



**HAL**  
open science

# La plasticité de la chromatine oriente le destin des cellules saines et des cellules cancéreuses sur des matrices de faibles rigidités

Florence Flick

► **To cite this version:**

Florence Flick. La plasticité de la chromatine oriente le destin des cellules saines et des cellules cancéreuses sur des matrices de faibles rigidités. Biomatériaux. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT: 2016STRAE020 . tel-01468332

**HAL Id: tel-01468332**

**<https://theses.hal.science/tel-01468332v1>**

Submitted on 15 Feb 2017

**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.

*ÉCOLE DOCTORALE 182 PHYSIQUE & CHIMIE PHYSIQUE*

**INSERM U1121 « Biomatériaux & Bio-ingénierie »**

**THÈSE** présentée par

**Florence Flick**

soutenue le : **30 septembre 2016**

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

Discipline/ Spécialité : Chimie physique / Biomatériaux

**La plasticité de la chromatine oriente le destin des  
cellules saines et des cellules cancéreuses sur des  
matrices de faibles rigidités.**

**THÈSE dirigée par :**

**Monsieur Dominique VAUTIER**

Ingénieur de recherche, Université de Strasbourg

**Monsieur Youssef HAIKEL**

Professeur, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Madame Sophie GANGLOFF**

Professeur, Université de Reims Champagne Ardenne

**Monsieur Christophe EGLES**

Professeur, Université technologique de Compiègne

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Monsieur Guy LADAM**

Professeur, Université de Rouen

**Monsieur Jean-Noël FREUND**

Directeur de recherche, INSERM Unité 1113

*Science is fun. Science is curiosity. We all have natural curiosity. Science is a process of investigating. It's posing questions and coming up with a method. It's delving in.*

– Sally Ride –



# Remerciements

Lorsque j'ai débuté ma thèse il y a presque 3 ans, quelqu'un que j'estime énormément m'a dit : « Une thèse c'est comme l'ascension d'un haut sommet ». Près de 36 mois après, je ne peux qu'être d'accord avec cette comparaison.

L'ascension d'un haut sommet est une montagne russe d'émotions. Si les gens qui l'ont atteint ne partagent que la joie d'avoir réussi, personne ou presque ne partage ce qu'ils ont vécu lors de l'ascension. Si personne n'en parle, c'est que c'est principalement de la douleur, de la fatigue et des difficultés. L'ascension d'un haut sommet, malgré toute la préparation en amont, peut être difficile. Il y a des jours tellement nuageux qu'on ne voit plus le sommet ; des jours où l'on est dans l'incapacité d'avancer pour une raison ou une autre, des jours où l'on doit changer d'angle d'attaque et prendre une autre voie, des jours où la seule chose que l'on veut c'est abandonner. Mais il y a aussi des jours où l'on voit tout le chemin parcouru, des jours où l'on parvient à avancer, des jours où l'on a l'impression que tout est possible.

Ce voyage haut en couleurs et plein d'émotions n'aurait pas été possible sans la présence de nombreuses personnes. La première de ces personnes est le chef d'expédition, Dominique Vautier. En tant que personne très optimiste, cela n'a pas dû être facile tous les jours de travailler avec la pessimiste que je suis. Les mots ne sont pas assez puissants pour te remercier ; tu as fait de moi une personne bien plus optimiste et organisée que je l'étais auparavant. J'ai énormément appris à tes côtés. Ton inébranlable soutien m'a permis d'aller jusqu'au bout de ce projet de thèse. Vraiment Dominique, merci ! Et parce que derrière tout grand homme, il y a une famille, je voudrais remercier ton épouse Gertrud et tes enfants : Thérèse, Michel, Antoine, Jeanne, Clara et Matthias.

Je tiens également à remercier le co-directeur de l'expédition, Youssef Haikel pour les nombreuses discussions scientifiques, ses conseils avisés, son important soutien et plus particulièrement la confiance de la Faculté de Chirurgie Dentaire de l'Université de Strasbourg.

Parce que ce voyage n'aurait pas été possible sans le financement de la Faculté de la Chirurgie Dentaire de l'Université de Strasbourg, je tiens à remercier l'ensemble des membres de la Faculté et plus particulièrement, madame le Doyen, Corinne Taddéi.

Je voudrais également remercier les membres du jury : Sophie Gangloff, Guy Ladam, Christophe Egles et Jean-Noël Freund pour leur venue à Strasbourg et l'honneur qu'ils me font de juger le travail accompli.

Merci à Pierre Schaaf et Philippe Laval pour m'avoir fourni un espace de développement et le matériel nécessaire en m'accueillant au sein de l'unité INSERM U1121 « Biomatériaux et Bio ingénierie ». J'ai beaucoup appris à vos côtés et au fil de toutes les discussions et les échanges scientifiques que nous avons eus.

Parce que les ascensions se font généralement en cordée, je voudrais remercier plusieurs personnes qui m'ont accompagnée dans cette aventure. Je voudrais remercier Eric Mathieu pour tout le travail

de microscopie électronique, les discussions plus ou moins scientifiques, son temps et ses explications. Je voudrais également remercier Bernard Senger, véritable gentleman, maître en statistique, et colocataire de bureau, pour ces nombreux mois d'échanges et de conseils. Plus qu'un voisin de bureau, tu m'as permis de me dépasser et m'a toujours soutenue. J'ai adoré nos discussions scientifiques. Merci pour tout.

Je tiens à remercier Morgane Rabineau, l'experte en imagerie, pour tous ses conseils (que j'ai mis en pratique avec plus ou moins de succès), pour nos discussions et pour avoir partagé sa passion pour la microscopie.

Je souhaiterais également remercier Jean-Noël Freund pour les nombreux échanges que nous avons eus avec Dominique dans la salle de réunion du 7<sup>ème</sup> étage, vous avez apporté votre expertise en cancérologie et de précieux conseils. Merci également à Isabelle Duluc pour son accueil chaleureux au sein de l'unité INSERM 1113, ses explications, son temps ainsi que les expériences de transcriptome et *in vivo*.

Je remercie aussi l'ensemble des personnes de l'unité INSERM U1121 avec qui j'ai pu partager bien plus que quelques mots : Christine, Helena, Géraldine, Julien, Engin, Camille, Christiane, Fabienne... sans oublier la personne la plus passionnée par la science que j'ai pu rencontrer : Vincent.

Je tiens également à remercier toutes les personnes, famille et amis, qui m'ont sans cesse poussée à avancer, parfois un pas à la fois, parfois en me tirant jusqu'au prochain camp de base. Sans eux, il y a fort à parier que j'aurais peiné à passer chacune des étapes.

Les premiers, mes parents. Seul Dieu sait ô combien j'ai « râlé » en mon for intérieur à chaque fois que vous m'avez demandé comment se passait ma thèse. Je sais que ce voyage n'a pas été facile pour vous non plus et je vous remercie vraiment du fond du cœur pour tout le soutien que vous m'avez apporté même durant les moments difficiles. Je n'aurais pas pu souhaiter de meilleurs parents que vous.

Bien sûr je remercie aussi mes deux petits frères, Maxime et Antoine, pour leur soutien et les bons moments que nous avons partagés ensemble. Je n'oublie pas non plus ma sœur Gerry pour tout et plus particulièrement le soutien moral au cours de ce voyage.

A ma tante Janine, je voudrais te dire merci pour tous les conseils qui vont m'aider tout au long de ma vie, pour les échanges que nous avons eus et le soutien important que tu as exprimé durant ce voyage. Lire tes messages quotidiens directement envoyé du Canada me motivait énormément. Je remercie également ma cousine Marie-France qui a pris le temps de découvrir et relire ce manuscrit de thèse pour tous ses conseils et sa précieuse aide.

Plus particulièrement ma cousine Virginie, merci pour tout le soutien et les moments précieux que nous avons partagés tout au long de ces 3 dernières années. Une pensée spéciale aussi pour ma famille Philippine et plus particulièrement à Mama Lol, Ate Yang, Ate Aisha, Ate Delly, Ate Riza, Quezza, Ryzza Mae et Shelby ainsi que tous mes amis philippins que j'ai rencontrés lors de mon stage et qui ont cru en moi. Salamat Po !

Au seul et unique, à mon meilleur ami, Jide, je suis désolée, les mots me manquent et ne sont pas suffisamment forts pour exprimer à quel point je suis reconnaissante de t'avoir dans ma vie. Merci de t'être

tenu entre moi et le précipice quand j'en avais le plus besoin. Merci de m'avoir tirée et poussée durant ce voyage même si parfois ça a été à coup de pieds aux fesses. Merci aussi de m'avoir prouvé de Bruxelles à New York City, de Lagos à Buenos Aires, qu'en amitié la distance ne compte pas.

A AIESEC et ce réseau d'amis du monde entier qui, au fil des rencontres, sont devenus une seconde famille : Aida, Selaseh, Roland, Bio, Maoude, Sayouba, Francesca, Gweal, Niko, Jhoan, François, Juan, Gaurav, Archi, Mustafa, Nicho, Poncho, etc. et toutes les autres personnes que je ne peux citer faute de place...

Je souhaiterais également remercier certaines personnes qui ont fait beaucoup pour moi durant ce voyage, me poussant étape par étape : Yackolley, Aseel, Kweku, Abraham et Opas. Nos nombreuses discussions m'ont beaucoup inspirée et poussée à me dépasser chaque jour un peu plus. Merci également à Manu, JP, Langalakhe, Ricardo, Marcos, Abdo, Tharindu et Ayoola qui ont cru en moi et m'ont confiée des responsabilités me permettant de développer de nouvelles compétences qui se sont révélées bien utiles au cours de ma thèse.

Alfred, je n'imaginai pas devoir écrire ce paragraphe au passé. Je tiens à te remercier pour tous les moments passés ensemble, pour avoir cru en moi, pour avoir fait de moi une meilleure personne, pour m'avoir montré qu'aucun rêve n'est impossible à atteindre.

A mes amis depuis le lycée, Julie, Marion, Kévin et Fermin, ainsi qu'à mes amis rencontrés lors de mon parcours universitaire, Predrag, Zlatyo, Lydie, Monique, Marie et Alexis. Je peux enfin vous annoncer que je suis presque au bout, que je vais avec beaucoup d'espoirs, bientôt raccrocher mes crampons... du moins jusqu'au prochain sommet.

A mes compagnons d'ascension, Simon, Blaise, Thomas, Manon & Angela, la montée est rude, le chemin est difficile, vous allez le détester, vous allez échouer de temps en temps, pour paraphraser Thomas Edison, vous allez trouver des milliers de façons pour lesquelles cela ne marche pas, il y aura des jours où vous voudrez abandonner. Ne vous inquiétez pas, c'est totalement normal, toutes ces petites choses font partie du voyage.

Profitez de chaque partie du voyage et souvenez-vous d'une chose : ce n'est pas parce qu'on ne voit plus le sommet qu'il n'est plus là. Continuons à nous battre, à échouer, à répondre à des problèmes, à en créer d'autres, nous y sommes presque !

A toutes les personnes qui m'ont soutenue de près ou de loin durant ce long voyage,

Merci, Danke, Thank you, Gracias, 谢谢, Kiitos, Takk, Meda ase, jërëjëf!

# Résumé

L'objectif de cette thèse est d'étudier l'influence d'hydrogels de faibles rigidités sur l'organisation de la chromatine de cellules épithéliales Ptk2 et cancéreuses SW480. Sur des hydrogels mous, la chromatine de Ptk2 se structure en hétérochromatine tandis que les hydrogels très mous entraînent la mort des cellules par nécrose. Sur ces substrats, la chromatine, maintenue sous forme euchromatine par inhibition de HDAC, guide la cellule vers un état de quiescence. Ces cellules entrent en mitose lorsqu'elles sont transférées sur des surfaces rigides. Un processus de dissémination métastatique est développé *in vitro* en cultivant des cellules cancéreuses SW480 successivement sur des hydrogels très mous ( $E_{20}$ ) et des surfaces rigides (verre). Les cellules meurent massivement lors du 1<sup>er</sup> passage sur  $E_{20}$ . Après amplification sur verre, au 2<sup>ème</sup> passage sur  $E_{20}$ , leur survie, motilité et contenu en hétérochromatine augmentent. Au 3<sup>ème</sup> passage, la survie et la motilité progressent cependant le contenu en hétérochromatine diminue. Du 1<sup>er</sup> au 2<sup>ème</sup> passage, les cellules répondent à un processus de dissémination précoce « hétérochromatine-dépendant », du 3<sup>ème</sup> au 4<sup>ème</sup> passage à un processus tardif « euchromatine-dépendant ».

## Mots-clés

Mécano-biologie / Biomatériaux / Films multicouches de polyélectrolytes / Rigidité du substrat / Plasticité de la chromatine / Dissémination métastatique / Adhérence cellulaire.

# Abstract

The aim of this thesis is to investigate the influence of soft hydrogels on the chromatin plasticity of epithelial PtK2 and cancer SW480 cells. On soft hydrogels, the chromatin of PtK2 cells is organized in heterochromatin whereas very soft hydrogels direct the cell death by necrosis. On these substrates, the chromatin maintained in euchromatin by inhibition of HDAC guides the cells into quiescence. These cells transferred on stiff substrate enter in mitosis. An *in vitro* process of metastatic dissemination is developed from an SW480 cancer cells grown alternatively on very soft hydrogels ( $E_{20}$ ) and stiff surfaces (glass). On the 1<sup>st</sup> seeding on  $E_{20}$ , cells die massively. After the proliferation of the surviving cells on glass, the 2<sup>nd</sup> seeding on  $E_{20}$  shows that cell viability, motility and heterochromatin content increase. On the 3<sup>rd</sup> seeding on  $E_{20}$ , survival and motility continue to increase while the heterochromatin content decreases drastically. From the 1<sup>st</sup> to 2<sup>nd</sup>  $E_{20}$  seeding, cells respond to an early heterochromatin-dependent process of metastatic dissemination and from the 3<sup>rd</sup> to 4<sup>th</sup>  $E_{20}$  seeding to a late euchromatin-dependent process.

## Keywords

Mechanobiology / Biomaterials / Polyelectrolyte multilayers / Substrate stiffness / Chromatin plasticity / Metastatic dissemination / Cell adhesion.



# Contenu

<b>Remerciements</b> .....	<b>iii</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>vi</b>
<b>Mots-clés</b> .....	<b>vi</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>vii</b>
<b>Keywords</b> .....	<b>vii</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>xvii</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>xxix</b>
<b>Préambule</b> .....	<b>31</b>
<b>Chapitre 1 Introduction aux biomatériaux</b> .....	<b>35</b>
1.1 Les biomatériaux.....	35
1.1.1. Définition du terme « biomatériau ».....	35
1.1.2. Histoire et évolution des biomatériaux .....	36
1.2. L'environnement extracellulaire.....	38
1.2.1. La matrice extracellulaire .....	38
1.2.2. Propriétés physico-chimiques de la matrice extracellulaire .....	39
1.2.3. Organisation de la matrice extracellulaire .....	41
1.2.4. Rôles de la matrice extracellulaire .....	41
1.3. Les hydrogels, un outil de choix pour mimer la matrice extracellulaire.....	42
1.3.1. Mimer la matrice extracellulaire .....	42
1.3.2. Les hydrogels .....	43
1.3.3. Hydrogels naturels.....	45
1.3.4. Hydrogels synthétiques .....	46
1.4. Les films multicouches .....	47
1.4.1. Focus sur les films multicouches de polyélectrolytes.....	49

1.4.2.	Préparation des films multicouches de polyélectrolytes .....	49
1.4.3.	Modulation de la rigidité des films multicouches .....	50
1.5.	Spectroscopie de force et rigidité des films.....	52
1.5.1.	Nano-indentation par microscopie à force atomique AFM.....	53
1.5.2.	Mesure du module de Young .....	53
<b>Chapitre 2</b>	<b>Introduction à la mécano-biologie.....</b>	<b>55</b>
2.1	Introduction à la mécano-biologie.....	55
2.1.1	Physique et forces en biologie.....	55
2.1.2	Mécano-biologie.....	55
2.2	Réponses cellulaires à la rigidité du substrat.....	56
2.2.1	Adhérence & prolifération.....	56
2.2.2	Migration .....	58
2.2.3	Différentiation .....	59
2.2.4	Conclusion sur les effets de la rigidité du substrat sur le comportement cellulaire	60
2.3	Mécano-sensation & Mécano-transduction .....	61
2.3.1	Mécano-sensation .....	61
2.3.2	Mécano-transduction .....	63
2.4	Mécano-réponses .....	71
2.4.1	Noyau cellulaire .....	71
2.4.2	Mécano-transduction nucléaire .....	75
2.5	Cas particulier du cancer.....	76
2.5.1	Cancer .....	77
2.5.2	Métastase .....	79
2.5.3	Cancer colorectal .....	82
2.5.4	Cellule cancéreuse colorectale .....	85
2.5.5	Cancer et mécano-transduction .....	87
<b>Chapitre 3</b>	<b>Matériels et Méthodes .....</b>	<b>89</b>
3.1	Films multicouches de polyélectrolytes.....	89
3.1.1	Polyélectrolytes .....	89
3.1.2	Construction des films multicouches de polyélectrolytes.....	91
3.1.3	Modulation de l'élasticité des films multicouches de polyélectrolytes .....	92
3.1.4	Fonctionnalisation des films multicouches de polyélectrolytes.....	93

3.2	Biologie cellulaire .....	94
3.2.1	Modèles cellulaires utilisés.....	94
3.2.2	Culture cellulaire.....	95
3.2.3	Inhibition.....	97
3.3	Processus de sélection des cellules résistantes. ....	98
3.3.1	Protocole de sélection .....	98
3.3.2	Transfert des cellules.....	99
3.4	Comportement cellulaire .....	99
3.4.1	Viabilité cellulaire .....	100
3.4.2	Adhérence cellulaire .....	104
3.4.3	Migration cellulaire.....	107
3.5	Chromatine .....	110
3.5.1	Etat de la chromatine .....	110
3.5.2	Microscopie électronique à transmission.....	111
3.5.3	Quantification de l'hétérochromatine.....	114
3.6	Transcriptome .....	114
3.6.1	Extraction du transcriptome.....	115
3.7	Xéno-transplantation .....	117
3.7.1	Modèle de souris utilisé.....	118
3.7.2	Préparation des échantillons.....	119
3.7.3	Procédure d'injection intraveineuse dans la queue de la souris.....	119
3.7.4	Procédure de suivi des souris .....	120
<b>Chapitre 4</b>	<b>Influence de la rigidité du substrat sur l'organisation de la chromatine .....</b>	<b>121</b>
4.1	Introduction .....	121
4.2	Article.....	122
4.3	Résumé.....	135
4.4	Perspectives .....	135
<b>Chapitre 5</b>	<b>Organisation de la chromatine de cellules du cancer du côlon sur des matrices de faibles élasticités .....</b>	<b>137</b>
5.1	Introduction .....	137
5.2	Article <i>en préparation</i> .....	139
5.3	Résumé.....	161
5.4	Perspectives .....	162

<b>Chapitre 6</b>	<b>Influence de la force d'interaction substrat-ligand sur l'adhérence cellulaire ..</b>	<b>165</b>
6.1	Introduction .....	165
6.2	Article <i>en préparation</i> .....	166
6.3	Résultats préliminaires .....	187
<b>Chapitre 7</b>	<b>Conclusion et Perspectives .....</b>	<b>189</b>
<b>Bibliographie</b> .....		<b>191</b>
<b>Communications scientifiques</b> .....		<b>199</b>
	Communications orales.....	199
	Communications par affiche .....	199
<b>Publications scientifiques</b> .....		<b>201</b>

## Liste des abréviations

### Chapitre 1 Introduction aux biomatériaux

2D	Bidimensionnel
3D	Tridimensionnel
AFM	Microscopie à force atomique
CSPG	Protéoglycane à base de chondroïtine sulfate
E	Module de Young (module d'élasticité d'un matériau donné)
ECM	Matrice extracellulaire
EDC	1 éthyl-3-(3-diméthyl aminopropyl)
GAG	Glycosaminoglycane
HA	Acide hyaluronique
HSPG	Protéoglycane à base d'héparane-sulfate
LbL	Couche par couche
NHS	N-hydroxysuccinimide
Pa	Pascal (unité de mesure du module de Young)
PA	Polyacrylamide
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PEG	Poly (éthylène glycol)
PEM	Film multicouche de polyélectrolytes
PG	Protéoglycane
PGA	Acide polyglycolique
PolyHema	Poly-2-hydroxy-éthylméthacrylate
PMMA	Polyméthylméthacrylate
PVA	Alcool polyvinylique
RGD	Arginine-Glycine-Acide aspartique (motif de liaison cellulaire)
SAM	Monocouche auto-assemblée

### Chapitre 2 Introduction à la mécano-biologie

ADN	Acide désoxyribonucléique
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARN pol II	ARN polymérase II
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CSK	Cytosquelette
ECM	Matrice extracellulaire
F-actin	Filament d'actine
HAT	Histones acétylase transférases
HDAC	Histones déacétylases
HP1	Hétérochromatine protéine 1
IF	Filaments intermédiaires
KASH	Klarsich ANC-1 Syne Homology
LINC	Complexe de liaison du cytosquelette avec le nucléosquelette
MSC	Cellule souche mésenchymateuse
NPC	Complexe de pore nucléaire
MT	Microtubule
Pa	Pascal (unité de mesure du module de Young)
RGD	Arginine-Glycine-Acide aspartique (motif de liaison cellulaire)

SR	Spectrine
SUN	Sad1p UNC-84
TAZ	Transcriptional co-activator with PDZ binding motif
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TME	Transition mésenchymo-épithéliale
YAP	Yes associated protein

### Chapitre 3 Matériels et Méthodes

HA	Acide hyaluronique
AD	Adamantane
$E_{20}$	Substrat ayant un module d'élasticité d'environ 20 kPa
EDC	1 éthyl-3-(3-diméthyl aminopropyl)
EDC <sub>20</sub>	Solution à 20mg/mL d'EDC
EDC <sub>60</sub>	Solution à 60mg/mL d'EDC
EMEM	Eagle's minimum essential medium, milieu de culture cellulaire
FBSd	Sérum de veau fœtal décomplémenté
HCl	Acide chloridhydrique
IDPN	3,3'-imminodipropionitrile
Mal-(PEG) <sub>2</sub> -NHS	3-(2-(2-(3 Maleimidopropanamido) ethoxy) ethoxy) propanoic acid succinimidyl ester
NaCl	Chlorure de sodium
NHS	N-hydroxysuccinimide
PAH	Poly-(allylamine hydrochloride)
PBS	Tampon phosphate salin
PLL	Poly-L-lysine hydrobromide
PLL <sup>FITC</sup>	Poly-L-lysine couplé à un isothiocyanate de fluorescéine
polyCD	Polycyclodextrine
PSS	Poly-(sodium4-styrene sulfonate)
PSS <sup>RHO</sup>	Poly-(sodium4-styrene sulfonate) couplé à de la rhodamine
PtK2	Potorous tridactylus Kidney 2, cellules épithéliales rénales de Potoroo
RGD	Arginine-Glycine-Acide aspartique (motif de liaison cellulaire)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, milieu de culture cellulaire
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SW480	Cellules épithéliales d'adénocarcinome colorectal humain
Tris	Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
TSA	Trichostatine A

### Chapitre 4 Influence de la rigidité du substrat sur l'organisation de la chromatine

$E_0$	Film multicouche de polyélectrolytes ayant un module de Young de 0 kPa
$E_{20}$	Film multicouche de polyélectrolytes ayant un module de Young de 20 kPa
$E_{200}$	Film multicouche de polyélectrolytes ayant un module de Young de 200 kPa
$E_{50}$	Film multicouche de polyélectrolytes ayant un module de Young de 50 kPa
HDAC	Histones désacétylases
hnRNP1	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1
PtK2	<i>Potorous tridactylus</i> Kidney 2, cellules épithéliales rénales de Potoroo
TSA	Trichostatine A

