force microscopy: an innovative technology to explore cardiomyocyte cell surface in cardiac physio/pathophysiology. Letters in Applied NanoBioScience 4 (4), 321-334.

Leu, M., Ehler, E., Perriard, J.C., 2011. Characterisation of postnatal growth of the murine heart . Anat. Embryol. 204, n° 3, 217-224.

Lieber, S.C., Aubry, N., Pain, J., Diaz, G., Kim, S.J., Vatner, S.F., 2004. Aging increases stiffness of cardiac myocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation. Am J Physiol Heart Circ Physiol 287, H645–651.

Liu, S., Wang, Y., 2010. Application of AFM in microbiology: a review. Scanning 32, 61–73.

Martín-Rodríguez, A.J., González-Orive, A., Hernández-Creus, A., Morales, A., Dorta-Guerra, R., Norte, M., Martín, V.S., Fernández, J.J., 2014. On the influence of the culture conditions in bacterial antifouling bioassays and biofilm properties: Shewanella algae, a case study. BMC Microbiology 14, 102-115.

Muller, D.J., Helenius, J., Alsteens, D., Dufrene, Y.F, 2009. Force probing surfaces of living cells to molecular resolution. Nat. Chem. Biol. 5, 383–390.

Muller, V.M., Derjaguin, B.V., Toporov, Y.P., 1983. On two methods of calculation of the force of sticking of an elastic sphere to a rigid plane. Colloids and Surfaces 7(3), 251-259.

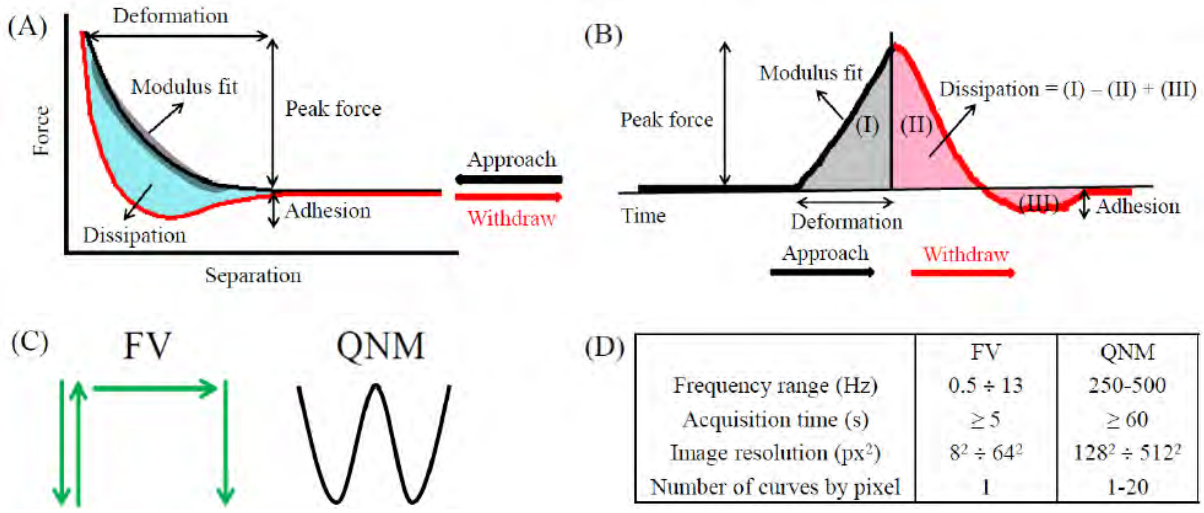
Pillet, F., Chopinet, L., Formosa, C., Dague, E., 2014. Atomic Force Microscopy and pharmacology: from microbiology to cancerology. Biochim Biophys Acta 1840 (3), 1028-1050.

Radmacher, M., Cleveland, J.P., Fritz, M., Hansma, H.G., Hansma, P.K, 1994. Mapping interaction forces with the atomic force microscope. Biophysical Journal 66, 2159–2165.