## Chapitre 5 Organisation de la chromatine de cellules du cancer du côlon sur des matrices de faibles élasticités

CIT	Cellules initiatrices de tumeur
AFM	Microscopie à force atomique
$E_{20}$	Film multicouche de polyélectrolytes ayant un module de Young de 20 kPa
HAT	Histones acétyl-transférases
HDAC	Histones désacétylases
HRP	Horseradish peroxydase
SW480	Cellules épithéliales d'adénocarcinome colorectal humain
TAZ	Transcriptional co-activator with PDZ binding motif
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TSA	Trichostatine A
YAP	Yes associated protein

## Chapitre 6 Influence de la force d'interaction substrat-ligand sur l'adhérence cellulaire

4RGD	Raft 4RGD lié de manière covalente au substrat
AdRGD	Raft Adamantane PEG – RGD lié de manière non covalente au substrat
CD	Polycyclodextrine
ECM	Matrice extracellulaire
EDC	1 éthyl-3-(3-diméthyl aminopropyl)
EDC <sub>20</sub>	Solution à 20mg/ml d'EDC
EDC <sub>60</sub>	Solution à 60mg/ml d'EDC
NHS	N-hydroxysuccinimide
PtK2	<i>Potorous tridactylus</i> Kidney 2, cellules épithéliales rénales de Potoroo
RGD	Arginine-Glycine-Acide aspartique (motif de liaison cellulaire)

## Chapitre 7 Conclusion et Perspectives

$E_0$	Film multicouche de polyélectrolytes ayant un module de Young de 0 kPa
$E_{20}$	Film multicouche de polyélectrolytes ayant un module de Young de 20 kPa
$E_{200}$	Film multicouche de polyélectrolytes ayant un module de Young de 200 kPa
$E_{50}$	Film multicouche de polyélectrolytes ayant un module de Young de 50 kPa
PtK2	<i>Potorous tridactylus</i> Kidney 2, cellules épithéliales rénales de Potoroo
RGD	Arginine-Glycine-Acide aspartique (motif de liaison cellulaire)
SW480	Cellules épithéliales d'adénocarcinome colorectal humain



## Liste des figures

- Figure 0-1|Sélection de cellules tumorales par modulation des propriétés mécaniques du substrat.....**32
- Figure 0-2|Influence des forces d'interaction substrat-ligands sur l'adhésion cellulaire .....**33
- Figure 1-1|Evolution des biomatériaux.** Les biomatériaux classiques comme les biomatériaux métalliques utilisés pour des prothèses implantables de hanches avaient pour principal but d'être biocompatibles, voire plus généralement bioinertes, c'est-à-dire n'induisant aucune réaction biologique de la part de l'organisme hôte. Ces biomatériaux ont dans de nombreux cas été remplacés par des biomatériaux bioactifs qui ont pour but d'induire une réponse biologique contrôlée des tissus dans lesquels ils sont implantés. Ces matériaux ont peu à peu laissé place à des biomatériaux dégradables. En effet, les approches biologiques se concentrent plus sur la réparation des tissus endommagés que sur le remplacement. Dans ce but, de nouveaux biomatériaux mimant l'environnement cellulaire participent de manière active au processus de régénération des tissus endommagés en stimulant des réponses cellulaires spécifiques (Holzapfel, Reichert et al. 2013)..... 37
- Figure 1-2|Structure moléculaire de l'acide hyaluronique.** L'acide hyaluronique est constitué d'une répétition de deux sucres, d'acide D-glucuronique et du N-acetyl-D-glucosamine, reliés par des liaisons osidiques  $\beta$ -1,4 et  $\beta$ -1,3.(Kharkar, Kiick et al. 2013) ..... 40
- Figure 1-3|L'organisation de la matrice extracellulaire.** La matrice extracellulaire existe sous deux formes qui vont fortement influencer son rôle. La membrane basale est une organisation de la matrice extracellulaire permettant de faire barrière entre un épithélium et son stroma. Elle est principalement composée de collagène -IV, de laminines et de HSPGs. Adaptée de (Bonnans, Chou et al. 2014). ..... 41
- Figure 1-4|Les rôles de la matrice extracellulaire.** La matrice extracellulaire joue de nombreux rôles dans le développement et le maintien de l'homéostasie des tissus. Elle fonctionne comme un substrat permettant aux cellules d'adhérer, fournit une structure aux tissus, agit comme réservoir de facteurs de croissance et permet surtout de transmettre des signaux biochimiques et biophysiques aux cellules induisant des réponses spécifiques. (Rozario and DeSimone 2010)..... 42
- Figure 1-5|Rigidités des tissus biologiques.** La rigidité d'un matériau est caractérisée par son module élastique (ou module de Young) exprimé en Pa varie significativement selon les tissus et est directement liée à la fonction de ces derniers. Le corps humain est composé de tissus très mous comme le cerveau, des tissus plus rigides comme la peau, les muscles ou très durs comme les os (Cox and Epler 2011). ..... 43
- Figure 1-6|Les hydrogels, un outil de choix pour mimer l'ECM.** De nombreux hydrogels ont été développés ces 20 dernières années à partir de polymères naturels et synthétiques. Ils peuvent incorporer ou non des peptides. Ces hydrogels sont réticulés par réactions chimiques et physiques. Ils permettent le contrôle indépendant de

nombreuses propriétés des matrices extracellulaires telles que la rigidité ou la topographie en 2D comme en 3D (Kharkar, Kiick et al. 2013). ..... 44

**Figure 1-7|Rigidité des hydrogels développés en comparaison aux tissus biologiques.**

A. Les hydrogels synthétiques et naturels couvrent une élasticité comprise entre 100 Pa et 100 MPa. B. Les tissus d'un organisme ont des élasticités comprises entre 50 Pa à plusieurs Ga (Gribova, Crouzier et al. 2011). ..... 44

**Figure 1-8|Assemblage de films multicouches LbL.** Les films LbL peuvent être construits sur une variété importante de formes, de tailles et de porosité de substrats. Les multicouches sont formés de matériels synthétiques ou biologiques comme par exemples les polyélectrolytes (les films sont alors appelés films multicouches de polyélectrolytes), de protéines, de lipides, de nanoparticules etc. La construction des films se fait par le dépôt d'une première couche d'un matériel suivi par une seconde couche d'un autre matériel formant une bicouche de quelques nanomètres selon la nature des matériaux utilisés. Le processus est répété un certain nombre de fois jusqu'à l'obtention d'un film ayant l'épaisseur souhaitée (de quelques nanomètres à plusieurs micromètres). Figure adaptée de (Richardson, Björnmalm et al. 2015). ..... 48

**Figure 1-9|Principe de construction des LbL introduit par Decher.** En solution, la surface de nombreux matériaux est chargée négativement, principalement en raison de l'hydrolyse et de l'oxydation de surface. Cette charge négative va permettre des interactions électrostatiques avec un polymère chargé positivement pour former une première couche à la surface du matériau. Après rinçage, les polycations en surface vont réagir avec des polyanions afin de former une seconde couche. Le cycle se répète un certain nombre de fois jusqu'à l'obtention d'un film multicouche d'une épaisseur comprise entre quelques nanomètres et quelques microns. Figure adaptée de (Tang, Wang et al. 2006) ..... 49

**Figure 1-10|Principales méthodes de construction de films LbL.** De nombreuses méthodes de constructions des films LbL ont été développées ces 20 dernières années ; les plus utilisées sont les méthodes de construction par immersion (*dip coating*), centrifugation (*spin coating*), pulvérisation (*spray coating*), assemblage électromagnétique ou encore fluïdique (a.). Les films construits par centrifugation (*spin coating*) sont plus fins, mous et stratifiés que les films construits par immersion (*dip coating*) mais limités à des surfaces planes (b.). Adaptée de (Richardson, Björnmalm et al. 2015)..... 50

**Figure 1-11|Modulation de la rigidité par réaction EDC/NHS.** L'EDC ([1-éthyl-3-(3-diméthyl aminopropyl) carbodiimide]) permet la formation de liaison peptique entre l'acide hyaluronique et la poly-L-lysine. L'EDC active les groupes hydroxyles de l'acide hyaluronique. Le NHS (N-hydroxysuccinimide) favorise cette réaction de réticulation en transformant les groupes carboxyles actifs en esters. C'est ces esters qui vont former des liaisons peptidiques avec les groupes amines de la poly-L-lysine (a.). Le contrôle de la rigidité des films réticulés se fait en variant la concentration d'EDC utilisée. Plus la concentration d'EDC utilisée est importante, plus les films sont rigides (b.). Adaptée de (Boudou, Crouzier et al. 2010, Rydzek, Schaaf et al. 2012). ..... 51

- Figure 1-12|Modulation de la rigidité par ajout de bicouches de polyélectrolytes synthétiques.** Les films obtenus ont une organisation de type  $(PLL/HA)_m-(PSS/PAH)_n$  (a. et b.). L'augmentation de rigidité des films s'obtient en fonction du nombre  $n$  de bicouches de PSS/PAH appliquées en surface de film  $(PLL/HA)_m$ . Adaptée de (Francius, Hemmerle et al. 2007). ..... 52
- Figure 1-13|Techniques de caractérisations mécaniques des hydrogels.** La rigidité des hydrogels est mesurée par des techniques de spectroscopie de force comme des tests de traction (a), de compression (b), de compression confinée (c), d'indentation (d), de rhéométrie de flux (e) ou encore d'analyse mécanique dynamique (f). Adaptée de (Oyen 2014) ..... 52
- Figure 1-14|Principe de nano-indentation par AFM.** Une sonde colloïdale de diamètre connu est fixée sur un cantilever ayant une constante de raideur  $k_c$ . A l'aide d'un moteur piézoélectrique, la sonde va exercer une force perpendiculaire à la surface du matériau, qui va le comprimer. Le piézoélectrique permet ces indentations sous forme d'approche-retrait. Les déplacements du piézo ainsi que la déviation du cantilever, induite par la résistance aux forces du biomatériau, sont mesurés. La mesure de la déviation du cantilever se fait à l'aide d'un laser et d'une photodiode à quadrant comme dans un AFM classique. L'indentation  $\delta$  est la différence mesurée entre les deux déplacements. Elle permet à l'aide de la force  $F$  appliquée par le cantilever (dépendant de  $k_c$ ) et du rayon  $R$  de la sonde d'obtenir le module d'Young  $E$ . Adaptée de (Francius 2006) 53
- Figure 2-1|Mécano-sensation, -transduction et -réponse.** Une cellule est capable de sentir la rigidité de son environnement au cours d'un mécanisme de mécano-sensation avant de transformer ces signaux mécaniques en signaux chimiques afin de réguler le comportement et la fonction cellulaire. Cette mécano-transduction implique généralement des récepteurs membranaires, les intégrines, des molécules des contacts focaux comme la taline, la vinculine ou encore p130CAS ainsi que des facteurs de signalisation nucléaire capables d'altérer et de changer les profils d'expression de certains gènes. La déformation nucléaire induite par la propagation physique des signaux mécaniques peut également induire des changements d'expression génique. Adaptée de (Iskratsch, Wolfenson et al. 2014)..... 56
- Figure 2-2|Influence de la rigidité du substrat sur l'attachement et l'étalement cellulaire.** Sur substrat rigide, des myoblastes ont une morphologie très étalée associée à une organisation du cytosquelette d'actine (en rouge) en fibres de stress (indiquées par les têtes de flèches blanches) et des contacts focaux bien différenciés (en verre). Sur substrat mou, les myoblastes adoptent une morphologie beaucoup plus arrondie liée à l'absence de contacts focaux bien distincts et d'organisation en fibres du cytosquelette. Adaptée de (Discher, Mooney et al. 2009) ..... 57
- Figure 2-3|Mécanisme de migration cellulaire.** Afin de migrer, les cellules doivent d'abord s'attacher à leur substrat (1), puis former une extension sous la forme d'un lamellipode à l'aide du cytosquelette d'actine (2), créer de nouveaux contacts focaux (3), se déplacer vers les nouveaux contacts focaux (4) et enfin, se détacher du substrat au niveau des anciens contacts focaux (5). Adaptée de (Bravo-Cordero, Magalhaes et al. 2013). ..... 58

**Figure 2-4|Effet de la rigidité du substrat sur la différenciation cellulaire.** La différenciation cellulaire est influencée par la rigidité de la matrice. Ainsi, des cellules souches mésenchymateuses (MSC) en culture sur des substrats très mous (50-400 Pa) se différencient en neurone, des cellules en culture sur des substrats légèrement plus rigides (700-1 500 Pa) en adipocytes. Des cellules en culture sur des substrats de rigidité plus importante (5-12000 Pa) deviennent des myoblastes alors que des cellules sur des substrats très rigides (plus de 20 000 Pa) se différencient en ostéoblastes. Adaptée de (Halder, Dupont et al. 2012) ..... 59

**Figure 2-5|Effet de la rigidité du substrat sur le comportement cellulaire.** La rigidité du substrat agit comme un médiateur important du comportement cellulaire. Ainsi, sur des substrats mous, les cellules cessent de proliférer et forment peu de contacts focaux. Sur des substrats très mous (<50 kPa), les cellules ne parviennent pas à survivre et entrent en apoptose. Sur des substrats rigides, les cellules parviennent à créer de nombreux contacts focaux, et donc à s'étaler. Une augmentation de l'adhérence et de la prolifération sont observées sur substrats rigides. La migration est également affectée : les cellules migrent vers des substrats plus rigides par durotaxie. Enfin, la rigidité du substrat est un facteur important de la différenciation cellulaire : les cellules se différencient en neurones sur substrats mous, en myocytes sur substrats plus rigides ou encore en ostéocytes sur substrats très rigides. Adaptée de (Wells 2008, Halder, Dupont et al. 2012). ..... 60

**Figure 2-6|Structure et famille des intégrines.** Les intégrines sont des hétérodimères transmembranaires disposant d'un long domaine cytoplasmique se liant avec les protéines de la matrice extracellulaire et un court domaine cytoplasmique faisant la liaison avec le cytosquelette et un certain nombre de molécules associées aux différentes voies de signalisation activées par les intégrines (a.). Chez l'humain, 24 couples d'intégrines ont été identifiés ; ils lient des domaines spécifiques de protéines de l'ECM comme le collagène, les lamines et les séquences RGD présents sur les fibronectines etc. Certaines intégrines, les  $\beta 2$  reconnaissent des domaines spécifiques des leucocytes (b.). Adaptée de (Hynes 2002)..... 62

**Figure 2-7|Interactions et composants de l'adhésome.** Ce complexe multiprotéique est composé d'environ 232 protéines parmi lesquelles 148 sont des composants intrinsèques et 84 sont liées de manière transitoire au site d'adhérence. Ces protéines effectuent entre elles près de 700 interactions d'activation (flèche rouge), de liaison (trait noir) ou encore d'inhibition (flèche bleue). Adaptée de (Geiger, Spatz et al. 2009) ..... 63

**Figure 2-8|Propagation des forces mécaniques versus signaux chimiques.** Les signaux représentés par le(s) point(s) rouge(s) peuvent être transmis au noyau par la propagation de forces mécaniques ou par la propagation de signaux chimiques. La propagation vers le noyau sous la forme de force mécanique est bien plus rapide que celle qui se fait sous la forme de signaux chimiques (de l'ordre de la  $\mu s$  comparé à la ms). Adaptée de (Wang, Tytell et al. 2009). ..... 64

**Figure 2-9|Molécules impliquées dans la propagation des signaux du microenvironnement vers le noyau.** Les signaux mécaniques ou chimiques provenant de

l'ECM sont détectés par des récepteurs dédiés dans le cas des facteurs de croissance ou via les intégrines dans le cas de signaux mécaniques. Ces signaux mécaniques vont ensuite être transmis aux adhésomes (contact focaux), qui connectent le cytosquelette aux intégrines via la vinculine et la taline. Ce signal va alors être transformé en signaux biochimiques au niveau du cytoplasme ou se propager sous la forme d'une onde de stress le long des filaments d'actine (F-actin) avant d'atteindre le noyau via les complexes LINC. Les microtubules (MTs) et les filaments intermédiaires (IF) sont reliés aux filaments d'actine par des protéines : la plectine et l'ACF-8. Ils sont également liés au nucléosquelette grâce à l'émerine des complexe LINC. Le nucléosquelette de lamines est ensuite lié à l'ADN (organisé sous la forme d'une superstructure, la chromatine). Adaptée de (Wang, Tytell et al. 2009) ..... 64

**Figure 2-10 | Eléments du cytosquelette.** Le cytosquelette est composé de trois types de polymères organisés en réseaux : les filaments d'actine, les microtubules et un groupe de polymères appelé filaments intermédiaires. Adaptée de L'essentiel de la Biologie Cellulaire 3e Ed. (Alberts)..... 65

**Figure 2-11 | Le complexe LINC.** Le complexe LINC est un complexe protéique permettant les connections physiques et fonctionnelles des cytosquelettes d'actine, de microtubules et de filaments intermédiaires au nucléosquelette, qui forme la lamine nucléaire. Il est composé des différentes protéines telles que les nesprines, les protéines SUN ainsi que des protéines associées. INM : membrane nucléaire interne. ONM : membrane nucléaire externe. Adaptée de (Chang, Worman et al. 2015) ..... 67

**Figure 2-12 | Organisation des lamines.** Les lamines sont des filaments intermédiaires de type V situés dans le noyau au niveau de la membrane nucléaire interne. Elles font partie du complexe LINC. Deux types de familles de lamines existent : les lamines A et C issues de l'épissage alternatif du gène *LMNA* et les lamines B issues de deux gènes *LMNB1* et *LMNB2*. Adaptée de (Swift and Discher 2014) ..... 69

**Figure 2-13 | Principales voies de signalisation cytoplasmiques impliquées dans la mécano-transduction et leurs effets.** Les signaux mécaniques ressentis au niveau des contacts focaux déclenchent plusieurs voies de signalisation induisant prolifération, contraction du cytosquelette ou encore différenciation. Adaptée de (Janmey, Wells et al. 2013). ..... 70

**Figure 2-14 | Effet de la rigidité sur les cofacteurs de transcription YAP et TAZ.** Sur substrats rigides, YAP et TAZ sont localisés dans le noyau et participent à la prolifération cellulaire ainsi qu'à la différenciation des MSC en ostéoblastes (a.). Sur substrats mous, YAP et TAZ restent dans le cytoplasme où ils sont dégradés, conduisant à un arrêt de la prolifération cellulaire (b.). Modèle de régulation mécanique proposé impliquant le cytosquelette d'actinomyosine (c.). Adaptée de (Halder, Dupont et al. 2012) ..... 70

**Figure 2-15 | Organisation de la chromatine.** La chromatine est une superstructure dans laquelle la double hélice d'ADN est enroulée autour d'histones et de protéines associées pour former le nucléosome. Ces nucléosomes s'organisent en filament de 10 nm de diamètre qui eux même s'organisent en fibres de chromatine de 30 nm (a.). Cette structuration des nucléosomes en monofilaments puis en fibres de chromatine est visible en microscopie électronique à transmission (b.). La chromatine est une structure

non homogène existante sous deux formes plus ou moins condensées : l'hétérochromatine (H) et l'euchromatine (E). Le nucléole (Nu) et la structuration de la chromatine sont visibles en microscopie électronique à transmission (c.). ..... 72

**Figure 2-16|Plasticité de la chromatine associée aux modifications épigénétique des histones.** L'euchromatine est riche en histones acétylés. Cette acétylation des histones est réalisée par des histones acétylases transférases (HAT). Ce marqueur épigénétique peut être enlevé par des histones désacétylases (HDAC). Cette désacétylation induit le recrutement d'une histone méthyl-transférase spécifique à K9 permettant aux histones de lier HP1 qui à son tour conduit à la répression de la transcription et la transformation en hétérochromatine. Adaptée de (Whittle and Singewald 2014) et (Bártová, Krejčí et al. 2008). ..... 73

**Figure 2-17|Mécanisme de transcription.** La transcription est une activité nucléaire au cours de laquelle l'ADN est transcrit en ARN messager. Elle est organisée en 3 phases : initiation, élongation et terminaison. L'ARN polymérase se lie à l'ADN au niveau d'un promoteur au cours de la phase d'initiation (1). Une molécule d'ARN message est produite par la polymérase au cours de la phase d'élongation (2). Enfin, au niveau du terminateur, l'ARN messager se sépare de l'ARN polymérase II qui elle-même se décroche de l'ADN (3). ..... 75

**Figure 2-18|Mécanismes potentiels d'altération de la transcription par les forces mécaniques.** Les forces appliquées au noyau peuvent induire une distorsion de la membrane nucléaire qui en se propageant à la chromatine modifie sa conformation. Les forces peuvent également modifier la structure de certaines protéines nucléaires et permettre ainsi la libération ou la rétention de facteurs de transcription ou l'import de molécules ou encore le transport d'ions de et vers le noyau. Adaptée de (Fedorchak, Kaminski et al. 2014) ..... 76

**Figure 2-19|Incidence mondiale du cancer.** Si le cancer est un fléau mondial qui touche des millions d'hommes, de femmes et d'enfants, son incidence varie énormément selon les régions géographiques et les types de cancer. Ainsi, en Europe de l'Ouest, les principaux cancers sont ceux de la prostate, de la poitrine et le colorectal alors qu'en Afrique de l'Ouest, ce sont ceux de la poitrine, de l'utérus et du foie qui prédominent. Adaptée de l'agence internationale pour la recherche sur le cancer (IARC). ..... 78

**Figure 2-20|Incidence des cancers autour du monde en 2012.** Ces résultats issus de l'enquête Globocan 2012 montrent que les cancers les plus répandus autour du monde sont les cancers du poumon, de la poitrine et les cancers colorectaux. Adaptée de (Stewart and Wild 2016) ..... 79

**Figure 2-21|Dissémination métastatique.** La dissémination métastatique est le phénomène en plusieurs étapes, au cours duquel des cellules s'échappent de la tumeur primaire (a.), intravasent dans le système circulatoire (b.), y survivent en s'associant aux thrombocytes (c.), s'en extraient en adhérant aux cellules endothéliales grâce à la coagulation des plaquettes (d.), colonisent de nouveaux sites à distance de la tumeur primaire et enfin parviennent à survivre (e.). Adaptée de (Reymond, d'Agua et al. 2013). ..... 80

**Figure 2-22|Organotropisme et métastases.** Le lien entre les tumeurs et leurs microenvironnements est très important. Ce lien conduit certains cancers à ne métastaser que dans certains organes cibles. Ainsi le cancer de la prostate métastase principalement dans les os alors que le cancer du poumon métastase dans le foie, le cerveau et les os. Adaptée de (Obenauf and Massagué , Nguyen, Bos et al. 2009) et Servier Medical Art..... 81

**Figure 2-23|Transition épithélio-mésenchymateuse.** La transition épithélio-mésenchymateuse (ici annotée EMT, pour l'anglais *epithelial mesenchymal transition*) est le phénomène par lequel les cellules épithéliales perdent progressivement leurs caractéristiques épithéliales et marqueurs associés au détriment de ceux des cellules mésenchymateuses. Cette transition permet de dédifférencier les cellules et les rendre plus motiles Le processus inverse est la transition mésenchymo-épithéliale (ici annotée MET). Adaptée de (Aroeira, Aguilera et al. 2007). ..... 82

**Figure 2-24|Incidence des cancers colorectaux autour du monde.** L'incidence et la mortalité du cancer colorectal peut varier jusqu'à 10 fois selon les régions du monde. En effet, plus des 2/3 de l'ensemble des cas de cancer colorectal et près de 60% de décès associés ont lieu dans des pays ayant un indice de développement humain très important. Adaptée de (Arnold, Sierra et al. 2016) ..... 83

**Figure 2-25|Mutations conduisant à la formation d'un carcinome colorectal.** Le cancer colorectal est initié par une inactivation mutationnelle du suppresseur de tumeur *adenomatous polyposis coli (APC)*. La crypte dans laquelle la cellule mutée pour *APC* se trouve devient alors dysplastique. Les cellules s'accumulent peu à peu au niveau du haut de la crypte où elles vont former un polype. Ce polype évolue en adénome après une mutation pour *KRAS*. La transformation en carcinome apparait l'inactivation de la voie *TP53*. Les cellules cancéreuses sont ensuite capables de passer la membrane basale et de former des métastases. Adapté de (Rajagopalan, Nowak et al. 2003) et du National Cancer Institute..... 84