Slade, A., Pittenger, B., Milani, P., Boudaoud, A., Hamant, O., Kioschis, P., Ponce, L.M., Hafner, M, 2014. Investigating cell mechanics with atomic force microscopy. Microscopy and Analysis 28 (3), S6-S9.

Smolyakov, G., Formosa-Dague, C., Severac, C., Duval, R.E., Dague, E., 2016. High speed indentation measures by FV, QI and QNM introduce a new understanding of bionanomechanical experiments. Micron 85, 8-14.

Sneddon, I.N., 1965. The Relation between Load and Penetration in the Axisymmetric Boussinesq Problem for a Punch of Arbitrary Profile. Int. J. Eng. Sci. 3, 47–57.



(D)

	FV	QNM
Frequency range (Hz)	0.5 ÷ 13	250-500
Acquisition time (s)	≥ 5	≥ 60
Image resolution (px^2)	$8^2 \div 64^2$	$128^2 \div 512^2$
Number of curves by pixel	1	1-20

Fig. 1. Force curves used to calculate the mechanical and adhesive properties: in representations force *vs.* separation (A) and force *vs.* time (B); schema of the tip pathway in the FV and PeakForce QNM modes (C); comparative table for the two modes (D).

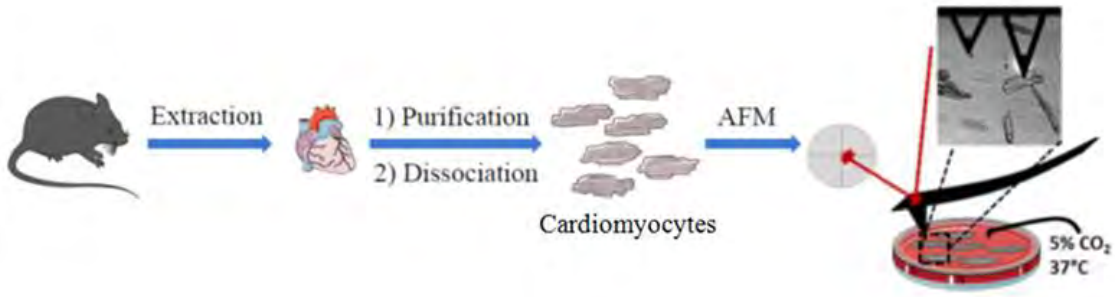


Fig. 2. Schematic representation of the preparation of living CMs for AFM measurements.

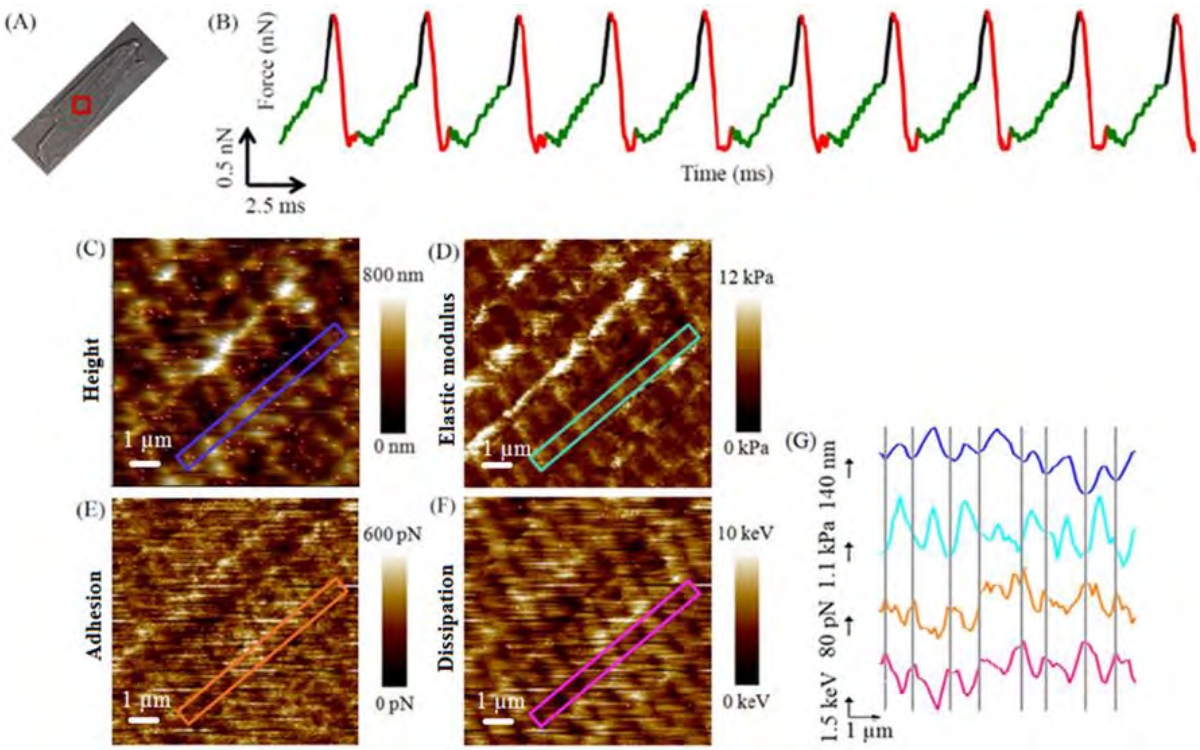


Fig. 3. PeakForce QNM analysis of a living cardiomyocyte surface using the hydrophobic tip. CM optical image indicating the AFM scanned area (red) (A); force curves in the force *vs.* time representation with the approach contact part in black, the withdraw contact part in red and the noncontact part in green (B); representative maps (128^2 pixels^2 resolution) of 3D height (C), Sneddon elastic modulus (D), adhesion (E) and dissipation (F) obtained from the scanned area shown on the optical image in (A); correlation between the height (blue), Sneddon elastic modulus (cyan), adhesion (orange) and dissipation (rose) traces along the boxes shown on the corresponding maps (G).