**Figure 2-26|Dissémination métastatique des cellules de carcinome colorectal.** Si la progression maligne de l'adénome au carcinome invasif met de nombreuses années, la dissémination métastatique qui s'ensuit est rapide. Les cellules cancéreuses du cancer colorectal établissent principalement des métastases au niveau du foie et des poumons par organotropisme en quelques mois. Adaptée de (Nguyen, Bos et al. 2009) et de Servier Medical Art..... 85

**Figure 2-27|Changements génétiques impliqués dans la tumorigénèse et la formation de métastase.** La transition d'une tumeur non métastatique à une tumeur agressive métastatique est gouvernée par l'activation de plusieurs oncogènes et l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeur. Adaptée de (Nguyen, Bos et al. 2009). ..... 85

**Figure 2-28|Architecture nucléaire d'une cellule saine vs celle d'une cellule cancéreuse.** Les noyaux de cellules saines disposent de plusieurs petits nucléoles (en jaune). L'hétérochromatine (ici en vert) est localisée au niveau de la périphérie nucléaire et au niveau des nucléoles (a.). Les noyaux des cellules cancéreuses sont très irréguliers. L'hétérochromatine perd sa localisation périphérique et forme des agrégats au sein du

noyau. Les nucléoles sont également plus gros (b.). Adaptée de (Zink, Fischer et al. 2004). .....86

**Figure 2-29 | Rôle de la rigidité du substrat dans la tumorigénèse.** L'augmentation de la rigidité du microenvironnement cellulaire est sentie par les cellules au niveau des intégrines et des contacts focaux. Cette mécano-sensation conduit une augmentation des forces générées par le cytosquelette qui vont en retour induire une nouvelle augmentation de la rigidité de l'ECM. La rigidité du microenvironnement conduit également à une prolifération cellulaire à la formation de la tumeur. Adaptée de (Jaalouk and Lammerding 2009) .....87

**Figure 3-1 | Processus de construction couche par couche des films multicouches de polyélectrolytes par *dip-coating*.** Schéma du processus de dépôts des différents électrolytes. Le bécher 1 contient le polymère chargé positivement (polycation) alors que le bécher 3 contient un polymère chargé négativement (polyanion). Les béchers 2 et 4 contiennent une solution de rinçage (A). Pour un substrat chargé négativement (cas du verre), une couche de polycations est apposée. Les polycations se lient au substrat par liaison électrostatique (B). Adaptée de (Tang, Wang et al. 2006). .....91

**Figure 3-2 | Architecture des films (PLL/HA)<sub>24</sub>-(PSS/PAH)<sub>n</sub>.** La première strate du film (PLL/HA)<sub>24</sub> est mise en évidence par microscopie confocale à l'aide de PLL couplée à de la FITC. La seconde strate (PSS/PAH)<sub>n</sub> est mise en évidence à l'aide d'un PSS couplé à de la rhodamine. Adaptée de (Kocgozlu, Lavallo et al. 2009). .....92

**Figure 3-3 | Fonctionnalisations des films multicouches de polyélectrolytes.** Une première fonctionnalisation basée sur des liaisons covalentes avec le raft RGD a été effectuée (a.). Une seconde fonctionnalisation basée sur un système hôte-invité a été réalisée (b.). Les polycyclodextrines agissant comme hôte (représentées en bleu) sont fixées par des ponts disulfures au film. L'adamantane (représenté en rose) de l'invité « adamantane-PEG-RGD » va ensuite réagir par des liaisons spécifiques avec les cyclodextrines. ....93

**Figure 3-4 | Comptage des cellules avec la lame de Neubauer.** A l'aide d'un microscope, les cellules présentes dans les carrés [1] sont comptées. La concentration cellulaire est obtenue par la division du nombre total de cellules comptées par le nombre de carrés comptés, le tout multiplié par 10 000. ....96

**Figure 3-5 | Structure chimique du 3,3'-iminodipropionitrile (IDPN).** La manipulation de cette molécule doit se faire avec précaution. ....97

**Figure 3-6 | Structure chimique de la trichostatine A (TSA) produite par *Streptomyces sp.*** La manipulation de cette molécule doit se faire avec précaution. ....98

**Figure 3-7 | Protocole de sélection de cellules résistantes aux substrats mous.** Afin de mimer les variations mécaniques rencontrées par les cellules lors du processus de dissémination métastatique, les cellules sont alternativement cultivées sur des substrats très mous ( $E_{20}$ ) et des substrats très rigides comme le verre. ....99

**Figure 3-8 | Phénomène de fluorescence.** Diagramme de Jablonski qui illustre les états électroniques des molécules ( $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $T_1$  et  $T_2$ ) et les transitions opérantes entre ces

différents états (a.). Chronologies des différents éléments impliqués dans les processus de fluorescence et de phosphorescence (b.). Figure adaptée de (Lichtman and Conchello 2005) ..... 102

**Figure 3-9|Principe de microscopie optique en epi-fluorescence.** Le principe de fonctionnement d'un microscope optique à épi-fluorescence est similaire à celui d'un microscope optique classique. Cependant, la source lumineuse est différente : lampe à vapeur de mercure, lampe à vapeur de xénon ou une série de lasers. Il contient également un bloc filtre (a.). Le bloc filtre est l'élément indispensable d'un microscope à épi-fluorescence. Il est composé d'un miroir dichroïque et deux filtres (d'émission et d'excitation). Un miroir dichroïque est un miroir qui a la capacité de ne laisser passer ou de réfléchir qu'une certaine longueur d'onde (b). Les filtres d'émission et d'excitation peuvent être passe-bas, passe-haut ou passe-bande. Ils permettent de limiter la pollution lumineuse liée à la source de photons ou à l'échantillon (c.). Les lampes HBO ont distribution spectrale plus importante dans les basses longueurs d'ondes (d.).103

**Figure 3-10|Principe d'immunofluorescence.** L'immunofluorescence repose sur la forte affinité qui lie les anticorps à leurs antigènes. Un fluorochrome est fixé sur l'anticorps primaire dans le cas d'un immunomarquage (a.) ou sur l'anticorps secondaire dans le cas d'un marquage indirect (b.). Des marquages multiples sont également possibles (c.). Anticorps et antigènes réalisés par Servier Medical Art..... 105

**Figure 3-11|Pellicule de l'une des premières vidéo-microscopies réalisées.** Cette vidéo-microscopie a été réalisée par Julien Ries à Paris en 1907. Cette expérience montre la fertilisation et le développement de l'oursin. Julien Ries a réalisé cette vidéo-microscopie pour prouver à ces étudiants en médecine que les cellules d'un organisme proviennent de la division d'une cellule. Adaptée de (Landecker 2009)..... 108

**Figure 3-12|Chambre de Ludin.** Afin de procéder à l'étude de la migration cellulaire, les lamelles sur lesquelles sont ensemencées les cellules sont montées dans une chambre de Ludin..... 109

**Figure 3-13|Chromatine observée en microscopie électronique à transmission.** Les amas noirs en périphérie correspondent à de l'hétérochromatine (H): l'ADN est plus concentré et laisse moins facilement passer les électrons. Les zones granuleuses grises à l'intérieur du noyau correspondent à de l'euchromatine(E). L'ADN étant décondensé, il laisse passer plus facilement les électrons. La zone plus foncée au cœur du noyau correspond au nucléole (Nu)..... 111

**Figure 3-14|Interactions des électrons avec la matière.** Lorsqu'un faisceau d'électrons atteint l'échantillon, ces électrons peuvent interagir de diverses manières : certaines seront rétrodiffusées, certains absorbés... Quelques électrons seront aussi diffractés mais une partie de ces électrons parvient à traverser cet échantillon, ce sont les électrons transmis..... 111

**Figure 3-15|Quantification de l'hétérochromatine.** La quantification de l'hétérochromatine à l'aide d'ImageJ se fait en plusieurs étapes. D'abord, le noyau et le(s) nucléole(s) sont détournés et ajouté au ROI (a). Le(s) nucléole(s) est(sont) supprimé(s) (b). Un flou gaussien de radius 2 est appliqué à la zone détournant le noyau

(c). Un seuillage est ensuite réalisé afin d'obtenir la surface occupée par l'hétérochromatine (d)..... 114

**Figure 3-16|Schéma récapitulatif du protocole d'extraction des ARN.** Les cellules sont lysées par le Trizol®. L'utilisation de chloroforme permet de séparer l'ARN des différents composés issus de la lyse cellulaire, les ARN messagers sont précipités à l'aide d'isopropanol puis rincer à l'aide d'éthanol avant d'être remis en suspension dans de l'eau stérile..... 116

**Figure 3-17|Principe de spectrophotométrie.** La spectrophotométrie repose sur le fait que lorsqu'une solution est traversée par une lumière d'intensité  $I_0$ , une partie de cette dernière est absorbée par les molécules en solution ; la lumière transmise  $I$  est donc inférieure à l'intensité lumineuse  $I_0$ . L'absorbance est donc la résultante du ratio  $I_0/I$ . une longueur d'onde donnée  $\lambda$ , l'absorption est proportionnelle à la concentration d'une solution et à la longueur du trajet optique. Plus une solution est concentrée, plus l'absorption sera élevée. Adaptée de Servier Medical Art. .... 117

**Figure 3-18|Vue schématique de la courbe d'absorption idéale des acides nucléiques obtenue et réalisée à l'aide du NanoDrop.** L'absorption des acides nucléiques à un pic maximal pour la longueur d'onde 260 nm. Deux autres valeurs sont également observées à 280 nm (pic maximal d'absorption des protéines) et 230 nm (pic maximal des solvants utilisés dans l'extraction des ARN). Les ratios obtenus à partir de ces valeurs sont utilisés comme indice de pureté des échantillons (a.). Exemple de spectrophotomètre NanoDrop (Thermo Fisher) utilisé pour la quantification des échantillons (b.)..... 117

**Figure 3-19|Différences entre une souris NMRI nu et son homologue non mutée.** La souris gauche est une souris ayant une mutation homozygote récessive du gène *Foxn1*<sup>-/-</sup>. La souris albinos située à droite est son homologue mutant hétérozygote *Foxn1*<sup>+/-</sup> ou son homologue sauvage. En effet, seules les souris ayant subi une mutation dans les deux allèles du gène présentent ce phénotype. Les souris NMRI nues sont obtenues par croisement entre un mâle homozygote et une femelle hétérozygote pour le gène *Foxn1*. L'utilisation de mâles homozygotes plutôt que de femelles homozygotes s'explique par le fait que ces dernières sont incapables d'allaiter leurs petits. ... 118

**Figure 5-1|Marqueurs étudiés dans l'analyse transcriptomique** en cours. L'analyse du transcriptome s'intéresse plus particulièrement à des marqueurs de cellules souches intestinales, de CIT, de TME ou encore des histones désacétylases. .... 162

**Figure 5-2|Les noyaux de cellules cancéreuses sont fortement déformables.** Davidson *et al.* ont démontré que sur des substrats à topographie variable (espacement et taille des piliers), les noyaux cellulaires d'ostéosarcome arrivait à se déformer de manière importante contrairement aux cellules saines qui restent à la surface des piliers. Adaptée de (Davidson, Fromigué et al. 2010) ..... 163

**Figure 6-1|Influence des forces d'interaction substrat-ligand sur l'adhérence cellulaire.** Afin d'évaluer l'influence de la force d'interaction substrat-ligand sur l'adhérence cellulaire, un système hôte-invité est utilisé. La rigidité du substrat et les interactions

supramoléculaires au sein du système hôte-invité (forces d'interaction et multivalence) sont modulées au cours de cette étude. .... 165

**Figure 6-2 | Une des hypothèses émises pour l'influence des forces d'interaction substrat-ligand sur l'attachement cellulaire.** Sur des substrats à rigidité variable pour lesquels les RGD sont présentés de manière covalente, les cellules sont capables d'adhérer et de former des contacts focaux (a). Sur des substrats à rigidité variable pour lesquels les RGD sont présentés de manière non covalente, la force de traction générée par la cellule est plus importante que la force d'interaction entre l'adamantane et la cyclodextrine, générant un détachement important de ces RGD (b.)..... 188



## Liste des tableaux

- Tableau 2-1|Module de Young des microenvironnements traversés par les cellules cancéreuses.** Au cours du processus de dissémination métastatique, les cellules initiatrices de tumeurs sont confrontées à de nombreux environnements dont les propriétés mécaniques varient drastiquement d'un environnement à l'autre. Adaptée de (Rabineau, Kocgozlu et al. 2013).....88
- Tableau 3-1| Structures moléculaires, charges et notations des différents polyélectrolytes utilisés.** Les deux premiers polyélectrolytes (PLL et HA) sont des biomolécules chargées. Le PSS et PAH sont des polyélectrolytes synthétiques. Deux de ces polyélectrolytes ont été couplés à des molécules fluorescentes, le FITC qui émet dans le vert, et la rhodamine qui émet dans le rouge. Mw = masse molaire.....90
- Tableau 3-2|Architectures et modules de Young E relatifs des films multicouches à élasticité modulée.** Les films sont annotés selon la forme E pour module de Young suivi en indice de leur module de Young relatif.....92
- Tableau 3-3|Caractéristiques des différents objectifs du microscope inversé à épifluorescence** Nikon Eclipse Ti-S présent au laboratoire. Chaque objectif a des caractéristiques particulières gravées sur la monture. Parmi les principales, le grossissement  $n\times$  suivi de l'ouverture numérique (1,4 dans le cadre du 60 $\times$ ). L'épaisseur optimale de la lamelle couvre objet est également indiquée (0,17 p.e.). WD correspond à la distance de travail, en mm. ....103
- Tableau 3-4|Tableau récapitulatif des anticorps primaires utilisés.** Afin d'observer des molécules d'intérêt impliquées dans la mécano-transduction, de nombreux anticorps primaires ont été utilisés. ....106
- Tableau 3-5|Tableau récapitulatif des anticorps secondaires utilisés.** Afin de révéler les anticorps primaires utilisés, deux anticorps secondaires munis d'un fluorophore émettant dans le vert ont été utilisés.....107



# Préambule

L'utilisation de biomatériaux pour remplacer ou améliorer soit une fonction perdue, soit une fonction endommagée de l'organisme humain, date de l'antiquité. Les nombreuses révolutions scientifiques et industrielles du siècle dernier se sont traduites par une évolution importante dans le domaine des biomatériaux. Les biomatériaux ne sont plus inertes comme ils l'étaient auparavant ; les biomatériaux développés sont désormais des matériaux intelligents, capables d'induire une réponse contrôlée de l'organisme. En raison de l'importance des propriétés de surface de ces nouveaux biomatériaux pour une bonne intégration cellulaire, l'idée de mimer l'environnement cellulaire a fait son chemin.

Durant de nombreuses années, la priorité était donnée à la chimie de cet environnement cellulaire avec la fonctionnalisation des surfaces par des molécules et ligands spécifiques comme le motif RGD. Mais depuis les travaux pionniers de Pelham et Wang en 1997, un intérêt tout particulier pour l'influence des signaux physiques (rigidité, topographie, etc.) sur le comportement cellulaire est apparu. Ce sont les débuts de la mécano-biologie. L'idée est alors d'utiliser ces propriétés pour induire des réponses cellulaires clés comme l'adhérence, la migration, la différenciation, etc. De nombreux hydrogels ont alors été développés pour étudier les relations entre la rigidité de la matrice et le comportement cellulaire. Si ces matériaux présentent de nombreux avantages et plus particulièrement celui de mimer la matrice extracellulaire, ils ne sont pas adaptés au revêtement de surface. En effet ces gels, trop épais, sont remplacés par des films fins construits couche par couche, également appelés films LbL (en anglais *Layer-by-Layer*), pour des applications en tant que revêtements de surface.

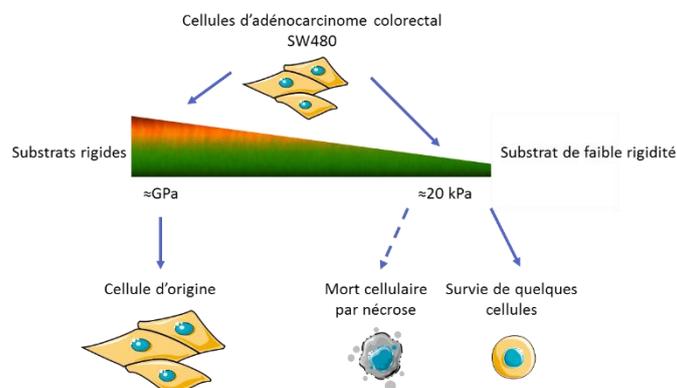
L'unité Inserm U1121 « Biomatériaux et Bioingénierie », dirigée par le Pr. Pierre Schaaf, développe entre autres des revêtements LbL à base de polyélectrolytes, (des polymères chargés en solution), les films multicouches de polyélectrolytes. Ces revêtements permettent de traiter la surface de matériaux favorisant certains comportements cellulaires comme l'attachement cellulaire, donc par extension la prolifération, la migration ou encore la différenciation cellulaire. Ces revêtements sont par exemple utilisés pour recouvrir les microbilles de titane utilisées dans la construction de larynx artificiel. Les films multicouches de polyélectrolytes sont construits par auto assemblage au travers d'immersions successives dans des solutions de polycations et polyanions. Très riche en eau, ces films fins se comportent comme des hydrogels. La modulation de leur rigidité peut être réalisée par l'ajout d'une cape à base de polymères synthétiques ou à l'aide d'une réaction chimique de type EDC/NHS.

Cette thèse de doctorat se situe dans la continuité des travaux effectués au laboratoire sous la direction du Dr. Dominique Vautier concernant l'effet de la rigidité sur le comportement des cellules. Les cellules sont capables de recevoir des signaux biochimiques et physiques de leurs environnements. Si les signaux chimiques et leurs intégrations par les cellules ont fait l'objet d'un grand nombre d'études, un intérêt particulier est porté depuis une vingtaine d'années sur les signaux mécaniques et, plus particulièrement, sur la rigidité de l'environnement cellulaire. Les cellules reconnaissent ces signaux mécaniques via un processus de mécano-sensation. Ces signaux seront ensuite intégrés par les cellules sous la forme d'un phénomène de mécano-transduction. La mécano-transduction peut se faire au niveau des contacts focaux

via la diffusion de signaux biochimiques du cytoplasme vers le noyau ou de manière beaucoup plus rapide : les forces sont alors propagées jusqu'au noyau via le cytosquelette et influencent directement l'expression génique selon des mécanismes peu identifiés à ce jour. La mécano-transduction induit une mécano-réponse de la part de la cellule en agissant sur la morphologie de la cellule, son comportement ou sa structure interne : chromatine, cytosquelette, contacts focaux.

La chromatine est une structure du noyau composée de nucléosomes : des acides désoxyribonucléiques (ADN) entourés autour d'histones et de protéines associées. Elle permet de compacter près de 2 mètres d'information génétique dans un noyau de 10 à 20 micromètres de diamètre. Cette structure existe sous deux formes en interphase : l'hétérochromatine et l'euchromatine. L'hétérochromatine est une structure très dense et généralement inactive en transcription. L'euchromatine est une structure décondensée dans laquelle l'ADN est accessible à la machinerie transcriptionnelle. L'effet de la rigidité sur la plasticité de la chromatine est une question encore peu explorée. L'influence de la rigidité du substrat sur l'organisation de la chromatine de cellules épithéliales rénales de potoroo a été étudiée au cours du premier projet de cette thèse. Ce travail de recherche a été abordé par des expériences d'immunofluorescence, de vidéo-microscopie, ainsi que de microscopie électronique à transmission.

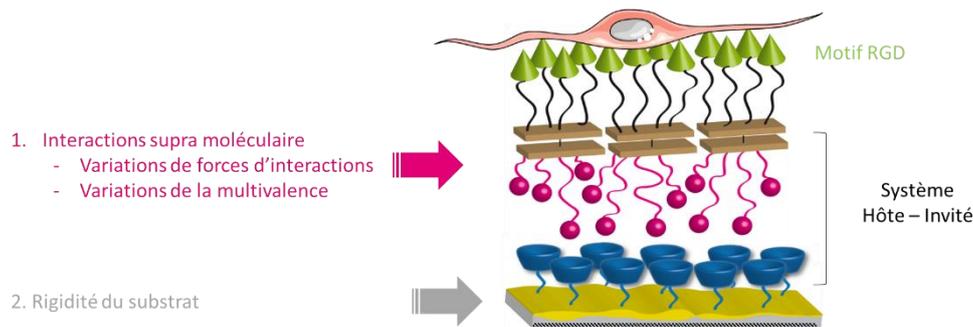
Le cancer est une véritable problématique de santé publique dans de nombreux pays du monde. Parmi ces cancers, le cancer colorectal est particulièrement agressif. Près de 90% des décès liés au cancer ne sont pas liés à la tumeur primaire, mais aux métastases. Pour former des métastases, des cellules quittent la tumeur primaire, traversent des environnements caractérisés par des rigidités différentes, se retrouvent dans les circulations sanguine et lymphatique avant de coloniser de nouveaux organes par un mécanisme d'organotropisme. Au cours de ce processus de dissémination, de nombreuses cellules ne parviennent pas à survivre à ces variations importantes de rigidité et meurent massivement. Cependant, certaines cellules, les cellules initiatrices de tumeurs, parviennent à survivre. Un second projet de thèse a été développé dans le but de comprendre le processus mis en place par ces cellules pour survivre et d'identifier les gènes mis en jeu dans ce phénomène afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Cette étude repose sur le passage successif de cellules cancéreuses colorectales (SW480) sur des matériaux mous et rigides afin de mimer les variations de rigidité auxquelles elles sont confrontées lors du processus de dissémination métastatique (**Figure 0-1**). L'identification des mécanismes de survie employés par les cellules se fait à l'aide d'expériences de viabilité cellulaire, d'immunofluorescence, de vidéo-microscopie, de microscopie électronique à transmission.



**Figure 0-1 | Sélection de cellules tumorales par modulation des propriétés mécaniques du substrat**

Afin de s'attacher au substrat, de se mouvoir, de se diviser, etc. les cellules sont capables d'exercer une force sur leur substrat, générée par la contraction de leur cytosquelette d'actomyosine. Ce

troisième projet de recherche se concentre sur l'étude des forces exercées par les cellules pour sonder la rigidité de leur environnement. Sur des substrats de rigidité variable, des ligands d'adhérence de type RGD sont fixés de manière non covalente par des systèmes « hôte-invité » (**Figure 0-2**). Ces constructions permettent de moduler les forces d'interaction substrats-ligands et, par conséquent, influencer l'adhérence cellulaire. La compréhension des liens et synergies entre la rigidité du substrat, les forces de liaison (au sein des interactions hôte/invité) et l'attachement cellulaire ouvre la voie au développement de nouveaux matériaux utilisés en ingénierie tissulaire permettant de contrôler le comportement cellulaire.



**Figure 0-2 | Influence des forces d'interaction substrat-ligands sur l'adhésion cellulaire**

Ce manuscrit s'articule autour de sept chapitres. Le premier chapitre traite de l'évolution récente des biomatériaux. Le second chapitre fait un état des connaissances actuelles en mécano-biologie. Le troisième chapitre présente les différents matériaux, modèles cellulaires et techniques utilisés pour répondre aux problématiques évoquées ci-dessus. Le quatrième chapitre porte sur l'influence de la rigidité de la matrice sur l'organisation de la chromatine des cellules épithéliales rénales de Potoroo (PtK2). Le cinquième chapitre traite l'effet de la rigidité de l'environnement cellulaire sur l'organisation de la chromatine et la migration des cellules du cancer colorectal. Le chapitre suivant est centré sur l'influence de la force des interactions substrat-ligand sur l'attachement cellulaire. Enfin le septième et dernier chapitre permet d'apporter quelques conclusions sur les travaux effectués et d'ouvrir de nouvelles perspectives.