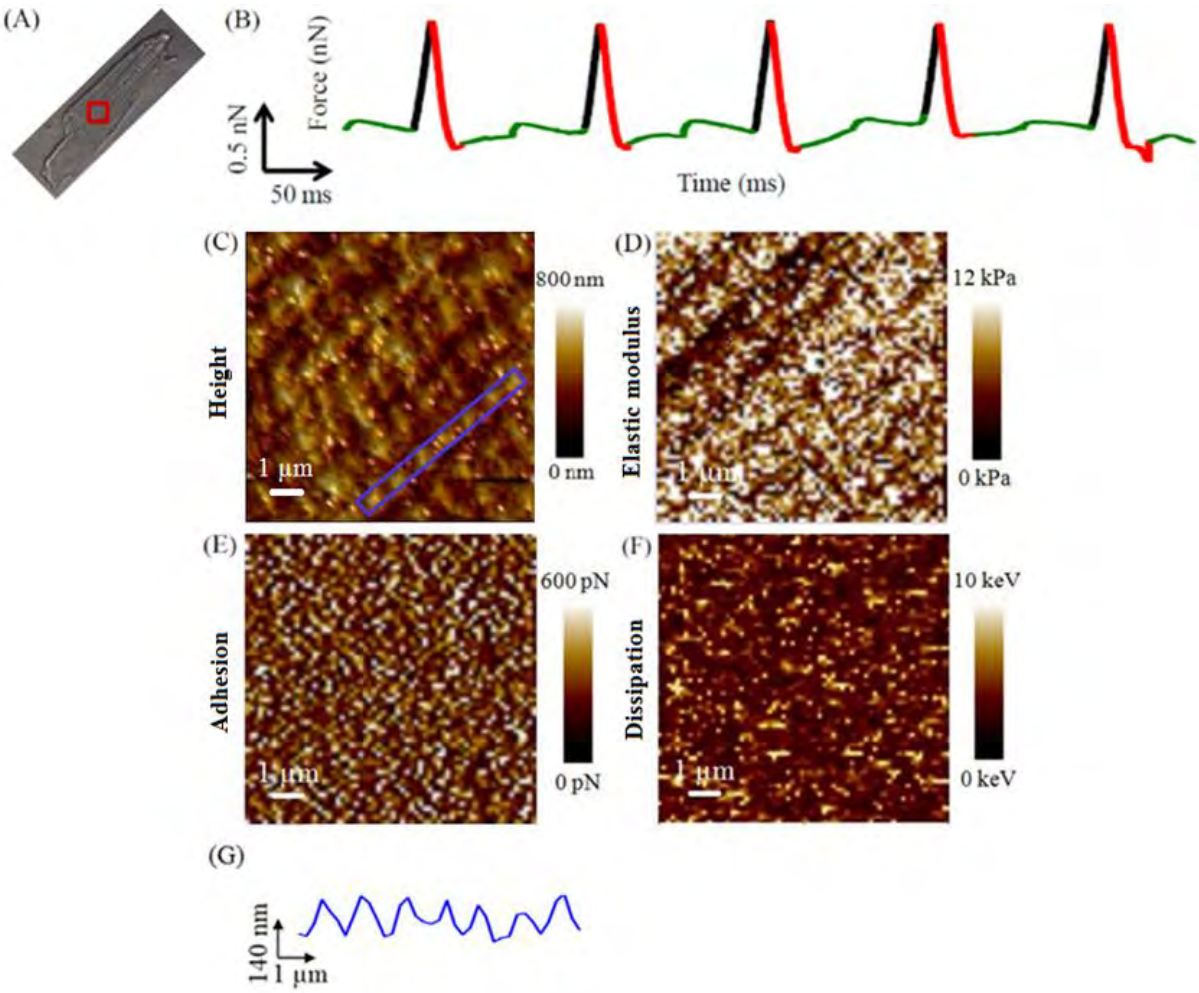


Fig. 4. FV analysis of a living cardiomyocyte surface using the hydrophobic tip. CM optical image indicating the AFM scanned area (red) (A); force curves in the force *vs.* time representation with the approach contact part in black, the withdraw contact part in red and the noncontact part in green (B); representative maps (64^2 pixels^2 resolution) of 3D height (C), Sneddon elastic modulus (D), adhesion (E) and dissipation (F) obtained from the scanned area shown on the optical image (A) and trace along the box shown on the height map (G).

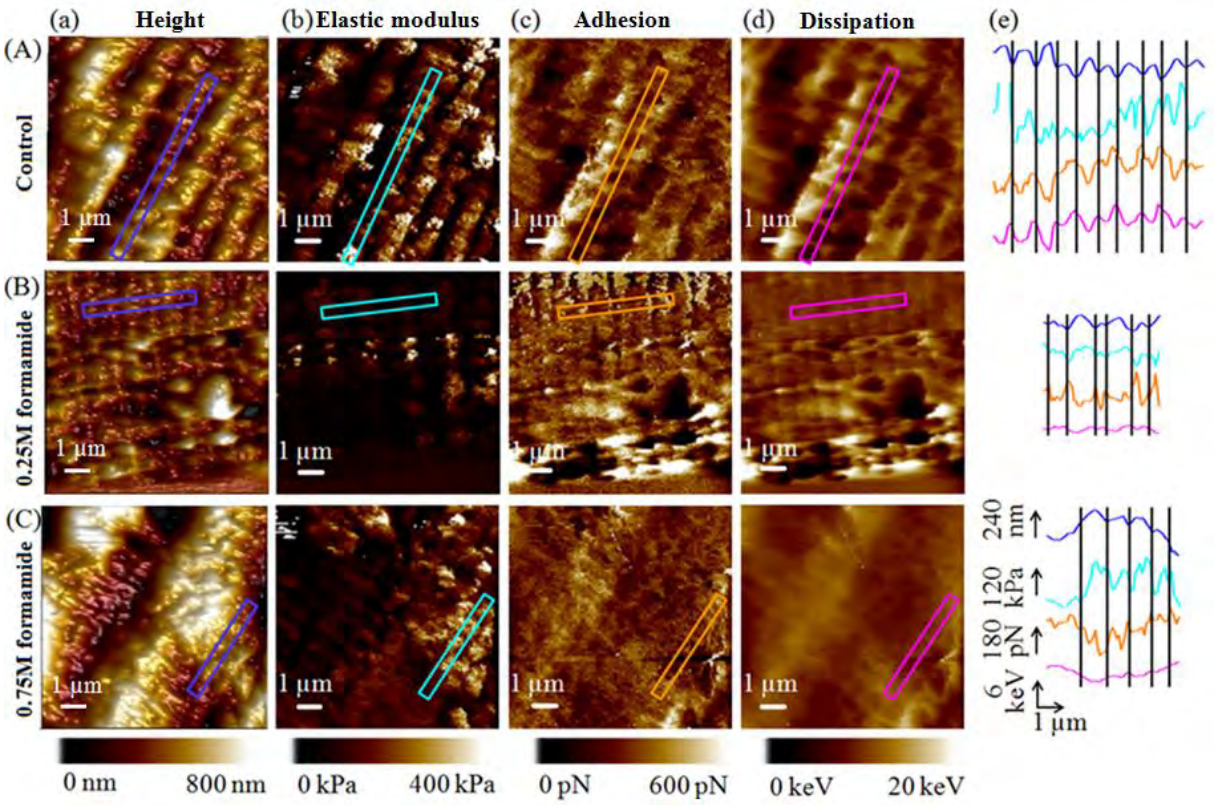


Fig. 5. PeakForce QNM on fixed cardiomyocyte surface using the hydrophobic tip. Control CM (A), CM pretreated with 0.25M (B) and 0.75M (C) formamide. In each case, maps (128^2 pixels^2 resolution) of the 3D height (a), DMT elastic modulus (b), adhesion (c) and dissipation (d) are shown, as well as correlation between the height (blue), DMT elastic modulus (cyan), adhesion (orange) and dissipation (rose) along the boxes shown on the corresponding maps (e)