# Chapitre 1 Introduction aux biomatériaux

L'utilisation de biomatériaux pour remplacer ou regagner des fonctions perdues n'est pas nouvelle, comme en témoignent l'utilisation de prothèses en bois chez les Egyptiens près de 1 000 avant JC, ou l'usage de nacre pour remplacer les dents perdues chez les Mayas 600 ans après JC. Les révolutions industrielles et scientifiques du siècle dernier ont permis un essor important des biomatériaux avec l'avènement de nouveaux matériaux comme le titane, l'acier inoxydable ou les polymères synthétiques. Plusieurs générations de biomatériaux se sont succédées laissant la place à des matériaux dit « intelligents » induisant une réaction contrôlée de l'organisme favorisant leur bonne intégration.

L'idée de mimer l'environnement cellulaire pour induire ces réactions contrôlées a rapidement fait son chemin. Cet environnement cellulaire est principalement composé d'eau de protéines et de polysaccharides. De nombreux hydrogels naturels et synthétiques ont alors été développés dans le but de comprendre les interactions des cellules avec leur environnement et comment ce dernier peut induire les réponses cellulaires souhaitées. Ces hydrogels présentant le désavantage d'être relativement épais, des films multicouches de polyélectrolytes ont été développés comme revêtements de surface de ces biomatériaux.

## 1.1 Les biomatériaux

Si les biomatériaux sont le plus souvent définis comme des matériaux utilisés en médecine (Huebsch and Mooney 2009), la définition d'un biomatériau et son concept ont fortement évolué au cours du temps et, plus particulièrement, des avancées technologiques des dernières années (Williams 2009). Aujourd'hui, les biomatériaux ne sont plus uniquement des matériaux implantables tels que les prothèses de hanches, les implants dentaires ou le cœur artificiel. Un éventail de nouvelles technologies utilisent des biomatériaux comme des systèmes de libération de molécules à visée thérapeutique, l'ingénierie tissulaire, la thérapie cellulaire, ou encore l'impression 3D d'organes. Les biomatériaux utilisés au début du 20<sup>ème</sup> siècle comme les métaux, les céramiques et les polymères sont toujours utilisés. Ces matériaux rassemblent les métaux purs et les alliages dans le cas des biomatériaux métalliques, le verre, la vitrocéramique et les dérivés du carbone dans le cas des biomatériaux céramiques. Les textiles, les thermosets, les thermoplastiques et les élastomères font partie des différents polymères utilisés comme biomatériaux. Des matériaux hybrides composés le plus souvent de biomatériaux métalliques et céramiques, appelés composites, ont également été développés et utilisés. De nombreuses révolutions industrielles et scientifiques (dans le domaine des polymères, de la biologie moléculaires, etc.) ont permis à ces matériaux d'évoluer (Williams 2009).

### 1.1.1. Définition du terme « biomatériau »

Cette évolution se retrouve dans la définition même du terme « biomatériau ». Cette définition n'a cessé d'évoluer en fonction des différentes révolutions technologiques et scientifiques qui émaillent l'histoire. En 1987, un biomatériau était défini comme « un matériau non viable utilisé dans un dispositif médical dans le but d'interagir avec des systèmes biologiques ». En 1999, en raison des évolutions dans le domaine, une nouvelle définition est alors préférée. Le biomatériau est dès lors « un matériau destiné à faire l'interface avec des systèmes biologiques dans le but d'évaluer, de traiter, d'augmenter ou de rempla-

cer n'importe quels tissus, organes ou fonction de l'organisme ». Plus de 10 ans après, la définition de biomatériau largement acceptée est la suivante : « un biomatériau est un matériau qui a été conçu seul ou en tant que partie d'un système complexe afin de diriger en contrôlant les interactions avec les composants des systèmes vivants, le cours de toutes procédures thérapeutiques ou diagnostiques occurrent dans les médecines humaines ou vétérinaires» (Williams 2009).

## 1.1.2. Histoire et évolution des biomatériaux

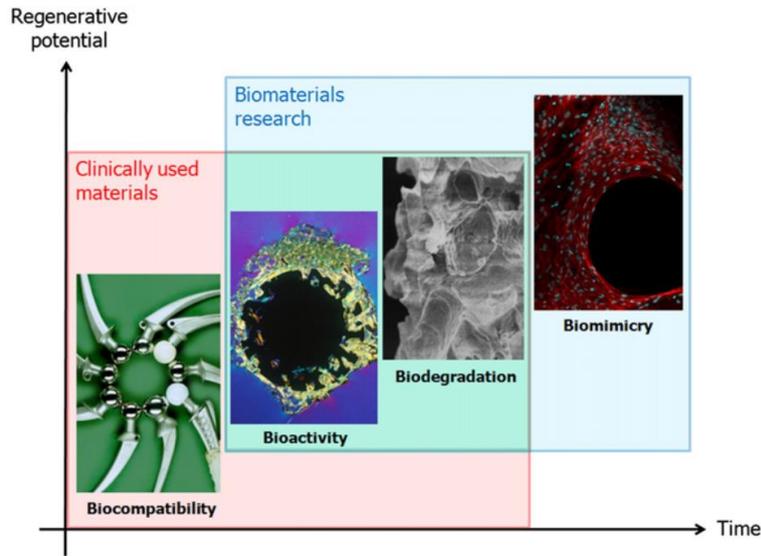
### 1.1.2.1. *Traces historiques*

Il est intéressant et passionnant de voir que dès les premiers temps de l'humanité, des matériaux étaient utilisés afin de remplacer ou améliorer des fonctionnalités du corps humain perdues après un traumatisme ou au cours d'une pathologie. En effet, nous avons tous en tête l'image de la jambe de bois ou de l'œil de verre lorsque nous évoquons les biomatériaux au cours de l'histoire. Il est intéressant de noter qu'une prothèse de gros orteil en bois a été découverte sur une momie inhumée entre 1075 et 740 avant Jésus-Christ (Huebsch and Mooney 2009).

Les biomatériaux étaient particulièrement utilisés en odontologie où des matériaux comme l'or ou le plomb étaient déjà utilisés il y a plus de 2 000 ans. Si les Romains et les Incas préféraient l'or pour remplacer les dents endommagées, d'autres matériaux bien moins traditionnels étaient utilisés. Ainsi, les Mayas utilisaient du nacre issu de coquillages et parvenaient à obtenir une ostéointégration parfaite de ce dernier dans la mâchoire 600 ans après Jésus-Christ. L'utilisation de suture pour réparer les blessures date également de l'antiquité avec l'utilisation de fils de lins par les Egyptiens ou des fils de métaux par les Grecs. Si certaines populations utilisaient des boyaux (catgut) pour suturer les plaies, d'autres populations utilisaient des moyens bien moins conventionnels. Ainsi l'histoire rapporte l'utilisation de morsures de fourmis par plusieurs populations d'Afrique et d'Inde pour refermer certaines plaies. Pendant plusieurs millénaires, de nombreux matériaux naturels tels que le bois, le verre, l'ivoire ou l'or ont été utilisés comme biomatériaux (Ratner 2013).

### 1.1.2.2. *Développement & évolution des biomatériaux*

Il y a encore une soixantaine d'années, les biomatériaux tels que nous les identifions aujourd'hui n'existaient tout simplement pas. Depuis leurs apparitions en tant que tels, ils ont sauvé la vie de millions de personnes et ont participé à l'amélioration de la vie de millions d'autres. Si les biomatériaux sont présents depuis l'antiquité, leur degré de sophistication a énormément augmenté. En effet, les biomatériaux ont évolué en fonction des révolutions industrielles (dans le domaine militaire, automobile, de l'aviation etc.) et scientifiques (dans le milieu des polymères synthétiques et de la biologie) qui ont émaillé le siècle dernier. Le bois, l'ivoire et l'or ont ainsi laissé place à l'utilisation de nouveaux matériaux comme les alliages métalliques, les céramiques ou les polymères dès le début du 20<sup>ème</sup> siècle (Huebsch and Mooney 2009). Ce choix s'explique par de meilleures performances, fonctionnalités et surtout reproductibilités que leurs équivalents naturels. Depuis les années 1940, les biomatériaux ont fortement évolué passant de matériaux inertes à des matériaux promouvant la régénération cellulaire (Ratner, Hoffman et al. 2013) ou même des biomatériaux mimétiques (Holzapfel, Reichert et al. 2013).



**Figure 1-1 | Evolution des biomatériaux.** Les biomatériaux classiques comme les biomatériaux métalliques utilisés pour des prothèses implantables de hanches avaient pour principal but d'être biocompatibles, voire plus généralement bioinertes, c'est-à-dire n'induisant aucunes réactions biologiques de la part de l'organisme hôte. Ces biomatériaux ont dans de nombreux cas été remplacés par des biomatériaux bioactifs qui ont pour but d'induire une réponse biologique contrôlée des tissus dans lesquels ils sont implantés. Ces matériaux ont peu à peu laissé place à des biomatériaux dégradables. En effet, les approches biologiques se concentrent plus sur la réparation des tissus endommagés que sur le remplacement. Dans ce but, de nouveaux biomatériaux mimant l'environnement cellulaire participent de manière active au processus de régénération des tissus endommagés en stimulant des réponses cellulaires spécifiques (Holzapfel, Reichert et al. 2013).

#### 1.1.2.2.1. Les biomatériaux de 1<sup>ère</sup> génération – Les biomatériaux bioinertes

La fin du 19<sup>ème</sup> siècle connaît une révolution sans précédent dans le domaine des polymères synthétiques. Ces polymères ont pu être utilisés très rapidement dans un but médical. Les premières traces de l'utilisation de polymères synthétiques remontent aux années 1930 ; le polyméthylméthacrylate (PMMA) est alors couramment utilisé en odontologie (Langer and Tirrell 2004). S'ensuit alors une période noire de l'histoire avec deux guerres mondiales successives donnant naissance à énormément d'innovations dans les industries militaires, automobiles et de l'aviation etc. Les médecins de l'époque utilisaient alors des matériaux issus de ces industries parallèles pour les appliquer à des problématiques médicales. C'est le début de l'utilisation des silicones, des polyétheruréthanes, du nylon, du titane, de l'acier inoxydable, des méthacrylates et même de Téflon® (Ratner 2013).

Les biomatériaux de première génération sont alors caractérisés par leur côté « *out-of-the-shelf* ». Ces matériaux étaient choisis pour leur inertie. Ils avaient pour caractéristique principale d'induire aucune réaction ou une réaction très minime de l'organisme. Le but était alors d'éviter toutes réactions de rejets pouvant potentiellement induire des problèmes nuisibles à la santé du patient.

Cependant, malgré les avancées apportées par ces nombreux nouveaux matériaux dans le regain ou le remplacement de fonctionnalités du corps humain, un certain nombre de problèmes étaient toujours critiques : dégradation des matériaux dans le corps, problèmes de biocompatibilité ou problèmes liés aux propriétés mécaniques des matériaux utilisés demeuraient (Langer and Tirrell 2004).

#### 1.1.2.2.2. Les biomatériaux de 2<sup>nde</sup> génération – Les biomatériaux bioactifs

Les biomatériaux de 2<sup>nde</sup> génération dérivent des biomatériaux de première génération. Ils sont qualifiés de bioactifs en raison du fait qu'ils avaient pour but principal d'induire une réaction biologique contrôlée de la part des tissus dans lesquels ils étaient implantés. Les biomatériaux de 2<sup>nde</sup> génération incluent également

les matériaux résorbables ayant des taux de dégradation modulables en fonction des applications. Ces matériaux sont dégradés en produits non toxiques par le patient chez qui le biomatériau est implanté. L'un des exemples les plus utilisés de ces biomatériaux résorbables sont les sutures faites à base d'acide polyglycolique (PGA) qui ont l'avantage de se résorber complètement.

#### 1.1.2.2.3. Les biomatériaux de 3<sup>ème</sup> génération – Les biomatériaux favorisant la régénération tissulaire

Ces biomatériaux sont directement issus des grandes révolutions ayant eu lieu en biologie moléculaire dans les années 1970s, en génomique dans les années 1990s et enfin en protéomique dans les années 2000s (Huebsch and Mooney 2009). Ces biomatériaux marquent un tournant majeur dans la discipline : pour la première fois, le médecin peut régénérer des tissus. Son traitement n'est plus uniquement palliatif. En effet, le développement de biomatériaux de 3<sup>ème</sup> génération va de pair avec le développement de nouvelles disciplines telles que l'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative. L'ingénierie tissulaire est un terme qui englobe l'ensemble des outils à l'interface de l'ingénierie et des sciences biomédicales utilisant des cellules vivantes, ou attirant des cellules endogènes afin de régénérer des tissus ou développer des substituts fonctionnels de tissus endommagés (Langer and Vacanti 1993, Ratner, Hoffman et al. 2013).

#### 1.1.2.2.4. Les biomatériaux de 4<sup>ème</sup> génération – Les biomatériaux biomimétiques

Ces quatre dernières décennies, les innovations dans le domaine des biomatériaux et des technologies médicales ainsi que l'avènement de nouvelles disciplines telles que la médecine régénérative ou l'ingénierie tissulaire ont eu un impact durable, en particulier sur le développement de biopolymères. Ces innovations et nouvelles disciplines ont permis l'apparition d'une 4<sup>ème</sup> génération de biomatériaux : les biomatériaux dits biomimétiques ou intelligents. L'un des challenges de cette nouvelle génération de biomatériaux est de réussir à capturer le degré de complexité requis pour mimer l'environnement cellulaire afin de stimuler l'invasion, l'attachement et la prolifération cellulaire (Holzapfel, Reichert et al. 2013).

## 1.2. L'environnement extracellulaire

Dans un organisme pluricellulaire, les cellules évoluent dans un environnement donné, qui peuvent être bidimensionnel (2D) (cas des épithéliums) ou tridimensionnel (3D). Cet environnement cellulaire est défini par la présence d'autres cellules et d'une matrice extracellulaire. Si cette matrice a longtemps été perçue comme une structure physique passive des tissus, un certain nombre de découvertes, dont celle des intégrines, ont permis de comprendre son rôle actif et déterminant dans de nombreux processus cellulaires (Rozario and DeSimone 2010).

Cet environnement cellulaire est source de nombreux stimuli biochimiques et physiques, qui vont influencer les comportements des cellules (adhérence, migration, différenciation, etc.) à travers des voies de signalisation ou d'autres mécanismes tels que la mécano-transduction (**Chapitre 2 pour plus d'informations**). Cette influence de la matrice extracellulaire sur les comportements cellulaires a conduit à de nombreuses études de la composition et des propriétés physico-chimiques de la matrice extracellulaire au cours des cinquante dernières années.

### 1.2.1. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (ECM) est le composé non cellulaire présent dans tous les tissus et organes des métazoaires. Fondamentalement composée d'eau, de protéines et de polysaccharides, elle sert de support physique aux cellules et induit des signaux biochimiques et biomécaniques cruciaux pour la morphogénèse, la différenciation ou tout simplement l'homéostasie. Cette matrice est principalement composée de cellules constituant les tissus. De ce fait, sa composition chimique et les propriétés physico-chimiques qui lui sont

associées varient énormément d'un tissu à l'autre, au sein d'un même tissu et en fonction des états physiologiques et pathologiques de ceux-ci (jeune, âgé, sain, cancer, fibrose, etc).

## 1.2.2. Propriétés physico-chimiques de la matrice extracellulaire

La matrisome (ensemble de molécules constituant la matrice extracellulaire) des mammifères compte environ 300 protéines parmi lesquelles des protéines fibreuses comme le collagène ou l'élastine, des glycosaminoglycanes comme l'acide hyaluronique, des protéoglycanes et environ 200 glycoprotéines complexes (Hynes 2012, Hynes and Naba 2012, Bonnans, Chou et al. 2014). Ces macromolécules sont sécrétées par les cellules constituant les tissus (cellules osseuses, musculaires, épithéliales, etc.) notamment par des cellules spécialisées telles que les fibroblastes (Frantz, Stewart et al. 2010).

### 1.2.2.1. *Le collagène*

Le collagène correspond à la famille des protéines fibreuses, la plus abondante de l'organisme des métazoaires ; il représente plus de 30 % de la masse protéique totale d'un organisme (Frantz, Stewart et al. 2010). Le collagène est sécrété par les fibroblastes. La composition en collagène de l'ECM est un mélange très hétérogène de plusieurs types de collagène dont un type est prédominant selon la spécificité des tissus. Près de 28 types de collagènes ont à ce jour été identifiés chez l'humain (Mouw, Ou et al. 2014) ; ils sont organisés en fibres (collagène –I, -II et –III) ou en feuillettes (collagène –IV). Certains types de collagènes ne sont également observés que dans un tissu donné. Par exemple le collagène II n'est retrouvé que dans les articulations (Rosso, Giordano et al. 2004). Le collagène confère à la matrice extracellulaire une résistance aux forces de traction aux tissus et régule des comportements cellulaires tels que l'adhérence et la migration cellulaire.

### 1.2.2.2. *Les glycosaminoglycanes (GAGs)*

Les glycosaminoglycanes, également appelé GAGs, sont des polysaccharides linéaires, sulfatés ou non, formés par des répétitions d'un groupe di-saccharidiques constitué d'un acide uronique et d'une hexosamine. Les GAGs sont des polymères chargés très négativement en raison de la présence en abondance de groupes hydroxyles, carboxyles et, dans certains cas, sulfates. Cette particularité rend les GAGs actifs d'un point de vue osmotique : ils attirent les ions  $\text{Na}^+$  et, par conséquent, l'eau. Les GAGs sont ainsi associés à un comportement très hydrophile (Rosso, Giordano et al. 2004, Rozario and DeSimone 2010).

Ils confèrent à la matrice extracellulaire sa résistance aux forces de compression et jouent un rôle clé dans la protection des cellules en maintenant une hydratation optimale et l'homéostasie des tissus. Les GAGs à l'exception de l'acide hyaluronique se lient généralement à des protéines dites « protéine-cœur » pour former des protéoglycanes.

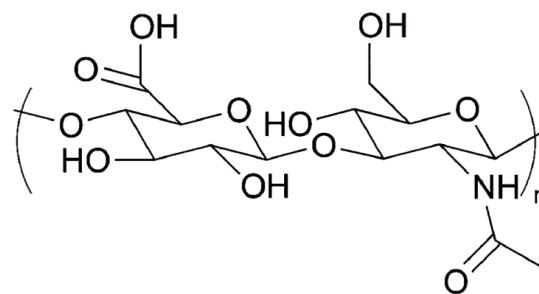
#### 1.2.2.2.1. *Les protéoglycanes (PGs)*

Les protéoglycanes sont composés d'une protéine « cœur » à laquelle se rattachent de manière covalente de nombreuses chaînes de glycosaminoglycanes comme l'héparan-sulfate (HSPG), la chondroïtine sulfate (CSPG), le dermatan sulfate ou le keratan-sulfate, etc. Les HSPGs composent principalement les membranes basales. Leur forte charge négative permet de lier des facteurs de croissance, des chimiokines ainsi que d'autres protéines de l'ECM comme les laminines et les fibronectines. Les CSPGs sont principalement retrouvés dans les cartilages où ils confèrent une importante résistance aux forces de compression (Mouw, Ou et al. 2014).

#### 1.2.2.2.2. L'acide hyaluronique (HA)

L'acide hyaluronique (HA en anglais *Hyaluonic acid*) est un polysaccharide non sulfaté constitué d'un grand nombre de répétitions d'un groupe di-saccharidique (jusqu'à plusieurs milliers), composé d'acide D-glucuronique et de N-acetyl-D-glucosamine reliés par des liaisons osidiques en  $\beta$ -1,4 et  $\beta$ -1,3 (**Figure 1-2**). Sa structure simple est très conservée chez les mammifères, ce qui suggère fortement l'importance du HA dans les processus biologiques. L'acide hyaluronique est un polymère chargé très négativement. Cette charge négative induit une attirance importante pour les ions  $\text{Na}^+$  et, par conséquent, pour l'eau. Le HA est considéré comme l'une des molécules les plus hydrophiles présentes dans la nature. Cette propriété permet à l'ECM de maintenir les tissus fortement hydratés et lui confère également une importante capacité de résistance aux forces de compression s'exerçant sur les tissus.

Découvert en 1934 par Karl Mayer & John Palmer, le HA est présent dans tous les tissus conjonctifs. Il est particulièrement concentré dans le liquide synovial (dans les articulations), le corps vitré (un élément de l'œil), ou encore le cordon ombilical. Le HA est un élément important de l'environnement cellulaire et joue un rôle clé dans de nombreux processus biologiques tels que l'angiogenèse, la cicatrisation et l'adhérence des cellules par l'activation de nombreuses voies de signalisation cellulaires correspondantes, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire. (Rosso, Giordano et al. 2004, Necas, Bartosikova et al. 2008, Kharkar, Kiick et al. 2013).



**Figure 1-2** | Structure moléculaire de l'acide hyaluronique. L'acide hyaluronique est constitué d'une répétition de deux sucres, d'acide D-glucuronique et du N-acetyl-D-glucosamine, reliés par des liaisons osidiques  $\beta$ -1,4 et  $\beta$ -1,3. (Kharkar, Kiick et al. 2013)

En raison de sa présence dans la plupart des tissus conjonctifs, des épithéliums et des tissus neuronaux, l'acide hyaluronique est un polymère naturel de choix utilisé en ingénierie tissulaire et pour le développement de nouveaux biomatériaux (**1.3.3.2**).

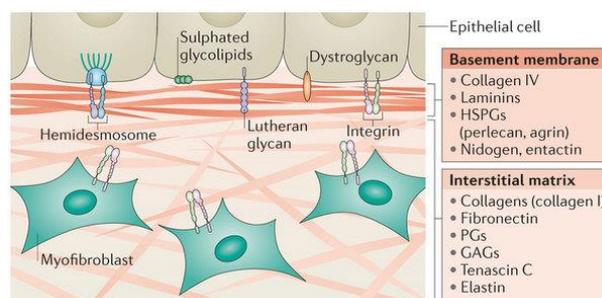
#### 1.2.2.3. Les glycoprotéines

Les glycoprotéines rassemblent plusieurs familles de protéines ayant une importante diversité de fonctions et disposant de multiples domaines d'interactions leur permettant d'interagir avec le collagène, les PGs et GAGs et surtout avec la surface cellulaire. Les glycoprotéines sont composées de multiples chaînes codées par des gènes simples ou distincts. Si la structure des glycoprotéines et les relations phylogénétiques des gènes les encodant varient énormément d'une famille de glycoprotéines à une autre, elles partagent des fonctions et des motifs structurels analogues. Parmi ces motifs structurels, nous retrouvons le motif RGD, composé de 3 acides aminés (Arg-Gly-Asp), reconnu par les cellules dans leurs processus d'adhérence. Ces glycoprotéines sont capables de lier les autres composants de l'ECM (les GAGs, les PGs et le collagène notamment). Les fibronectines, les laminines, les élastines, les thrombospondines, les tenascines et les vitronectines constituent les principales familles de glycoprotéines.

Les **fibronectines** jouent un rôle majeur dans l'adhérence, la migration et la différenciation cellulaire. Elles disposent de plusieurs sites de liaison avec la surface cellulaire parmi lesquels les motifs RGD (Arg-Gly-Asp), les RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser), LDV (Leu-Asp-Val), etc. En raison de la présence des domaines de liaison, les fibronectines sont utilisées en culture cellulaire dans le but de faciliter l'attachement des cellules. Les **laminines**, comme leur nom l'indique, se retrouvent principalement au niveau des membranes basales. Elles sont caractérisées par une forte affinité de liaison avec les récepteurs cellulaires ainsi que l'héparine et le collagène de type –IV (constituants majeurs de la membrane basale). Elles disposent également de séquences similaires à celles des facteurs de croissances comme l'EGF (en anglais *Epidermal Growth Factor*) qui, une fois les laminines dégradées, vont stimuler la prolifération et la différenciation cellulaire. Elles sont également utilisées en culture cellulaire pour augmenter l'attachement et l'étalement cellulaire.

### 1.2.3. Organisation de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire existe sous deux formes (**Figure 1-3**) qui vont influencer sa fonction : la matrice extracellulaire interstitielle et la membrane basale. La matrice extracellulaire interstitielle est présente dans les tissus conjonctifs, elle est principalement composée de collagène de type –I et de fibronectines. La membrane basale est une structure particulière, qui sépare l'épithélium du stroma voisin. Composée de collagène de type –IV, de laminines et de HSPGs, la membrane basale réagit avec les récepteurs cellulaires comme les hémidesmosomes.

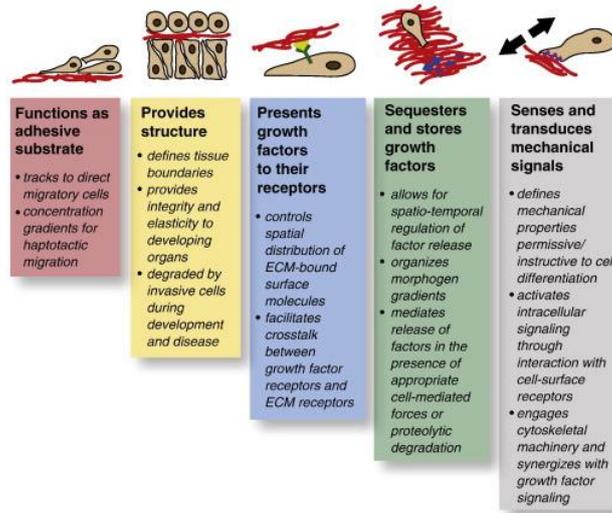


**Figure 1-3 | L'organisation de la matrice extracellulaire.** La matrice extracellulaire existe sous deux formes qui vont fortement influencer son rôle. La membrane basale est une organisation de la matrice extracellulaire permettant de faire barrière entre un épithélium et son stroma. Elle est principalement composée de collagène -IV, de laminines et de HSPGs. Adaptée de (Bonnans, Chou et al. 2014).

La matrice extracellulaire est une structure hautement dynamique en constante évolution et remodelée par des métalloprotéinases (Bonnans, Chou et al. 2014). Sa formation et son remodelage sont issus d'un dialogue entre l'environnement à un moment donné et les réponses cellulaires induites par cet environnement. Un remodelage aberrant ouvre la voie à de nombreuses pathologies telles que les fibroses.

### 1.2.4. Rôles de la matrice extracellulaire

L'importance du rôle de la matrice extracellulaire est démontrée par l'important éventail de pathologies et de létalités liées aux mutations et modifications des gènes codant pour les protéines de l'ECM (Rozario and DeSimone 2010). La matrice extracellulaire joue un rôle important dans la régulation du développement, la fonction et l'homéostasie de toutes cellules eucaryotes (**Figure 1-4**). En plus de fournir un support physique aux cellules, elle participe à l'établissement, la séparation et au maintien des différents tissus et organes. En effet, elle permet de réguler l'abondance de facteurs de croissance à un moment donné, le taux d'hydratation ou encore le pH de l'environnement local (Rozario and DeSimone 2010, Mouw, Ou et al. 2014).



**Figure 1-4 | Les rôles de la matrice extracellulaire.** La matrice extracellulaire joue de nombreux rôles dans le développement et le maintien de l'homéostasie des tissus. Elle fonctionne comme un substrat permettant aux cellules d'adhérer, fournit une structure aux tissus, agit comme réservoir de facteurs de croissance et permet surtout de transmettre des signaux biochimiques et biophysiques aux cellules induisant des réponses spécifiques. (Rozario and DeSimone 2010).

### 1.3. Les hydrogels, un outil de choix pour mimer la matrice extracellulaire

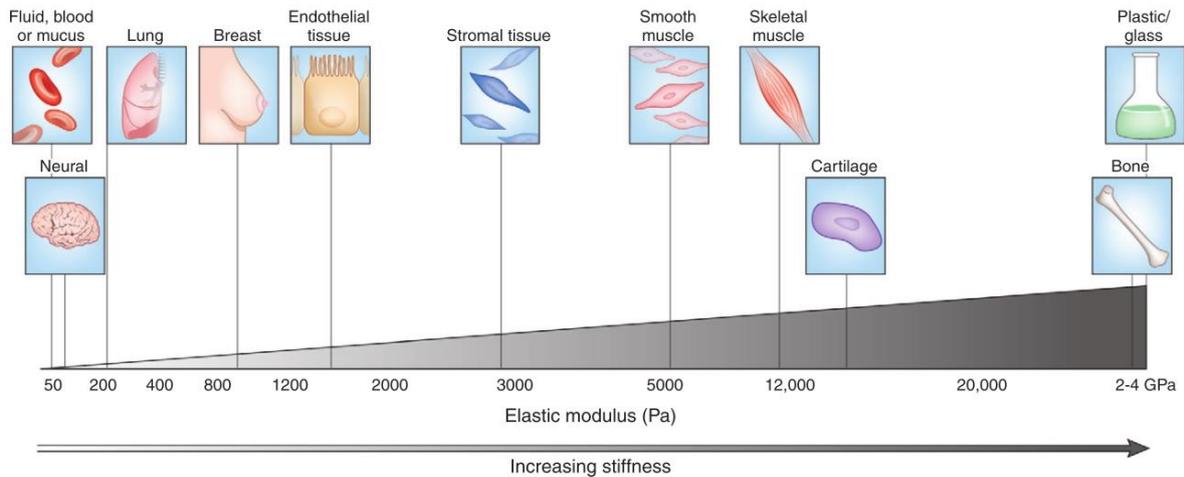
Comme indiqué précédemment, les cellules reçoivent des signaux biochimiques et biophysiques (mécaniques et topologiques) de la part de leur environnement cellulaire. Cet environnement va ainsi leur dire quoi faire et surtout quand le faire. La compréhension et, par la suite, la maîtrise de ce dialogue continu entre les cellules et leur environnement sont essentielles pour régénérer des tissus dont les fonctions seront les plus proches de celles rencontrées *in vivo*.

Si le design des biomatériaux s'est longtemps concentré sur leur composition chimique au cours des dernières décennies, une attention toute particulière est désormais donnée aux propriétés physiques de ces derniers comme leur topographie ou leur rigidité (Huebsch and Mooney 2009, Mitragotri and Lahnann 2009). Depuis un peu moins d'une vingtaine d'années, de nombreuses études scientifiques se sont intéressées aux réponses cellulaires aux propriétés mécaniques de leurs substrats (Pelham and Wang 1997, Lo, Wang et al. 2000, Discher, Janmey et al. 2005, Engler, Sen et al. 2006, Levental, Georges et al. 2007). Dans le cadre de ces études, et en parallèle aux développements de l'ingénierie tissulaire, de nombreux nouveaux matériaux ont été développés présentant de nombreux avantages (biocompatibilité, utilisation tridimensionnelle, etc.) et inconvénients (dégradation non contrôlée, etc.) selon l'utilisation souhaitée (Gribova, Cruzier et al. 2011, Kharkar, Kiick et al. 2013).

#### 1.3.1. Mimer la matrice extracellulaire

Dans un organisme donné, chaque tissu et organe a ses propres propriétés mécaniques et notamment sa propre rigidité (**Figure 1-5**). Ces dernières découlent directement des propriétés mécaniques de la matrice qui les compose. Au sein d'un organisme, les cellules (à l'exception des cellules épithéliales) évoluent le plus souvent dans un environnement 3D entouré de matrice, mais aussi d'autres cellules du même type ou non. En culture cellulaire, les cellules, qu'elles soient épithéliales ou non, sont généralement cultivées dans des conditions relativement lointaines de leurs conditions *in vivo* : en 2D sur des substrats beaucoup plus rigides que leurs tissus d'origine, en monoculture, etc. Une importante partie des interactions intervenant

en 3D ou entre des cellules de différents types sont ainsi tout simplement ignorées. C'est également le cas des signaux mécaniques qui étaient dans la majorité des cas totalement oubliés et inexploités.



**Figure 1-5 | Rigidités des tissus biologiques.** La rigidité d'un matériau est caractérisée par son module élastique (ou module de Young) exprimé en Pa varie significativement selon les tissus et est directement liée à la fonction de ces derniers. Le corps humain est composé de tissus très mous comme le cerveau, des tissus plus rigides comme la peau, les muscles ou très durs comme les os (Cox and Erler 2011).

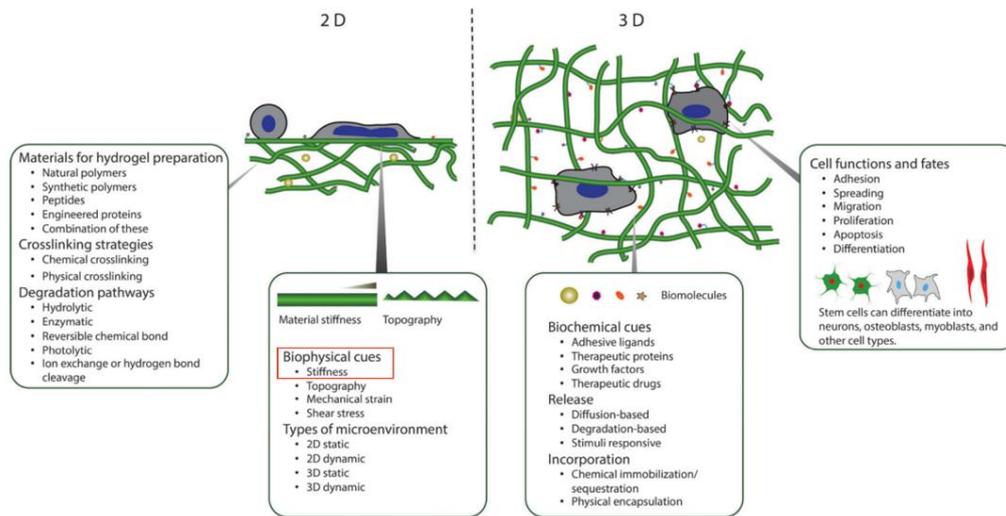
La rigidité d'un matériau biologique est caractérisée par le Module de Young, également appelé module d'élasticité, noté  $E$  et exprimé en Pascal (Pa). Plus un module de Young est élevé, plus le matériau est rigide. Les organes présents dans le corps humain sont composés de tissus très mous comme le cerveau (environ 50 Pa), plus rigides comme les muscles squelettiques (environ 12kPa) et très rigides comme les os (environ 2 GPa). Ces élasticités sont généralement mesurées par élastographie (Ophir, Céspedes et al. 1991). Afin de se rapprocher au plus près des conditions mécaniques *in vivo*, de nouveaux biomatériaux de type hydrogels ont été développés pour l'ingénierie tissulaire.

### 1.3.2. Les hydrogels

Les hydrogels sont composés de réseaux de polymères caractérisés par une propension à retenir l'eau entre leurs chaînes. Ils peuvent absorber jusqu'à 1 000 fois leur poids sec en eau. Ils ont pour avantage d'exister sous toutes les formes géométriques et dans toutes les dimensions. Cette diversité de formes et de dimensions combinée à des propriétés physico-chimiques polyvalentes leur permettent d'être utilisés comme implants, biosenseurs ou encore comme facteurs de libération de molécules bioactives, mais également dans les recherches sur le cancer et les cellules souches, les thérapies cellulaires ou encore l'ingénierie tissulaire.

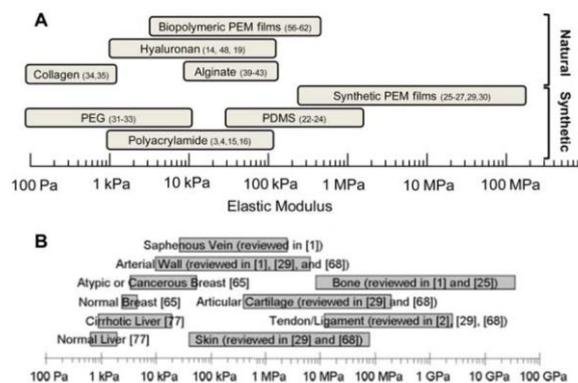
Les hydrogels sont composés de polymères naturels ou synthétiques. L'utilisation de polymères naturels (**1.3.3**) comme les polysaccharides tels le collagène, l'acide hyaluronique, le chitosan, l'alginate, la gélatine, etc... est idéale pour mimer les propriétés physico-chimiques de la matrice extracellulaire. Cependant, ces polymères naturels présentent quelques inconvénients : il est ainsi difficile de modifier les propriétés mécaniques et plus particulièrement leur rigidité ou de contrôler leur dégradation dans l'organisme. Les polymères synthétiques (**1.3.4**) comme le polyacrylamide, le polyéthylène glycol etc. présentent l'avantage d'offrir de nombreuses possibilités de modulation de leur rigidité. Ils offrent également une reproductibilité bien plus importante que les polymères naturels. Néanmoins, ces polymères synthétiques posent d'autres problèmes : une biocompatibilité et une biodégradabilité moindre que celle des polymères naturels. Une

solution a été trouvée, celle de combiner polyélectrolytes naturels et synthétiques pour développer de nouveaux hydrogels permettant un contrôle précis des propriétés de l'environnement cellulaire (**Figure 1-6**) et plus particulièrement de l'ECM (Gribova, Crouzier et al. 2011, Kharkar, Kiick et al. 2013).



**Figure 1-6| Les hydrogels, un outil de choix pour mimer l'ECM.** De nombreux hydrogels ont été développés ces 20 dernières années à partir de polymères naturels et synthétiques. Ils peuvent incorporer ou non des peptides. Ces hydrogels sont réticulés par réactions chimiques et physiques. Ils permettent le contrôle indépendant de nombreuses propriétés des matrices extracellulaires telles que la rigidité ou la topographie en 2D comme en 3D (Kharkar, Kiick et al. 2013).

Le module élastique des hydrogels est le plus souvent mesuré par rhéologie, par des tests de traction et par nano-indentation (**1.5.1**). La rigidité des hydrogels peut être modulée durant la formation de l'hydrogel en variant le pH ou la concentration d'un des constituants ou après construction des hydrogels par des réticulations chimiques ou physiques. L'éventail des hydrogels existant aujourd'hui couvre l'ensemble de la gamme des tissus humains (**Figure 1-7**) (Gribova, Crouzier et al. 2011).



**Figure 1-7| Rigidité des hydrogels développés en comparaison aux tissus biologiques.** A. Les hydrogels synthétiques et naturels couvrent une élasticité comprise entre 100 Pa et 100 MPa. B. Les tissus d'un organisme ont des élasticités comprises entre 50 Pa à plusieurs Ga (Gribova, Crouzier et al. 2011).

Depuis les travaux pionniers dans les années 1960s effectués par Wichterle & Lim et la première utilisation d'hydrogels dans le domaine biomédical sous la forme de lentilles de contact à base de poly-2-hydroxy-ethylmethacrylate (polyHEMA), les hydrogels font face à un vif intérêt et se développent rapidement (Hoffman 2012, Caló and Khutoryanskiy 2015).

### 1.3.3. Hydrogels naturels

Les hydrogels naturels ont l'avantage d'être constitués de polymères et des protéines entrant dans la composition de l'ECM comme le collagène, l'acide hyaluronique, les fibrines ou encore l'héparine. D'autres polymères produits par d'autres organismes sont également utilisés comme le chitosan et l'alginate. Les hydrogels naturels ont l'avantage d'être par leur structure et leur organisation similaire aux tissus biologiques. Cependant, s'il est difficile de moduler la rigidité de ces hydrogels, ces hydrogels posent d'autres questions : comment découpler l'effet de la mécanique des hydrogels de celui de la bioactivité de ces molécules biologiques ?

#### 1.3.3.1. *Collagène*

Le collagène étant une macromolécule présente majoritairement dans l'ensemble des tissus du corps humain de la vessie aux valves cardiaques en passant par la peau ou encore le foie (**1.2.2.1**), les hydrogels à base de collagène ont particulièrement été étudiés (Geckil, Xu et al. 2010). La modulation de la rigidité de ces gels se fait lors de leur formation en variant le pH ou la concentration de collagène. Leur module élastique est compris entre 5 et 1 000 Pa (Gribova, Crouzier et al. 2011).

#### 1.3.3.2. *Acide hyaluronique (HA)*

L'acide hyaluronique (HA) est un glycosaminoglycane entrant dans la composition de l'ECM (**1.2.2.2**) ; il est retrouvé en grande quantité dans le liquide synovial, les cartilages etc... S'il présente l'avantage d'être très biocompatible, le HA est faiblement rigide : les hydrogels à base de HA requièrent le plus souvent une réticulation chimique de type NHS/EDC (**1.4.3.1 pour plus d'informations**) ou l'ajout de groupes thiols. Le module élastique de ces gels est compris entre 1 et 100 kPa. Les hydrogels à base d'acide hyaluronique sont très utilisés en ingénierie biomédicale pour la régénération de valves cardiaques, la libération contrôlée de molécules bioactives ou encore le contrôle du comportement des cellules souches (Necas, Bartosikova et al. 2008, Burdick and Prestwich 2011, Gribova, Crouzier et al. 2011, Kharkar, Kiick et al. 2013).

Le HA utilisé pour la construction de ces hydrogels a une multitude d'origines ; il est généralement isolé à partir de crête de coqs, de peau de requins, de globe oculaire bovin ou encore de cordons ombilicaux humains, induisant de nombreuses variations de poids moléculaire d'un échantillon à un autre. Des problèmes d'impureté existent également, cependant les nouvelles technologies permettent aujourd'hui d'obtenir un HA par fermentation bactérienne dont la masse moléculaire est relativement stable (Xu, Jha et al. 2012).

#### 1.3.3.3. *Chitosan*

Le chitosan est un polysaccharide désacétylé dérivant de la chitine. La chitine est une macromolécule produite par les champignons et les arthropodes ; elle constitue même la cuticule de nombreux insectes. L'unité structurale du chitosan est proche de celle des glycosaminoglycane composant l'ECM. Il présente de nombreux avantages comme le fait d'être à la fois biocompatible, biodégradable et antimicrobien, qui en font un outil de choix pour la réparation de tissus endommagés, la libération de molécules bioactives ou encore l'encapsulation de cellules vivantes (Kharkar, Kiick et al. 2013).

#### 1.3.3.4. *Alginates*

Les alginates sont des polysaccharides linéaires chargés négativement ayant pour propriété de former un gel en présence de cations bivalents (comme les ions calcium  $\text{Ca}^{2+}$ ). Ces polysaccharides sont issus d'algues brunes de la classe des *Phaeophyceae* et, plus particulièrement, les *Laminaria sp.* Leur unité structurale est sujet à des variations selon le type d'algues dont ils proviennent. Son manque d'interactions naturelles avec

les cellules requiert une fonctionnalisation via l'incorporation de ligands de type RGD à sa surface. Son utilisation *in vivo* pose encore aujourd'hui quelques difficultés. En effet, les produits de dégradation des alginate sont trop grands pour être filtrés par les reins (Gribova, Cruzier et al. 2011). Les gels à base d'alginate sont principalement utilisés dans le biomédical comme vecteurs de libération de protéines et de médicaments ainsi que comme pansement ; ils sont également utilisés comme modèle de substrat 2D et 3D en culture cellulaire (Lee and Mooney 2012).

#### 1.3.3.5. *Fibrines*

Les gels à base de fibrines sont constitués de protéines non fibreuses issues de la polymérisation enzymatique du fibrinogène. Ces protéines entrent dans la composition de l'ECM. Leurs faibles propriétés mécaniques restreignent leur usage à l'ingénierie tissulaire et l'encapsulation de cellules vivantes (Kharkar, Kiick et al. 2013).

#### 1.3.3.6. *Héparine*

L'héparine est une macromolécule entrant dans la composition de l'ECM, largement utilisée pour la fabrication d'hydrogels. L'héparine a l'avantage d'être la macromolécule chargée le plus négativement du monde vivant. Cette particularité lui permet de lier de manière ionique des molécules bioactives comme des facteurs de croissance. Ayant un effet anticoagulant très prononcé, l'utilisation *in vivo* de gels à base d'héparine peut avoir des effets néfastes sur l'organisme hôte allant de faibles saignements au priapisme. Néanmoins, ils peuvent être utilisés comme vecteurs de libération de molécules et pour l'encapsulation de cellules (Kim, Lee et al. 2010). L'utilisation de ces gels se concentre sur la culture cellulaire, où ils sont utilisés pour comprendre le fonctionnement et le destin des cellules (Kharkar, Kiick et al. 2013).

#### 1.3.3.7. *Autres polymères naturels*

Un certain nombre d'autres polymères naturels sont utilisés dans la formation d'hydrogels. Ainsi, des gels à base de gélatine, de chondroïtine sulfate, d'agarose, de carraghénane, de dextrane (Gribova, Cruzier et al. 2011, Kharkar, Kiick et al. 2013) ou, plus surprenant, de soie (Kapoor and Kundu 2016) sont utilisés pour une myriade d'applications biomédicales allant de l'ingénierie tissulaire des cartilages aux cordes vocales en passant par la peau et la moelle épinière.

### 1.3.4. Hydrogels synthétiques

Les hydrogels synthétiques présentent, tel que mentionné précédemment, l'avantage d'être facilement modifiables par réactions chimiques ou physiques et l'inconvénient d'être bien moins biocompatibles et biodégradables que leurs homologues naturels. Les hydrogels synthétiques sont très utilisés dans l'étude des réponses cellulaires aux paramètres physiques comme la rigidité et la topologie du substrat (Nemir and West 2010, Gribova, Cruzier et al. 2011).

#### 1.3.4.1. *Polyacrylamide (PA)*

Largement utilisés en biologie comme gels d'électrophorèse, les gels de polyacrylamides ont été, il y a près de 20 ans, les premiers hydrogels utilisés pour étudier les effets de la rigidité du substrat sur le comportement cellulaire (Pelham and Wang 1997). La modulation de la rigidité de ces hydrogels se fait généralement lors de la formation du gel en modifiant la proportion de l'un des réactants : le bis-acrylamide. Très populaire, il est utilisé pour observer l'effet de la rigidité sur de nombreux comportements cellulaires comme la morphologie, l'attachement, la migration ou encore la différenciation. Il présente l'avantage d'être chimiquement inerte. Cependant, cet avantage peut tourner en sa défaveur dans des expériences d'adhérence cellulaire. Il peut alors requérir l'ajout de ligand de type RGD dans le but de favoriser l'attachement cellu-

laire. Les hydrogels à base de PA sont uniquement utilisés comme substrat 2D en raison de la cytotoxicité de l'acrylamide (Gribova, Crouzier et al. 2011).

#### 1.3.4.2. Polydimethylsiloxane (PDMS)

Les hydrogels à base de PDMS sont des matériaux non toxiques ayant de bonnes propriétés élastiques. Cette grande habilité à la déformation en fait un hydrogel utilisé dans les expériences d'étirement des cellules. Il présente le désavantage d'absorber les protéines du sérum induisant des attachements cellulaires non spécifiques. Pour y remédier, les gels à base de PDMS sont généralement fonctionnalisés à l'aide de ligands RGD. Les gels de polydimethylsiloxane sont uniquement utilisés en tant que substrat 2D. En effet, leur haute densité restreint la migration cellulaire au sein du gel dans une utilisation 3D.

#### 1.3.4.3. Poly(éthylène glycol) (PEG)

Les hydrogels à base de poly(éthylène glycol) ont l'avantage de pouvoir être utilisés comme substrat 3D en culture cellulaire. En effet, contrairement aux autres polymères synthétiques qui sont très denses, faiblement poreux et peu biodégradables, les hydrogels à base de PEG peuvent être localement dégradés par les cellules, ce qui leur permet de migrer. Super hydratés et peu chargés, ils n'absorbent pas des protéines du sérum. Ils peuvent facilement être fonctionnalisés par le biais de ses groupes hydroxyyles.

#### 1.3.4.4. Autres polymères synthétiques

Un certains nombres d'autres polymères synthétiques sont utilisés pour former des hydrogels dans un but de mimétisme de l'ECM. Les matériaux à base de polyHEMA très hydrophiles et stables ont été les premiers à être utilisés comme lentille de contact. D'autres matériaux comme le poly(vinyl alcohol) (PVA) sont également utilisés à cette fin. Les gels à base de PVA sont de plus utilisés comme facteurs de libération contrôlée de médicaments et de protéines ainsi que dans la réparation du cartilage. D'autres hydrogels à base de polyesters, qui présentent l'avantage d'être hydrolysés en conditions physiologiques, sont également utilisés pour la libération contrôlée de molécules bioactives (Kharkar, Kiick et al. 2013).