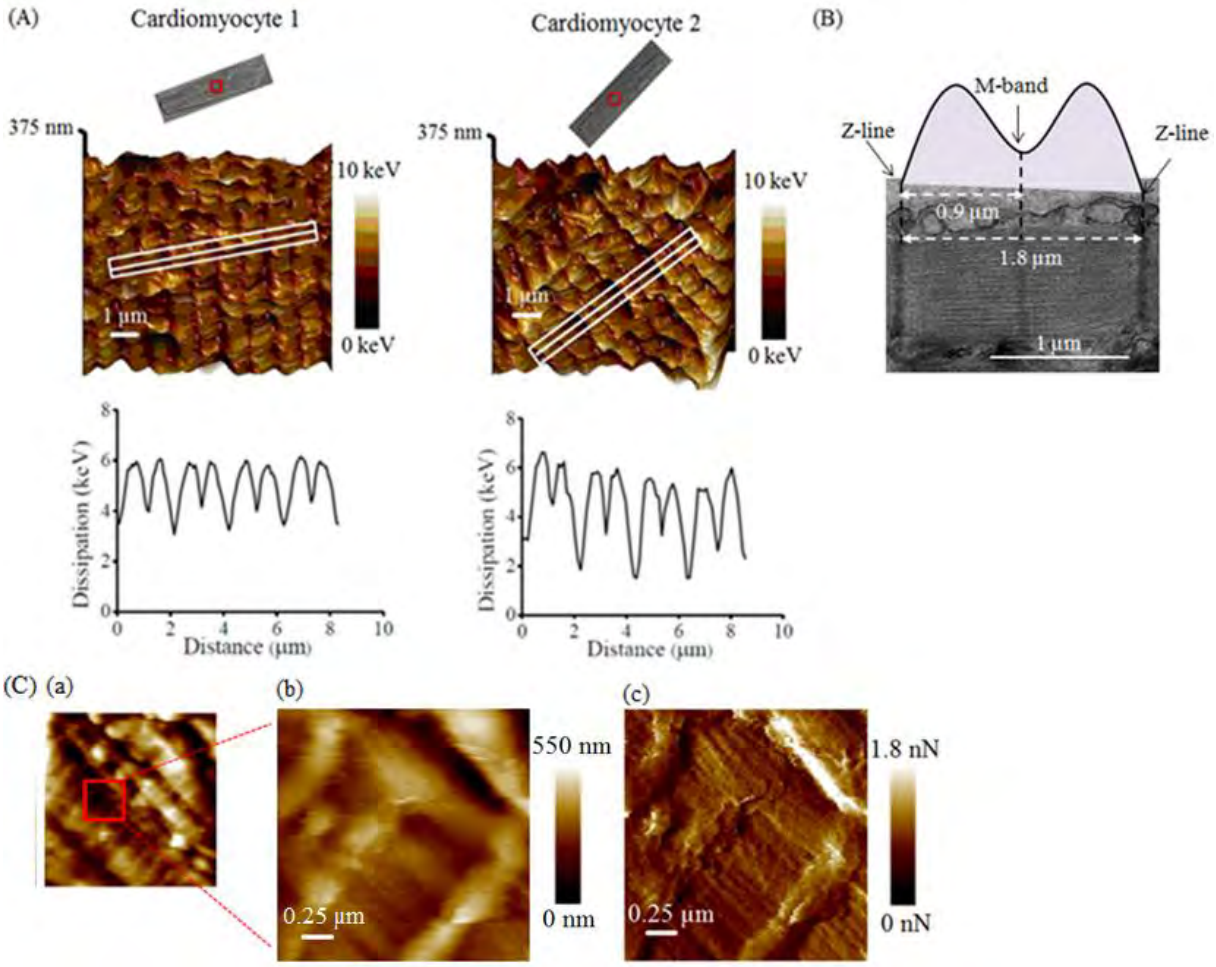


Fig. 6. PeakForce QNM analysis of cardiomyocyte ultrastructures. Dissipation maps (colour) superimposed with 3D height maps (relief) (done as shown by red squares on the CMs optical images) with corresponding traces (done as shown on the maps) obtained for two different fixed CMs and pretreated with 0.25M formamide (A); schematic superimposition of a dissipitation map illustrating the camel structure and an electron microscopy micrograph illustrating the CM sarcomeric structure (B); representative height map (10^2 µm^2) (Ca) and its 2.2^2 µm^2 zoom (Cb) and PeakForce error (Cc). All maps were obtained by PeakForce QNM using hydrophobic tip with a 128^2 pixels^2 resolution.