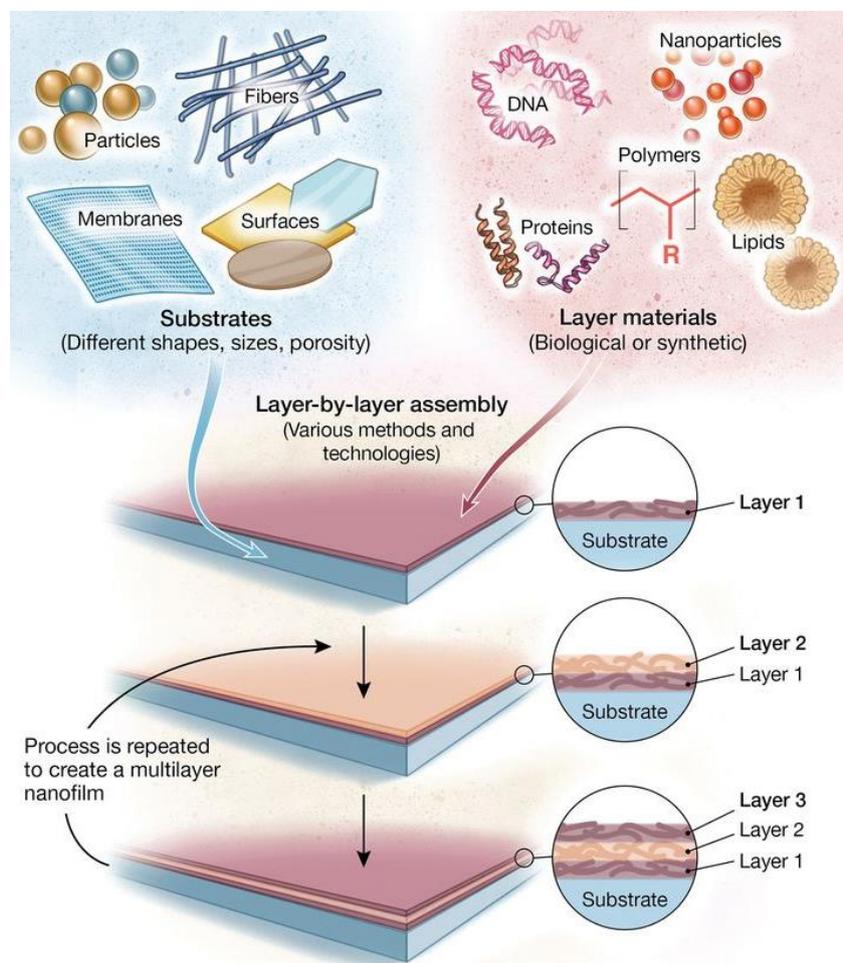
## 1.4. Les films multicouches

Comme indiqué auparavant (**1.1.2.2.4**), le design de nouveau biomatériaux s'intéresse aux propriétés de surface de ces derniers. En effet, ces propriétés de surface que sont la rigidité ou la topographie influencent l'intégration des biomatériaux dans les tissus et les événements cellulaires associés (adhérence, migration, etc.). Si les hydrogels cités précédemment présentent d'importantes possibilités de modulation de leur rigidité dans le but d'induire une réaction biologique donnée, ils sont beaucoup trop épais pour couvrir les biomatériaux utilisés classiquement comme les métaux, les céramiques et les polymères (**1.1**). Face à la nécessité de films fins permettant un contrôle à l'échelle du nanomètre de l'épaisseur de ce dernier, des films très fins ont été développés comme les films Langmuir-Blodgett ou les monocouches auto-assemblées (SAM, en anglais, *Self-Assembly Monolayer*). Cependant ces films présentent de nombreuses limitations restreignant leurs usages dans le domaine biomédical. En effet, les films de Langmuir-Blodgett requièrent un long temps de préparation et sont limités dans les biomolécules qui les composent alors que les SAM sont limités en termes de substrats (or, etc.) et de stabilité en conditions physiologiques (Tang, Wang et al. 2006, Boudou, Crouzier et al. 2010). Une nouvelle technique introduite dans les années 1990s par Decher va révolutionner ce domaine : les films multicouches (**Figure 1-8**).

La construction des films multicouches (LbL, en anglais, *Layer-by-Layer*) est basée sur l'exposition successive d'un substrat donné à des polymères chargés positivement et négativement qui s'auto-assemblent pour former une bicouche de quelques nanomètres selon le couple de polymères utilisés. Ces étapes

d'auto-assemblage sont espacées par des étapes de rinçage. Le processus peut être répété un grand nombre de fois permettant une régulation de l'ordre du nanomètre de l'épaisseur du film. Généralement appliqués à des systèmes polyélectrolyte/polyélectrolyte, les LbL forment alors des films multicouches de polyélectrolytes (PEM, en anglais *PolyElectrolytes Multilayers*). Si l'auto-assemblage de ces films repose principalement sur les interactions électrostatiques entre des polymères chargés différemment, d'autres interactions comme les liaisons hydrogènes ou les transferts de charges entrent en jeu (Tang, Wang et al. 2006, Richardson, Björnmalm et al. 2015). Plusieurs techniques permettent de construire (1.4.2) et de moduler la rigidité (1.4.3) des PEM obtenus.

Ces films ont attiré l'attention et ouvert la voie à de nouvelles applications biomédicales en raison de leur facilité de préparation, leur polyvalence, leur capacité à incorporer différents types de molécules bioactives, du contrôle précis de leur structure et surtout de leur résistance aux conditions physiologiques et plus important encore, sont capables de couvrir des matériaux non planaires comme des fibres ou des particules.



**Figure 1-8 | Assemblage de films multicouches LbL.** Les films LbL peuvent être construits sur une variété importante de formes, de tailles et de porosité de substrats. Les multicouches sont formés de matériels synthétiques ou biologiques comme par exemples les polyélectrolytes (les films sont alors appelés films multicouches de polyélectrolytes), de protéines, de lipides, de nanoparticules etc. La construction des films se fait par le dépôt d'une première couche d'un matériel suivi par une seconde couche d'un autre matériel formant une bicouche de quelques nanomètres selon la nature des matériaux utilisés. Le processus est répété un certain nombre de fois jusqu'à l'obtention d'un film ayant l'épaisseur souhaitée (de quelques nanomètres à plusieurs micromètres). Figure

adaptée de (Richardson, Björnalm et al. 2015).

### 1.4.1. Focus sur les films multicouches de polyélectrolytes

Les films multicouches de polyélectrolytes sont des films LbL composés de polymères portant une charge positive ou négative en solution, les polyélectrolytes. Il existent deux grand types de PEM : les films à croissance exponentielle comme les films  $(PLL/HA)_n$  et les films à croissance linéaire comme les films  $(PSS/PAH)_n$  (Porcel, Lavallo et al. 2006).

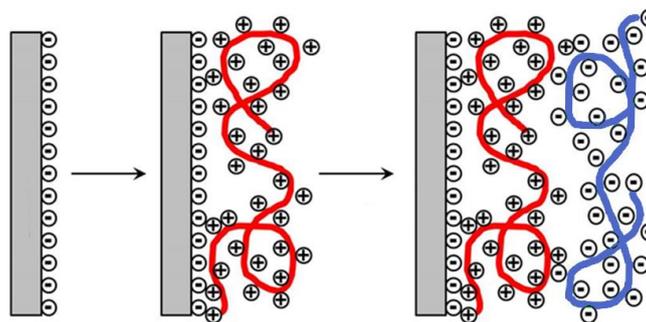
Outre le fait qu'ils soient faciles à préparer et stables en conditions physiologiques, les PEM présentent également une caractéristique commune à l'environnement cellulaire : une organisation spontanée (Tang, Wang et al. 2006). Ces différentes caractéristiques en font des éléments très utilisés en biologie, notamment dans la caractérisation des effets de la rigidité sur le comportement cellulaire (Richert, Lavallo et al. 2002, Boudou, Crouzier et al. 2011), en ingénierie tissulaire et comme traitement de surface (enduction) de biomatériaux classiques.

### 1.4.2. Préparation des films multicouches de polyélectrolytes

Quelle que soit la méthode de préparation choisie : par immersion, centrifugation, pulvérisation, électromagnétique, etc. , le principe de préparation des films LbL reste le même.

#### 1.4.2.1. Principe de construction des films multicouches

Le principe de construction LbL introduit par Decher repose principalement sur les interactions électrostatiques entre un polymère chargé positivement, un polycation et un polymère chargé négativement, un polyanion (Decher 1997). Pour construire un film LbL à la surface d'un matériau, une propriété bien connue de ces derniers est utilisée. En effet, de nombreuses surfaces comme celles des métaux, des silicones ou encore du verre sont chargées négativement en solution en raison de l'oxydation de surface et de l'hydrolyse. Le matériau est exposé au contact d'une solution de polycations. Des liaisons électrostatiques vont se former entre les charges négatives présentes à la surface du matériau et les charges positives du polycation. Ce dernier est ensuite rincé pour enlever les polycations qui n'ont pas réagi. L'ensemble est ensuite mis au contact avec une solution de polyanions qui vont réagir avec les polycations présents à la surface du matériau avant d'être à nouveau rincé, etc. (**Figure 1-9**) (Tang, Wang et al. 2006).

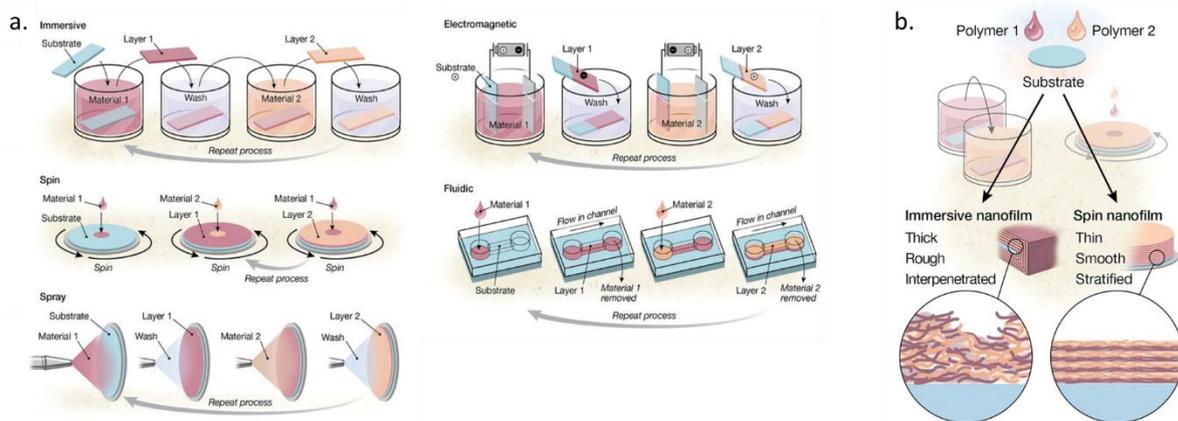


**Figure 1-9|Principe de construction des LbL introduit par Decher.** En solution, la surface de nombreux matériaux est chargée négativement, principalement en raison de l'hydrolyse et de l'oxydation de surface. Cette charge négative va permettre des interactions électrostatiques avec un polymère chargé positivement pour former une première couche à la surface du matériau. Après rinçage, les polycations en surface vont réagir avec des polyanions afin de former une seconde couche. Le cycle se répète un certain nombre de fois jusqu'à l'obtention d'un film multicouche d'une épaisseur comprise entre quelques nanomètres et quelques microns. Figure adaptée de (Tang, Wang et al. 2006)

### 1.4.2.2. Méthodes de préparation

De nombreuses méthodes de préparations des films LbL reposant sur le principe décrit ci-dessus existent (**Figure 1-10 a.**) : construction par immersion (*dip coating*), par centrifugation (*spin coating*), par pulvérisation (*spray coating*), assemblage électromagnétique, assemblage fluïdique ou encore électrodéposition (Richardson, Björnmalm et al. 2015).

La technique de préparation des films par **immersion** ou **dip coating** est la technique la plus utilisée. Elle se fait généralement de manière manuelle : le substrat est plongé dans une solution de polyélectrolytes, puis rincé, pour supprimer les espèces chimiques n'ayant pas réagi. Les films obtenus par cette méthode sont relativement épais, homogène et les différentes couches sont interpénétrées. La technique de préparation par **spin coating** ou **centrifugation** permet d'obtenir des films plus fins, plus organisés et plus stratifiés que par immersion en raison des forces de centrifugation, qui permettent de retirer les polyélectrolytes faiblement liés et induisent une déshydratation du film. Cette technique a l'avantage d'être plus rapide que la construction par immersion (30 secondes par couches en moyenne contre plusieurs minutes dans le cas de l'immersion) mais est limitée : en effet, elle ne permet de couvrir que très difficilement des surfaces non planes (**Figure 1-10 b.**).



**Figure 1-10 | Principales méthodes de construction de films LbL.** De nombreuses méthodes de constructions des films LbL ont été développées ces 20 dernières années ; les plus utilisées sont les méthodes de construction par immersion (*dip coating*), centrifugation (*spin coating*), pulvérisation (*spray coating*), assemblage électromagnétique ou encore fluïdique (a.). Les films construits par centrifugation (*spin coating*) sont plus fins, mous et stratifiés que les films construits par immersion (*dip coating*) mais limités à des surfaces planes (b.). Adaptée de (Richardson, Björnmalm et al. 2015)

La préparation par **spray coating** consiste à déposer de manière séquentielle les polymères sur un substrat sous la forme d'aérosols. Cette technique, très rapide (environ 6 secondes par couche) permet d'obtenir des films très organisés. Elle permet également de couvrir de grande surface et des surfaces de forme variée même si le traitement de surface complexe continue de se faire par immersion. Les méthodes de préparation **électromagnétique** et **fluïdique** sont plus compliquées à mettre en œuvre, car elles nécessitent un outillage spécifique. Elles restent toutefois très intéressantes, car elles offrent de nouvelles approches des films LbL (Richardson, Björnmalm et al. 2015).

### 1.4.3. Modulation de la rigidité des films multicouches

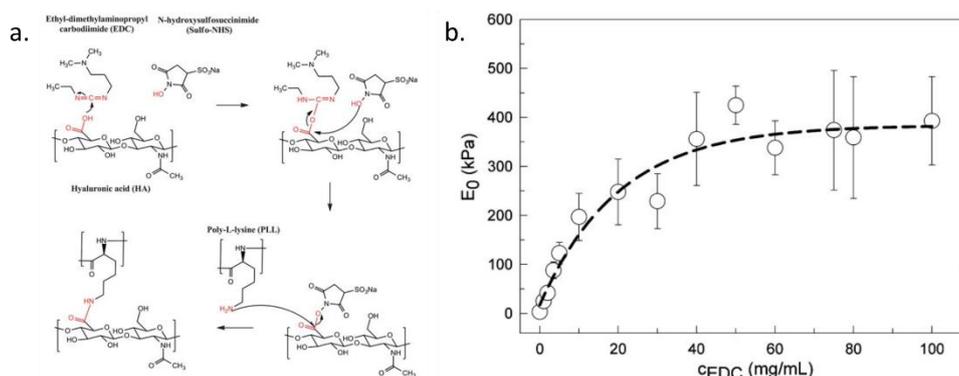
La modulation de la rigidité de films LbL peut se faire lors de la formation des films en jouant sur la nature des polymères utilisés, leur concentration, le pH de la solution, les forces ioniques ou encore l'incorporation de nanoparticules. La réticulation, qui permet également de rendre les films plus stables,

peut également se faire après la construction des films à l'aide d'un stimulus physique (traitement UV, chaleur, voltamétrie cyclique, etc.), chimique (réaction EDC/NHS, glutaraldéhydes, disulfides, etc.) ou encore l'ajout de couches de polyélectrolytes synthétiques.

#### 1.4.3.1. Réticulation chimique par réaction EDC/NHS

La réticulation des PEM se fait généralement après construction par réticulation chimique. La réaction chimique la plus connue repose sur l'utilisation de [1-éthyl-3-(3-diméthyl aminopropyl) carbodiimide] (EDC). Cette réaction, très utilisée pour lier de manière covalente des protéines à la surface, permet de former des liaisons peptidiques entre les groupes carboxyles de l'acide hyaluronique et les groupes amines de la poly-L-lysine (PLL). L'utilisation de N-hydroxysuccinimide (NHS) permet de favoriser cette réaction de réticulation (Richert, Boulmedais et al. 2004, Ryzdek, Schaaf et al. 2012).

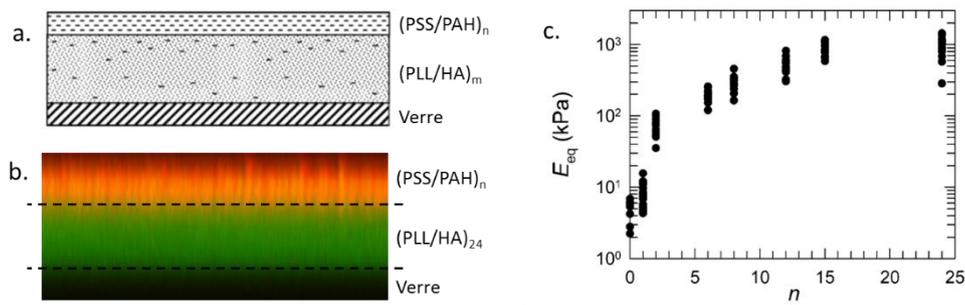
Afin de réticuler le film, l'EDC réagit avec un groupe carboxyle du HA et l'active. Ce groupe carboxyle actif est ensuite converti en ester actif grâce au sulfo-NHS. Cet ester va ensuite réagir avec un groupe amine de la PLL pour former la liaison peptidique à l'origine de la réticulation du film (**Figure 1-11 a.**) (Richert, Boulmedais et al. 2004). Le module de Young des films réticulés, mesuré par nanoindentation à AFM, augmente en fonction de la concentration d'EDC (**Figure 1-11 b.**) (Boudou, Cruzier et al. 2010).



**Figure 1-11 | Modulation de la rigidité par réaction EDC/NHS.** L'EDC ([1-éthyl-3-(3-diméthyl aminopropyl) carbodiimide]) permet la formation de liaison peptidique entre l'acide hyaluronique et la poly-L-lysine. L'EDC active les groupes hydroxyles de l'acide hyaluronique. Le NHS (N-hydroxysuccinimide) favorise cette réaction de réticulation en transformant les groupes carboxyles actifs en esters. C'est ces esters qui vont former des liaisons peptidiques avec les groupes amines de la poly-L-lysine (a.). Le contrôle de la rigidité des films réticulés se fait en variant la concentration d'EDC utilisée. Plus la concentration d'EDC utilisée est importante, plus les films sont rigides (b.). Adaptée de (Boudou, Cruzier et al. 2010, Ryzdek, Schaaf et al. 2012).

#### 1.4.3.2. Ajout d'un dépôt de polyélectrolytes synthétiques

La modulation des films multicouches de polyélectrolytes à base de poly-L-lysine(PLL) et d'acide hyaluronique (HA) se fait généralement par réticulation chimique de type EDC/NHS. Cependant, une autre méthode de rigidification des films a été développée par Senger et al. Cette méthode consiste à ajouter un nombre  $n$  de bicouches à base de polymères synthétiques, le poly(sodium 4-styrène sulfonate) (PSS) et poly(allylamine hydro-chloride) (PAH) (Francius, Hemmerle et al. 2007). Le film PEM obtenu est alors organisé sous la forme  $(PLL/HA)_m-(PSS/PAH)_n$  (**Figure 1-12 a. et b.**). Il a été démontré qu'une augmentation du nombre de bicouches  $n$  pour un nombre de bicouches  $m$  augmentait le module de Young et la viscoélasticité des films. Cette augmentation de rigidité est sans doute liée à la pénétration et la diffusion de PSS (et peut être de PAH) dans les couches de PLL/HA qui altèrent les propriétés mécaniques du film (**Figure 1-12 c.**).

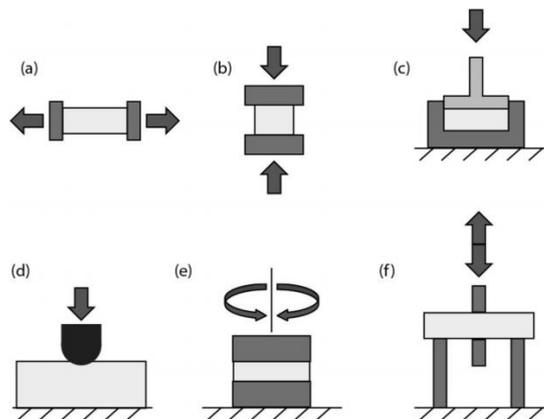


**Figure 1-12|Modulation de la rigidité par ajout de bicouches de polyélectrolytes synthétiques.** Les films obtenus ont une organisation de type  $(PLL/HA)_m-(PSS/PAH)_n$  (a. et b.). L'augmentation de rigidité des films s'obtient en fonction du nombre  $n$  de bicouches de PSS/PAH appliquées en surface de film  $(PLL/HA)_m$ . Adaptée de (Francius, Hemmerle et al. 2007).

## 1.5. Spectroscopie de force et rigidité des films

Comme expliqué précédemment, les hydrogels sont très utilisés pour étudier l'influence des propriétés mécaniques du substrat sur le comportement cellulaire. Avant d'étudier les interactions matériau-cellules, il est nécessaire de caractériser la rigidité de ces substrats. La rigidité des hydrogels et des autres biomatériaux est caractérisée par spectroscopie de force (= ensemble des techniques permettant d'étudier les propriétés mécaniques d'un matériau donné).

Plusieurs techniques permettent de mesurer la faible élasticité d'un hydrogel (en général de l'ordre du kPa) : test de traction, de compression (confinée ou pas), d'indentation, de rhéométrie de flux ou encore d'analyse mécanique dynamique (**Figure 1-13**) (Oyen 2014).

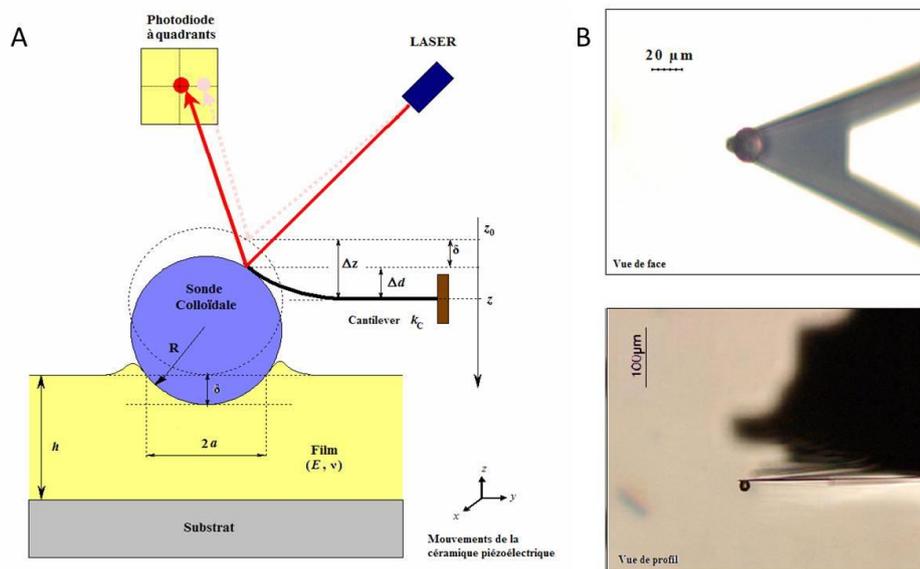


**Figure 1-13|Techniques de caractérisations mécaniques des hydrogels.** La rigidité des hydrogels est mesurée par des techniques de spectroscopie de force comme des tests de traction (a), de compression (b), de compression confinée (c), d'indentation (d), de rhéométrie de flux (e) ou encore d'analyse mécanique dynamique (f). Adaptée de (Oyen 2014)

L'indentation est une méthode de mesure de module de Young, basée sur l'utilisation d'une sonde mise au contact de la surface du matériau avant d'être retirée. A l'origine, l'indentation, qui est en réalité une version locale du test de compression, était utilisée pour mesurer la dureté des métaux. La préparation minimale des échantillons en a fait une technique couramment utilisée. Dans le cadre des mesures de rigidité des hydrogels ou des PEM, l'indentation est associée au principe de microscopie de force atomique (AFM).