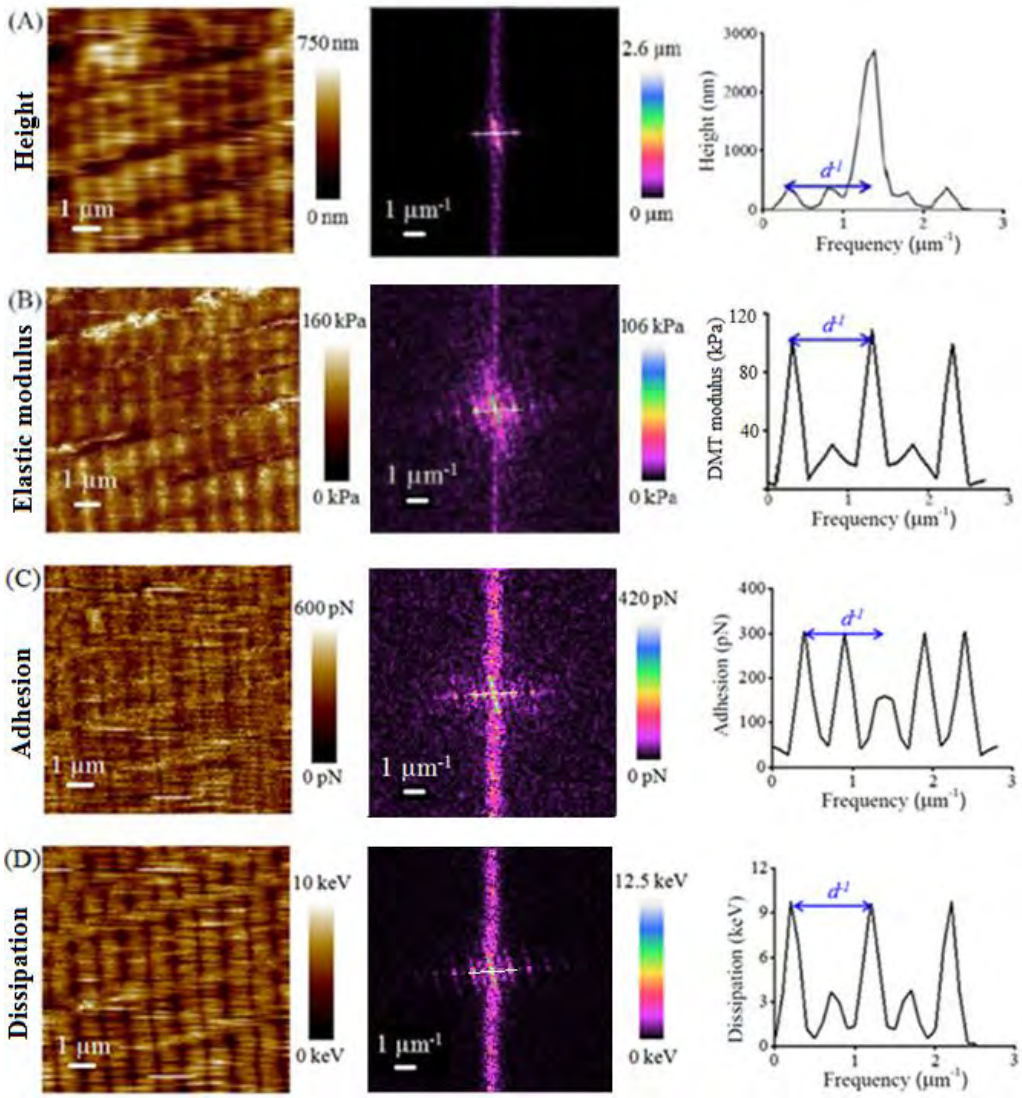


Fig. 7. PeakForce QNM cartography (128^2 pixels^2 resolution) using the hydrophobic tip. For each mechanical map obtained on a fixed CM pretreated with 0.25M formamide, the corresponding two-dimensional Fast Fourier Transform (2D-FFT) images and derived traces are shown. Height (A), DMT elastic modulus (B) , adhesion (C) and dissipation (D) maps. The calculated distance between peaks is d = 1.00 µm.

Propriétés biophysiques des cardiomyocytes en conditions physio/physiopathologique et architecture des récepteurs couplés aux protéines G explorées par microscopie à force atomique

L'insuffisance cardiaque est un réel problème de santé publique avec 1 millions de patients souffrant de cette pathologie cette année en France. Elle est définie incapacité de fournir un débit sanguin suffisant à l'organisme. Cette diminution de débit est traduite par la perte de fonction contractile du cœur provoqué par la nécrose des cellules responsable de cette fonction : les cardiomyocytes. Dans cette étude j'ai pu étudier les modifications topographiques et biomécaniques de la membrane du cardiomyocyte vivant en amont de sa rupture lors de la nécrose, par une technologie issue des nanosciences : la microscopie à force atomique (AFM). Mes travaux ont fait apparaitre une membrane très structurée chez le cardiomyocyte sain et une perte de cette architecture dans un temps précoce de l'installation de l'insuffisance cardiaque. L'utilisation de la microscopie électronique à transmission à montrer que les anomalies mises en évidences par AFM ont pour origine un réarrangement mitochondriale. Dans une seconde étude je me suis intéressée à l'organisation oligomérique d'une famille particulière de récepteur transmembranaire, les récepteurs couplés aux protéines G. Ces protéines sont une des cibles privilégiées pour les traitements pharmacologiques de l'insuffisance cardiaque tel que le bêta-bloquants et les vasodilatateurs. Ce mécanisme d'oligomérisation pourrait être la clef des effets secondaires liés à ces traitements. Afin d'étudier la conformation oligomérique, j'ai utilisé la spectroscopie de force à l'échelle de la molécule unique pour mettre en évidence différentes populations oligomérique de ces récepteurs sur la surface membranaire. Les résultats ont montré une distribution des populations oligomériques en fonction des conditions (densité de plasmide codants pour les récepteurs/stimulation avec agoniste synthétique ou naturel). Il est possible qu'il y ait une régulation des voies de signalisations par l'oligomérisation des récepteurs activés. La différence d'activité possible de chaque population oligomérique (monomère/dimère/tétramère/hexamère) semble être une explication plausible aux effets secondaire des agents pharmacologique. Mes travaux de thèse ont permis la mise en évidence de nouvelle piste par une technologie innovante, la microscopie à force atomique, dans le traitement de l'insuffisance cardiaque.

Insuffisance cardiaque / microscopie à force atomique / cardiomyocyte / RCPG / oligomérisation / spectroscopie de force à l'échelle de la molécule unique.

Biophysical properties of cardiomyocytes in physio / physiopathological conditions and of G-protein coupled receptors architecture explored by atomic force microscopy

Heart failure is a public health problem with 1 million patients this year in France. This pathology is defined inability to heart pump sufficiently to maintain blood flow to meet the body's needs. This decrease is explicated by the loss of contractile function of the heart, caused by the necrosis of the contractile cells: cardiomyocytes. In this study, I was able to study the topographic and biomechanical modification of the cardiomyocyte membrane upstream of its rupture during necrosis, by technology derived from nanosciences : atomic force microscopy (AFM). My work reveals a highly structured membrane in healthy cardiomyocytes and a loss of this architecture in an early stage of the heart failure installation. In a second study I was interested in the oligomeric organization of a transmembrane receptors family , G protein-coupled receptors. These proteins are a privileged target for the pharmacological treatments on heart failure such as beta- Blockers and vasodilators. This oligomerization mechanism could be the key to the side effects associated with treatments. In order to study the oligomeric conformation, I used single molecule force spectroscopy and I reveal different oligomeric populations of these receptors on the membrane. The results showed a oligomeric populations distribution according the conditions (plasmid density coding for receptors / stimulation with synthetic or natural agonist). It is possible that there is a regulation of the signaling pathways, using the oligomerization for specific activation receptors. The possible difference in activity of each oligomeric population (monomer / dimer / tetramer / hexamer) appears to be a plausible explanation for the side effects of pharmacological agents. My thesis work allowed the discovery of a new track by an innovative technology, atomic force microscopy, in the treatment of heart failure.

Heart failure / atomic force microscopy / cardiomyocyte / GPCR / oligomerization / single molecule force spectroscopy

UNIVERSITÉ TOULOUSE III PAUL SABATIER
Université de Toulouse