### 1.5.1. Nano-indentation par microscopie à force atomique AFM

La nano-indentation par AFM est caractérisée par l'application d'un cycle de compression, les nano-indentations, au niveau de la surface du matériel à l'aide d'une sonde colloïdale. Cette sonde colloïdale d'un diamètre connu ( $2R$ ) est fixée sur un cantilever disposant d'une constante de raideur connue. Les indentations se font à l'aide du moteur piézoélectrique de l'AFM sous la forme d'approche-retrait. Dans cette configuration, la sonde exerce une force perpendiculaire à la surface, qui comprime le matériau. Les déplacements du moteur piézoélectrique et du cantilever sont enregistrés au cours des cycles de compression appliqués à la surface du matériel. La déviation du cantilever liée à l'indentation est mesurée grâce à un faisceau laser. Comme en AFM, le faisceau laser dirigé vers le cantilever est réfléchi sur une photodiode à quadrant. Le module de Young du matériau en un point précis est donné par la variation de l'indentation du cantilever, la force appliquée par ce dernier au niveau de la surface du matériel et le rayon de la sonde colloïdale (**Figure 1-14**) (Francius 2006).



**Figure 1-14| Principe de nano-indentation par AFM.** Une sonde colloïdale de diamètre connu est fixée sur un cantilever ayant une constante de raideur  $k_c$ . A l'aide d'un moteur piézoélectrique, la sonde va exercer une force perpendiculaire à la surface du matériel, qui va le comprimer. Le piézoélectrique permet ces indentations sous forme d'approche-retrait. Les déplacements du piézo ainsi que la déviation du cantilever, induite par la résistance aux forces du biomatériau, sont mesurés. La mesure de la déviation du cantilever se fait à l'aide d'un laser et d'une photodiode à quadrant comme dans un AFM classique. L'indentation  $\delta$  est la différence mesurée entre les deux déplacements. Elle permet à l'aide de la force  $F$  appliquée par le cantilever (dépendant de  $k_c$ ) et du rayon  $R$  de la sonde d'obtenir le module d'Young  $E$ . Adaptée de (Francius 2006)

### 1.5.2. Mesure du module de Young

La position du cantilever  $d$  et celle de l'échantillon (placé sur la céramique piézoélectrique)  $z$  en fonction du temps  $t$  sont mesurées et recueillies sous forme de tension électronique. L'indentation  $\delta$  correspond à la différence entre le déplacement de la céramique piézoélectrique  $z$  et la déflexion du cantilever  $d$ .

$$\delta = \Delta z - \Delta d = (z - z_0) - (d - d_0)$$

Cette relation couplée à la définition du point de contact, permet d'associer à  $z_0$  (déplacement de la céramique piézo) sa valeur. A l'aide de la constante de raideur  $k_c$  du cantilever et de sa déflexion  $d$ , il est possible d'obtenir la force  $F$  exercée par la sonde sur le film.

$$F = k_c \Delta d$$

La force  $F$  appliquée par la sonde colloïdale sur le matériau, l'indentation  $\delta$  et le rayon de la sonde  $R$  permettent de définir le module de Young  $E$  du matériau testé :

$$E = \frac{R \delta}{F}$$

## Chapitre 2 Introduction à la mécano-biologie

De nombreux biomatériaux, plus particulièrement des hydrogels, ont été développés afin de mimer la matrice extracellulaire. Si l'effet de la composition biochimique de l'environnement cellulaire sur le comportement des cellules n'est plus à démontrer depuis de nombreuses années, il a fallu attendre 1997 et les travaux pionniers de Pelham et Wang pour mettre en évidence le fait que les cellules soient capables de répondre aux signaux mécaniques, et plus particulièrement, à la rigidité de cet environnement (Pelham and Wang 1997). C'est les débuts de la mécano-biologie ; un domaine pluridisciplinaire dédié à l'étude des effets des forces mécaniques et de la géométrie du substrat sur le comportement cellulaire (Iskratsch, Wolfenson et al. 2014). Il ne fait désormais plus aucun doute que les cellules sont capables de sentir leur environnement et de répondre aux signaux mécaniques qu'elles perçoivent (Discher, Janmey et al. 2005).

Les signaux mécaniques sont sentis au niveau des contacts focaux par des protéines transmembranaires, les intégrines, qui connectent physiquement l'environnement cellulaire au cytosquelette. Ces signaux mécaniques sont transformés dans le cytoplasme en signaux biochimiques activant eux-mêmes des voies de signalisation correspondantes. Ces messages physiques ou chimiques se propagent jusqu'au noyau (Wang, Tytell et al. 2009), où ils sont intégrés au niveau de la chromatine pour réguler des fonctions nucléaires fondamentales, comme la réplication ou la transcription (Engler, Sen et al. 2006). Une altération de la perception des signaux mécaniques à partir du microenvironnement cellulaire ou une altération d'une voie de signalisation intracellulaire de ces signaux peut être à l'origine d'un grand nombre de pathologies telles que les fibroses, les artérioscléroses ou encore le cancer (Jalouk and Lammerding 2009).

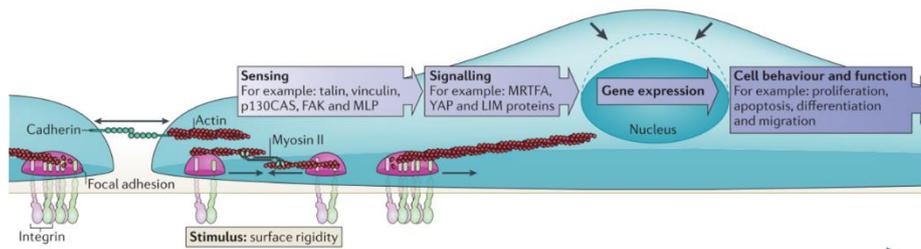
### 2.1 Introduction à la mécano-biologie

#### 2.1.1 Physique et forces en biologie

L'information génétique contenue dans l'ADN ne suffit pas à elle seule pour donner une morphologie précise à une cellule, un tissu, un organe ou l'organisme entier d'un être vivant. Les contraintes mécaniques de l'environnement extracellulaire exercées sur les cellules ainsi que les forces générées par ces dernières en réponses aux signaux physiques déterminent la forme d'un tissu, d'un organe et sculptent un embryon. Cette physique du vivant est présente dans de nombreux processus physiologiques des cellules impliqués dans l'adhérence, la migration, la prolifération, la division, la différenciation, la mort cellulaire ou encore la dégénérescence en métastases (Eyckmans, Boudou et al. 2011, Iskratsch, Wolfenson et al. 2014).

#### 2.1.2 Mécano-biologie

Il est désormais acquis que la forme des cellules eucaryotes, et par extension des organismes qu'elles composent, est définie par des cycles de mécano-sensation, de mécano-transduction et de mécano-réponses (**Figure 2-1**) (Vogel and Sheetz 2006, Iskratsch, Wolfenson et al. 2014).



**Figure 2-1 | Mécano-sensation, -transduction et -réponse.** Une cellule est capable de sentir la rigidité de son environnement au cours d'un mécanisme de mécano-sensation avant de transformer ces signaux mécaniques en signaux chimiques afin de réguler le comportement et la fonction cellulaire. Cette mécano-transduction implique généralement des récepteurs membranaires, les intégrines, des molécules des contacts focaux comme la taline, la vinculine ou encore p130CAS ainsi que des facteurs de signalisation nucléaire capables d'altérer et de changer les profils d'expression de certains gènes. La déformation nucléaire induite par la propagation physique des signaux mécaniques peut également induire des changements d'expression génique. Adaptée de (Iskratsch, Wolfenson et al. 2014)

Les cellules sont capables de sentir, par mécano-sensation, et d'intégrer, par mécano-transduction, de manière active des informations mécaniques provenant de leur environnement et y répondre par des décisions relatives à la croissance, la migration, ou la différenciation cellulaire. Cette capacité des cellules à sentir des signaux mécaniques et, plus particulièrement, à sentir la rigidité de leur environnement représente un intérêt important en bio-ingénierie et dans le design de nouveaux biomatériaux. Cependant, le processus par lequel les cellules sont capables de sentir leur environnement et les mécanismes par lesquels les cellules répondent à ces signaux restent encore peu connus ; ils sont d'ailleurs le sujet d'une nouvelle discipline en pleine émergence : la mécano-biologie. A l'interface entre la biologie cellulaire, la biologie du développement, la bio-ingénierie ou la biophysique, la mécano-biologie se concentre sur l'étude des forces physiques et des changements mécaniques intervenant dans les cellules et les tissus ainsi que leurs contributions au développement d'un organe (organogénèse), d'un organisme, à la physiologie des tissus, mais aussi dans des pathologies et, plus particulièrement, dans le cas des cancers (Jansen, Donato et al. 2015).

## 2.2 Réponses cellulaires à la rigidité du substrat

Durant de nombreuses années, l'intérêt était porté sur les effets de la « chimie » sur le comportement cellulaire. Après quelques travaux passés plus ou moins inaperçus au cours du 19<sup>ème</sup> siècle, Pelham et Wang démontrent que non seulement les cellules répondent à la rigidité de leur environnement, mais que cette communication mécanique est aussi importante que la communication liée à des messagers chimiques (Pelham and Wang 1997). Ces travaux font l'effet d'un séisme en biologie cellulaire. En raison notamment du fait que jusque-là, l'ensemble des comportements cellulaires était caractérisé sur des substrats très rigides comme le verre ou le polystyrène, bien loin des conditions mécaniques que la plupart des cellules rencontrent *in vivo*. Dans les années qui ont suivi ces travaux pionniers, de nombreuses études se sont employées à caractériser l'effet de la rigidité du substrat sur des comportements cellulaires fondamentaux comme l'adhérence, la prolifération, la migration ou encore la différenciation ou la mort cellulaire.

### 2.2.1 Adhérence & prolifération

#### 2.2.1.1 Mécanisme d'attachement cellulaire

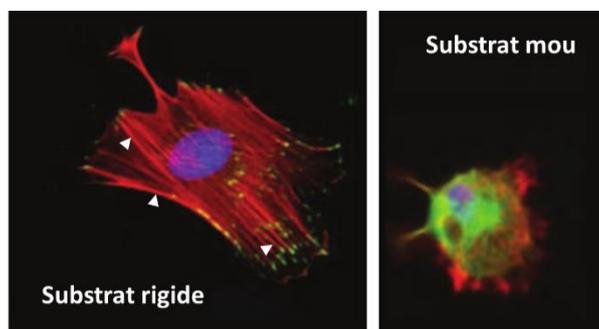
L'attachement cellulaire joue un rôle clé dans la formation d'organismes pluricellulaires (Abedin and King 2010, Di Cio and Gautrot 2016). En effet, les cellules s'attachent à leur environnement, la MEC et aux cellules voisines via des récepteurs dédiés, respectivement les intégrines et les cadhérines. Les cadhérines et les jonctions cellulaires, qui leurs sont associées, ne seront pas abordées dans ce manuscrit de thèse. Si

l'attachement des cellules est un prérequis à la survie cellulaire, il peut se faire sur des substrats ayant une rigidité qui varie énormément (quelques kPa dans les tissus neuronaux à plusieurs Ga dans les tissus osseux calcifiés ou sur des substrats de culture cellulaire comme verre et polystyrène) (Discher, Janmey et al. 2005). Cet attachement est également caractérisé par la morphologie cellulaire, donc l'organisation du cytosquelette. Ainsi, plus une cellule est étalée, meilleur sera son attachement.

Le phénomène d'attachement d'une cellule à un substrat est un phénomène qui se déroule en plusieurs étapes. La cellule via des récepteurs dédiés, les intégrines (**abordées de manière plus détaillée dans la partie 2.3.1.1**), va reconnaître des motifs présents à la surface du substrat, par exemple des motifs RGD, et s'y lier. Cette liaison va provoquer la formation de contacts focaux au niveau des intégrines (**voir 2.3.1.2 pour plus d'informations**). A travers ces contacts focaux, les cellules vont transmettre des forces de traction générées par le cytosquelette d'actino-myosine au substrat qui va, en réponse, plus ou moins résister selon son élasticité. Un substrat rigide aura une résistance plus importante aux forces de traction générées par les cellules qu'un substrat mou. En réponse à la résistance du substrat, la cellule va modifier l'organisation de ses complexes focaux, de son cytosquelette, etc. (Discher, Janmey et al. 2005, Wells 2008, Mason, Califano et al. 2012).

#### 2.2.1.2 Effet de la rigidité sur l'étalement cellulaire

Lorsque des cellules sont mises en culture sur des substrats rigides, elles forment un grand nombre de contacts focaux bien distincts et stables. Elles adoptent également une morphologie très étalée, qui s'accompagne d'une organisation du cytosquelette d'actine en fibre de stress (**Figure 2-2**). *A contrario*, sur substrats mous, les cellules ont une morphologie plus arrondie, couplée à une absence de contact focaux et une désorganisation du cytosquelette (Pelham and Wang 1997, Engler, Bacakova et al. 2004, Discher, Janmey et al. 2005, Levental, Georges et al. 2007, Wells 2008).



**Figure 2-2 | Influence de la rigidité du substrat sur l'attachement et l'étalement cellulaire.** Sur substrat rigide, des myoblastes ont une morphologie très étalée associée à une organisation du cytosquelette d'actine (en rouge) en fibres de stress (indiquées par les têtes de flèches blanches) et des contacts focaux bien différenciés (en verre). Sur substrat mou, les myoblastes adoptent une morphologie beaucoup plus arrondie liée à l'absence de contacts focaux bien distincts et d'organisation en fibres du cytosquelette. Adaptée de (Discher, Mooney et al. 2009)

#### 2.2.1.3 Effet de la rigidité sur la prolifération

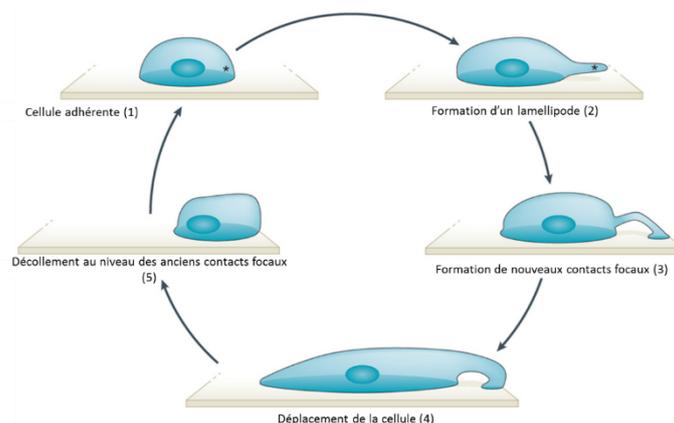
Au cours de la formation d'un organisme ou d'un processus de cicatrisation, les cellules ont une forte activité proliférative. La prolifération cellulaire est un phénomène très important au cours de l'organogénèse. Elle se fait en plusieurs étapes. Les cellules entrent d'abord dans une phase durant laquelle leur matériel génétique est dupliqué au cours d'un mécanisme de réplication, la phase S du cycle cellulaire. Puis les cellules entrent en mitose : d'une cellule mère, deux cellules filles identiques sont formées. Pour que des cellules puissent proliférer, les cellules doivent être capables de s'ancrer dans le substrat. Ainsi sur des substrats de faible rigidité, les cellules (saines !) ne sont pas capables de proliférer (Wang, Dembo et al. 2000).

En cultivant des cellules épithéliales sur un substrat peu rigide (module de Young d'environ 50 kPa), il a été montré que l'absence de contacts focaux et de fibres d'actine empêche l'activation de la réplication de l'ADN, mais pas celle de la transcription. Au contraire, sur un substrat plus rigide (module de Young d'au moins 200 kPa), les cellules forment des contacts focaux et des fibres d'actine nécessaires à la réplication tout en préservant l'activité transcriptionnelle (Wang, Dembo et al. 2000, Kocgozlu, Lavallo et al. 2009).

## 2.2.2 Migration

### 2.2.2.1 Mécanisme de migration

La migration cellulaire est un phénomène crucial pour le développement, la physiologie, la réponse immunitaire ou encore la cicatrisation d'un organisme (Lo, Wang et al. 2000, Charras and Sahai 2014). La migration nécessite un grand nombre d'évènements coordonnés, qui peuvent être classés en cinq étapes (**Figure 2-3**). Les cellules doivent d'abord s'attacher à leur substrat (1), puis former une extension sous la forme d'un lamellipode à l'aide de leur cytosquelette d'actine (2), créer de nouveaux contacts focaux (3). Ces étapes sont suivies par le déplacement de la cellule vers les nouveaux contacts focaux (4) et enfin, rétraction de la queue de la cellule (5) (Bravo-Cordero, Magalhaes et al. 2013). Ainsi, les cellules utilisent des points d'ancrage dans le substrat, puis génèrent les forces de traction leur permettant de migrer.



**Figure 2-3 | Mécanisme de migration cellulaire.** Afin de migrer, les cellules doivent d'abord s'attacher à leur substrat (1), puis former une extension sous la forme d'un lamellipode à l'aide du cytosquelette d'actine (2), créer de nouveaux contacts focaux (3), se déplacer vers les nouveaux contacts focaux (4) et enfin, se décoller du substrat au niveau des anciens contacts focaux (5). Adaptée de (Bravo-Cordero, Magalhaes et al. 2013).

### 2.2.2.2 Effet de la rigidité sur la migration

Il est connu que de nombreux paramètres influencent la migration cellulaire. En effet, il a été démontré que les cellules étaient capables de migrer en suivant de nombreux gradients préférentiels. Ces gradients peuvent être chimiques, comme dans le cas de la chemotaxie, lumineux (phototaxie), de potentiel électrostatique (galvanotaxie) ou encore de potentiel gravitationnel (géotaxie) (Lo, Wang et al. 2000). L'effet d'un gradient de rigidité du substrat sur la migration cellulaire s'est donc naturellement posé. En 2000, Lo *et al.* démontrent que les cellules migrent vers des zones plus rigides d'un substrat, phénomène qu'ils qualifieront de « durotaxie » (Lo, Wang et al. 2000, Wells 2008, Mason, Califano et al. 2012). Cette préférence pour le rigide s'explique par le processus de migration détaillé ci-dessus. En effet, pour que la cellule puisse se mouvoir, et donc que les forces générées par le cytosquelette soient transformées en mouvements, les cellules doivent pouvoir créer des contacts focaux stables. Sur des substrats mous, les forces exercées par la cellule n'induiront pas un mouvement cellulaire, mais un remodelage du substrat (Lo, Wang et al. 2000, Charras and Sahai 2014).

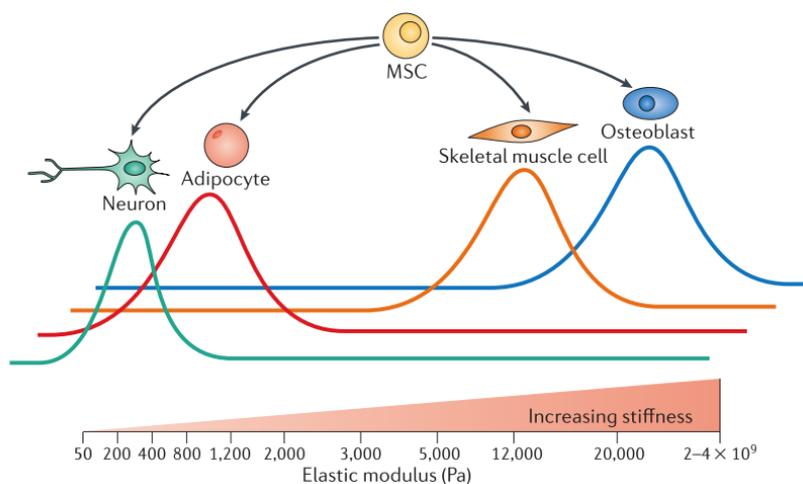
## 2.2.3 Différentiation

### 2.2.3.1 Mécanisme de différenciation

Dans un organisme multicellulaire, la grande majorité des cellules est spécialisée, c'est-à-dire adaptée à leur fonction spécifique. Cependant, l'ensemble des cellules d'un organisme (à l'exception de celles issues de la méiose comme les ovules, les spermatozoïdes, etc.) disposent de la même information génétique. Au cours du développement, les cellules d'un organisme se différencient en modifiant le type de gènes qu'elles expriment suivant leur fonction spécifique. Cette extinction de certains gènes se traduit par un changement d'organisation de la chromatine, une superstructure de l'information génétique (**Cf. 2.4.1.2 pour plus d'informations**) (Meshorer and Misteli 2006). Si cette différenciation se fait principalement au cours du développement embryonnaire, certaines cellules souches pluripotentes, c'est-à-dire capable de se différencier en n'importe quels types cellulaires, subsistent à l'état adulte. Ces cellules souches mésenchymateuses font l'objet de nombreuses études en raison de leur intérêt en ingénierie tissulaire. La destinée de ces cellules souches est influencée par un grand nombre de facteurs et d'interactions nécessitant un contrôle précis afin d'obtenir une régénération saine et effective des tissus fonctionnels. La question d'un effet de la rigidité du substrat comme facteur de différenciation s'est donc posée.

### 2.2.3.2 Effet de la rigidité sur la différenciation

En 2006, Engler *et al.* mettent en évidence l'effet de la rigidité sur la différenciation et ouvrent la voie à de nombreuses opportunités dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Ils déposent des cellules souches mésenchymateuses (MSC) sur différents substrats mimant la rigidité des tissus neuronaux, des tissus musculaires et enfin des tissus osseux. Après une semaine de culture sur ces milieux, les cellules expriment différents marqueurs spécifiques des types cellulaires vers lesquels elles s'orientent. Ainsi, les cellules cultivées sur un substrat dont la rigidité mime celle des tissus neuronaux expriment de la tubuline  $\beta 3$ , un marqueur de neurones, alors que les cellules cultivées sur un environnement mimant celui du muscle expriment un marqueur de myoblastes, MyoD. Même constat pour les cellules cultivées sur des substrats rigides, qui expriment un marqueur d'ostéocytes CBF $\alpha 1$  (Engler, Sen *et al.* 2006). La rigidité de la matrice est donc à même d'influencer la destinée des cellules souches (**Figure 2-4**) (Engler, Sen *et al.* 2006, Wells 2008, Discher, Mooney *et al.* 2009, Mason, Califano *et al.* 2012).

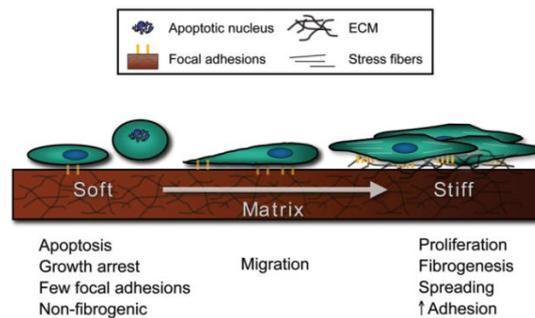


**Figure 2-4 | Effet de la rigidité du substrat sur la différenciation cellulaire.** La différenciation cellulaire est influencée par la rigidité de la matrice. Ainsi, des cellules souches mésenchymateuses (MSC) en culture sur des substrats très mous (50-400 Pa) se différencient en neurone, des cellules en culture sur des substrats légèrement plus rigides (700-1 500 Pa) en adipocytes. Des cellules en culture sur des substrats de rigidité plus importante (5-12000 Pa) deviennent des myoblastes alors que des cellules sur des substrats très rigides (plus de 20 000 Pa) se différencient en ostéoblastes. Adaptée de (Halder, Dupont *et al.* 2012)

Ces observations font l'effet d'un séisme dans le domaine de la mécano-biologie. De fait, s'il était compréhensible que la rigidité de la matrice puisse limiter la prolifération cellulaire, conduire à la mort cellulaire ou réorganiser le cytosquelette et les contacts focaux, ces observations vont plus loin, suggérant un effet de la rigidité sur l'organisation même du noyau cellulaire.

#### 2.2.4 Conclusion sur les effets de la rigidité du substrat sur le comportement cellulaire

Ces nombreuses études (Pelham and Wang 1997, Lo, Wang et al. 2000, Engler, Bacakova et al. 2004, Discher, Janmey et al. 2005, Georges and Janmey 2005, Yeung, Georges et al. 2005, Engler, Sen et al. 2006, Kocgozlu, Lavalle et al. 2009, Charras and Sahai 2014) démontrent l'importance de la rigidité du substrat comme facteur régulant le comportement cellulaire. Ainsi, la rigidité du substrat influence beaucoup de comportements fondamentaux des cellules comme l'attachement, la morphologie ou encore la migration cellulaire (**Figure 2-5**). Sur des substrats rigides, les cellules prolifèrent, s'étalent et migrent alors que sur des substrats mous, les cellules forment peu de contacts focaux, cessent de proliférer et entrent dans certains cas (substrats très mous) en apoptose. La rigidité du substrat influence également la migration cellulaire : les cellules ont en effet tendance à migrer par durotaxie, c'est-à-dire vers des substrats plus rigides. La rigidité du substrat joue également un rôle clé dans la différenciation cellulaire.



**Figure 2-5 | Effet de la rigidité du substrat sur le comportement cellulaire.** La rigidité du substrat agit comme un médiateur important du comportement cellulaire. Ainsi, sur des substrats mous, les cellules cessent de proliférer et forment peu de contacts focaux. Sur des substrats très mous (<50 kPa), les cellules ne parviennent pas à survivre et entrent en apoptose. Sur des substrats rigides, les cellules parviennent à créer de nombreux contacts focaux, et donc à s'étaler. Une augmentation de l'adhérence et de la prolifération sont observées sur substrats rigides. La migration est également affectée : les cellules migrent vers des substrats plus rigides par durotaxie. Enfin, la rigidité du substrat est un facteur important de la différenciation cellulaire : les cellules se différencient en neurones sur substrats mous, en myocytes sur substrats plus rigides ou encore en ostéocytes sur substrats très rigides. Adaptée de (Wells 2008, Halder, Dupont et al. 2012).

Les cellules sont donc capables de sentir leur environnement et d'y répondre en adaptant leurs contacts focaux et l'organisation de leur cytosquelette. Les observations réalisées suggèrent également un effet de la rigidité du substrat sur certaines voies de signalisation allant jusqu'à l'expression ou l'extinction de certains gènes (Charras and Sahai 2014). Il est toutefois important de noter que tous les types de cellules ne sont pas aussi sensibles à la rigidité de leur microenvironnement et que toutes les cellules mécano-sensibles ne répondent pas de la même manière aux signaux mécaniques qu'elles perçoivent (Georges and Janmey 2005, Yeung, Georges et al. 2005, Wells 2008, Mason, Califano et al. 2012); par exemple des cellules comme les neurones survivent mieux sur des substrats mous (Georges and Janmey 2005). Les neutrophiles, des cellules immunitaires, semblent quant à eux insensibles à la rigidité du substrat (Yeung, Georges et al. 2005).

## 2.3 Mécano-sensation & Mécano-transduction

Les cellules sont continuellement exposées à des forces physiques (pression hydrostatique, forces de cisaillement, de traction ou encore de compression) auxquelles elles doivent s'adapter en modifiant leurs phénotypes ou en remodelant le microenvironnement avec lequel elles interagissent (Butcher, Alliston et al. 2009). Il est désormais acquis que les forces mécaniques en provenance du substrat induisent un grand nombre de comportements cellulaires. La compréhension des mécanismes par lesquelles les cellules perçoivent les signaux mécaniques (mécano-sensation) et les transforment en signaux chimiques (mécano-transduction) au sein de la cellule font actuellement l'objet d'intenses investigations.

### 2.3.1 Mécano-sensation

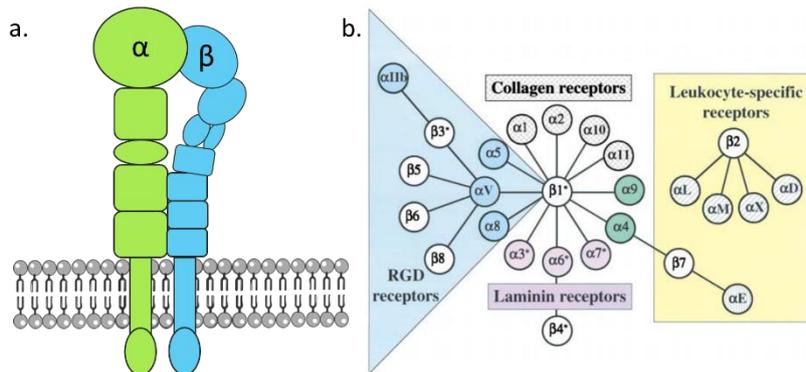
Une cellule peut sentir son environnement chimique et physique, intégrer et analyser ces signaux et y répondre en changeant sa morphologie, sa dynamique, son comportement voire même sa destinée. La mécano-sensation est le processus par lequel une cellule sonde et perçoit les signaux mécaniques de son environnement (Jansen, Donato et al. 2015). C'est un processus qui existe chez presque toutes les types cellulaires, des procaryotes aux organismes multicellulaires (Geiger, Spatz et al. 2009). Les cellules peuvent répondre à ce qu'elles ressentent localement (en réorganisant directement les sites d'adhérence) ou plus globalement (en activant les voies de signalisation régulant des processus comme la croissance cellulaire, la différenciation ou l'apoptose).

Ce processus de mécano-sensation implique l'environnement extracellulaire, généralement la matrice extracellulaire (ECM), le cytosquelette (CSK) et les protéines transmembranaires qui font le lien entre les deux, les intégrines. Comme indiqué précédemment (**1.2**), l'ECM est principalement composée d'eau, de protéines et de polysaccharides. En plus de fournir un support physique aux cellules, elle participe à l'établissement, la séparation et au maintien des différents tissus et organes tout en agissant comme réservoirs de facteurs de croissances et cytokines. Sa rigidité varie en fonction des différents tissus. Le CSK est un réseau interconnecté de polymères filamenteux et de protéines régulatrices permettant aux cellules de résister à la déformation, de transporter des cargos intracellulaires ainsi que de changer de morphologie durant la migration. Les intégrines jouent un rôle clé dans la mécano-sensation et, par la suite, la mécano-transduction. Elles agissent à la fois comme mécano-transducteurs, transmetteurs de forces aux éléments intracellulaires ou encore comme intermédiaires de voies de signalisation initiées par d'autres éléments (Ross, Coon et al. 2013). Les complexes protéiques formés par l'activation des intégrines, les adhésomes, jouent également un rôle important dans la mécano-sensation.

#### 2.3.1.1 Intégrines

Les intégrines sont une famille de protéines transmembranaire disposant d'un long domaine extracellulaire et d'un court domaine cytoplasmique. Ces protéines sont des récepteurs qui lient une grande majorité des protéines de la matrice extracellulaire (ECM) via des domaines spécifiques comme le motif RGD ou le motif LDV. Les intégrines sont qualifiées de récepteurs bidirectionnels, car elles sont capables de transmettre des signaux de l'environnement cellulaire vers la cellule et inversement. Elles doivent leur nom au fait qu'elles intègrent la cellule dans son environnement. Les intégrines ne sont pas présentes chez les procaryotes, les plantes ou les champignons, mais sont retrouvées chez tous les métazoaires même les plus simples comme les éponges ou les cnidaires (Hynes 2002). Les intégrines sont des hétérodimères, qui ne sont pas liés de manière covalente, composés de sous-unités  $\alpha$  (18 types différents) et  $\beta$  (8 types). Chez l'humain, 24 couples d'intégrines ont été identifiés (Hynes 2002, Miranti and Brugge 2002, Humphries, Byron et al. 2006,

Jansen, Donato et al. 2015). Certaines de ces sous-unités sont très répétées :  $\alpha V$  est ainsi présente dans 5 couples d'intégrines et  $\beta 1$  dans 12 couples. Une partie de ces intégrines reconnaissent spécifiquement les séquences RGD, d'autres les motifs LDV, certaines ont des affinités pour les laminines (Humphries, Byron et al. 2006). Une classe particulière d'intégrines reconnaît spécifiquement les leucocytes (**Figure 2-6**). L'intégrine  $\alpha V \beta 3$  reconnaît et lie de manière spécifique les motifs RGD présents sur les vitronectines, fibronectines et les fibrinogènes de l'environnement cellulaire (Humphries, Byron et al. 2006, Jansen, Donato et al. 2015).



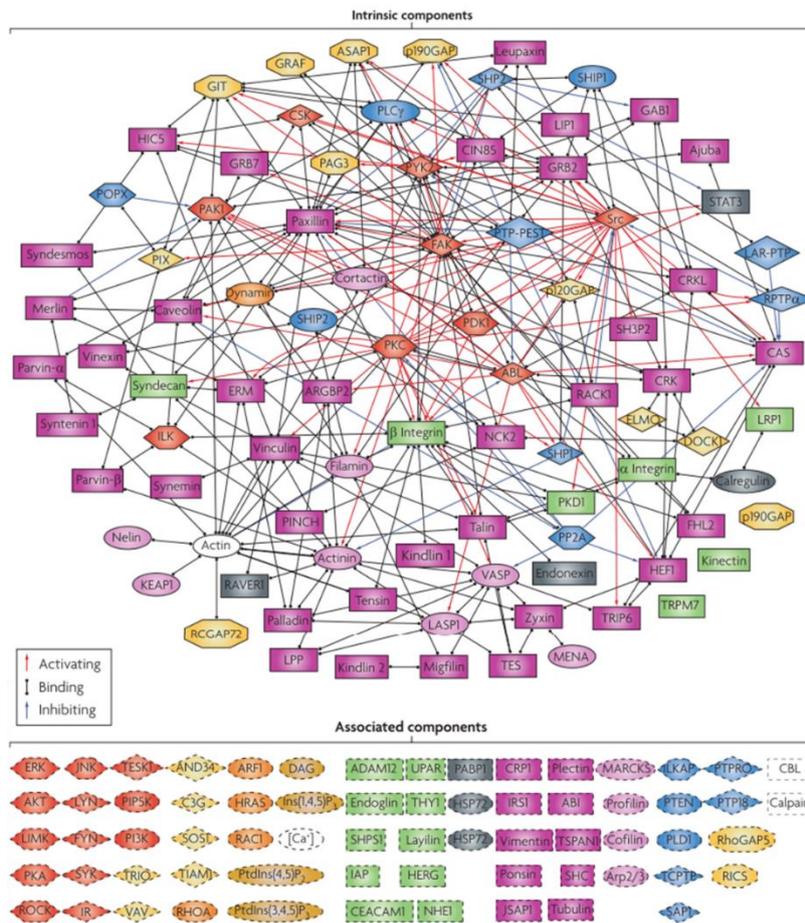
**Figure 2-6 | Structure et famille des intégrines.** Les intégrines sont des hétérodimères transmembranaires disposant d'un long domaine cytoplasmique se liant avec les protéines de la matrice extracellulaire et un court domaine cytoplasmique faisant la liaison avec le cytosquelette et un certain nombre de molécules associées aux différentes voies de signalisation activées par les intégrines (a.). Chez l'humain, 24 couples d'intégrines ont été identifiés ; ils lient des domaines spécifiques de protéines de l'ECM comme le collagène, les laminines et les séquences RGD présents sur les fibronectines etc. Certaines intégrines, les  $\beta 2$  reconnaissent des domaines spécifiques des leucocytes (b.). Adaptée de (Hynes 2002).

Découvertes il y a près de 30 ans par Hynes, les intégrines jouent de nombreux rôles clés dans la modulation de l'adhésion cellulaire et des mécanismes qui en découlent (Hynes 2002). Leur découverte a définitivement révolutionné la vision que les biologistes avaient de l'environnement cellulaire et plus particulièrement de l'ECM (Hynes 2004). Les intégrines font également le lien mécanique entre l'environnement cellulaire et le cytosquelette. De ce fait, elles sont impliquées dans tous les processus impliquant des forces (Ross, Coon et al. 2013). Elles activent également de nombreuses voies de signalisation intracellulaires. Très étudiées, avec plus de 1 000 papiers par an (Hynes 2002), les intégrines jouent non seulement un rôle clé dans la mécano-sensation, mais aussi au cours du développement, dans la réponse immunitaire, le cancer, etc. Enfin, elles recrutent plus de 150 protéines au niveau de leur domaine cytoplasmique pour former l'adhésome.

### 2.3.1.2 Adhésome

La perception de signaux physiques parvenant de la matrice extracellulaire, nommé mécano-sensation, par l'intermédiaire des intégrines se propagent vers l'intérieur de la cellule aux sites d'adhérence, les adhésomes. Les adhésomes déclenchent en cascade l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaires (Geiger, Spatz et al. 2009, Schiller and Fässler 2013, Winograd-Katz, Fässler et al. 2014). L'adhésome, est un complexe multiprotéique qui permet la connexion physique entre les intégrines et les molécules du cytosquelette (Geiger, Spatz et al. 2009). Il est composé d'environ 232 protéines parmi lesquelles 148 sont des composants intrinsèques et 84 sont liées de manière transitoire au site d'adhérence. Certaines de ces protéines sont impliquées dans la structure de l'adhésome et participent à la connexion physique des domaines cytoplasmiques des intégrines au cytosquelette d'actine. C'est, par exemple, le cas des protéines de liaison à l'actine, des protéines associées à l'actine, ou encore des protéines adaptatrices... D'autres sont impliquées dans les voies de signalisation liées à l'attachement cellulaire comme les kinases ou les phos-

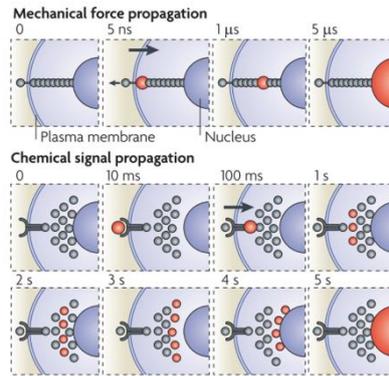
phatases, etc. (Winograd-Katz, Fässler et al. 2014). L'ensemble des protéines de l'adhésome (**Figure 2-7**) effectue entre elles plus de 700 interactions (Geiger, Spatz et al. 2009).



**Figure 2-7 | Interactions et composants de l'adhésome.** Ce complexe multiprotéique est composé d'environ 232 protéines parmi lesquelles 148 sont des composants intrinsèques et 84 sont liées de manière transitoire au site d'adhérence. Ces protéines effectuent entre elles près de 700 interactions d'activation (flèche rouge), de liaison (trait noir) ou encore d'inhibition (flèche bleue). Adaptée de (Geiger, Spatz et al. 2009)

### 2.3.2 Mécano-transduction

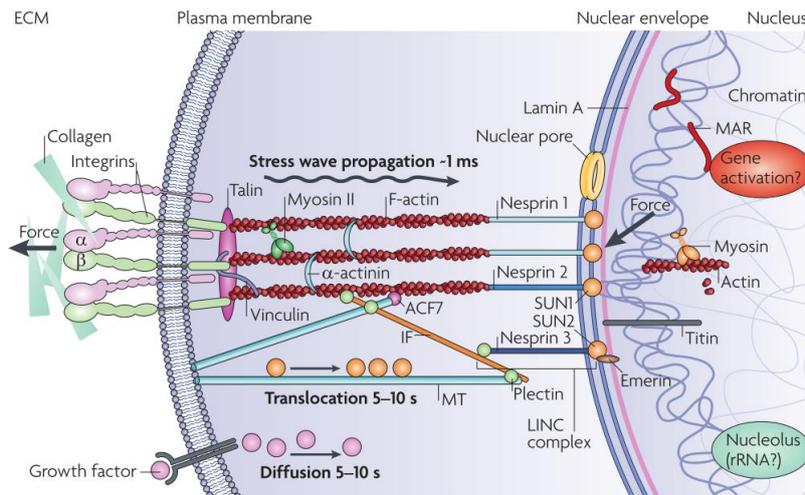
La mécano-transduction est le phénomène au cours duquel la cellule traduit les signaux mécaniques qu'elle reçoit en provenance de l'environnement cellulaire en réponses biologiques (Jansen, Donato et al. 2015). Les intégrines sont physiquement couplées au cytosquelette, qui est lui-même relié au nucléosquelette et, par extension, relié à la chromatine au sein du noyau. Les signaux mécaniques font alors bien plus qu'activer des chaînes de signalisation au niveau de la membrane cellulaire et des adhésions focales ; ils sont également capables d'agir à distance dans le noyau où ils sont capables d'induire des changements mécano-chimiques. La mécano-transduction des signaux mécaniques peut donc se faire de manière chimique via des voies de signalisation, comme la voie Hippo, à partir des contacts focaux vers le noyau ou de manière mécanique le long du cytosquelette vers le noyau. L'idée que les signaux mécaniques puissent agir à distance est particulièrement intéressante, car la propagation des forces mécaniques représentent l'avantage d'être beaucoup plus rapide (de l'ordre de la  $\mu$ s contrairement à quelques ms) que la propagation des signaux chimiques dans le cytoplasme (**Figure 2-8**) (Wang, Tytell et al. 2009). Ce paragraphe présente dans un premier temps la propagation mécanique des signaux puis la propagation chimique de ces derniers vers le noyau.



**Figure 2-8 | Propagation des forces mécaniques versus signaux chimiques.** Les signaux représentés par le(s) point(s) rouge(s) peuvent être transmis au noyau par la propagation de forces mécaniques ou par la propagation de signaux chimiques. La propagation vers le noyau sous la forme de force mécanique est bien plus rapide que celle qui se fait sous la forme de signaux chimiques (de l'ordre de la  $\mu\text{s}$  comparé à la ms). Adaptée de (Wang, Tytell et al. 2009).

### 2.3.2.1 Transmission mécanique des forces

La propagation des forces mécaniques se fait de l'adhésome vers la chromatine à travers le cytosquelette, plus particulièrement le cytosquelette d'actine, puis par le complexe LINC et enfin le nucléosquelette de lamines (**Figure 2-9**) (Wang, Tytell et al. 2009).

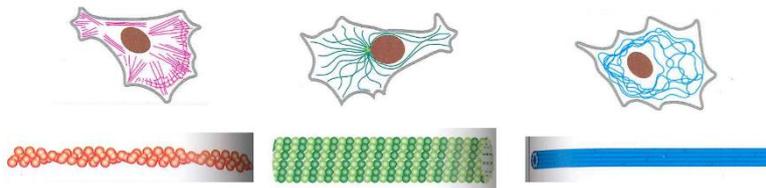


**Figure 2-9 | Molécules impliquées dans la propagation des signaux du microenvironnement vers le noyau.** Les signaux mécaniques ou chimiques provenant de l'ECM sont détectés par des récepteurs dédiés dans le cas des facteurs de croissance ou via les intégrines dans le cas de signaux mécaniques. Ces signaux mécaniques vont ensuite être transmis aux adhésomes (contact focaux), qui connectent le cytosquelette aux intégrines via la vinculine et la taline. Ce signal va alors être transformé en signaux biochimiques au niveau du cytoplasme ou se propager sous la forme d'une onde de stress le long des filaments d'actine (F-actin) avant d'atteindre le noyau via les complexes LINC. Les microtubules (MTs) et les filaments intermédiaires (IF) sont reliés aux filaments d'actine par des protéines : la plectine et l'ACF-8. Ils sont également liés au nucléosquelette grâce à l'émerine des complexes LINC. Le nucléosquelette de lamines est ensuite lié à l'ADN (organisé sous la forme d'une superstructure, la chromatine). Adaptée de (Wang, Tytell et al. 2009)

#### 2.3.2.1.1 Cytosquelette

L'habilité des cellules eucaryotes à résister à la déformation, de transporter des cargos intracellulaires et de changer de morphologie durant la migration dépend directement du cytosquelette, un réseau interconnecté de polymères filamenteux et de protéines régulatrices. Contrairement à ce que son nom indique, le cytosquelette n'est pas un élément figé, mais une structure dynamique qui s'adapte rapidement aux signaux que la cellule reçoit. Il agit comme les os et les muscles de la cellule. Une très bonne analogie est réalisée par Fletcher *et al.* entre le cytosquelette et les LEGOs. En effet, les deux sont composés d'un grand nombre de copies de quelques pièces clés, qui s'assemblent en structures plus importantes. Les deux peuvent être

assemblés en différentes structures ayant diverses propriétés directement dépendantes de la manière dont les pièces sont assemblées et enfin les deux sont capables de se désassembler puis réassembler selon différentes formes, suivant les besoins. Cependant, contrairement aux LEGOs, le cytosquelette est capable de s'auto-assembler (Fletcher and Mullins 2010). Le cytosquelette d'une cellule a trois fonctions bien déterminées : il 1) organise spatialement le contenu cellulaire, 2) connecte la cellule à son environnement que ce soit physiquement ou biochimiquement et 3) permet à la cellule de se déplacer ou de changer de morphologie. Les forces internes et externes affectant les propriétés mécaniques locales et le comportement de la cellule transitent par cette structure cellulaire. Le cytosquelette est composé de trois types de polymères organisés en réseaux : les filaments d'actine, les microtubules et un groupe de polymères appelé filaments intermédiaires (Bausch and Kroy 2006, Wang, Tytell et al. 2009, Fletcher and Mullins 2010, Block, Schroeder et al. 2015). Chaque type de cytosquelette a son rôle spécifique dans la cellule.



**Figure 2-10 | Éléments du cytosquelette.** Le cytosquelette est composé de trois types de polymères organisés en réseaux : les filaments d'actine, les microtubules et un groupe de polymères appelé filaments intermédiaires. Adaptée de L'essentiel de la Biologie Cellulaire 3e Ed. (Alberts)

#### 2.3.2.1.1.1 Filaments d'actine

Les microfilaments d'actine (F-actin) sont les éléments les plus fins du cytosquelette avec un diamètre d'environ 7 nm. Les microfilaments d'actine sont composés de deux protofilaments organisés en hélice droite. La polymérisation de l'actine est plus rapide à l'extrémité plus. Ces filaments polymérisés sont moins rigides en soi que les microtubules, mais leur organisation en paquet, fibre de stress ou réseau isotopique, leur confère une certaine rigidité. Des moteurs moléculaires de la famille des myosines circulent le long de ces filaments (Fletcher and Mullins 2010). Ces moteurs moléculaires participent activement au transport de certaines molécules, à la génération de forces de contraction et au mécanisme de sensation de l'environnement externe (Fletcher and Mullins 2010). L'adaptation des filaments d'actines aux forces reçues ne se fait pas par un équilibre dynamique entre dépolymérisation et polymérisation, mais par une élongation de ces filaments. C'est cette élongation qui est à l'origine des forces nécessaires à la migration des cellules. Les filaments d'actines sont continuellement assemblés et désassemblés en réponse aux activités cellulaires (Fletcher and Mullins 2010). Ils sont également impliqués dans la formation de fibres de stress utiles dans la contraction cellulaire et la formation de protrusions comme les lamellipodes, les filopodes et les pseudopodes (Block, Schroeder et al. 2015).

#### 2.3.2.1.1.2 Microtubules

Les microtubules ont un diamètre d'environ 25 nm. Ils sont organisés à partir du centrosome sous la forme d'un long tube très rigide et creux de protéines. Ces tubes sont généralement formés de 13 protofilaments organisés latéralement. Chacun de ces protofilaments est composé de dimères de  $\alpha$ -tubuline et de  $\beta$ -tubuline interagissant par liaisons covalentes. Ces sous-unités,  $\alpha$ -tubuline et de  $\beta$ -tubuline, sont polarisées respectivement moins et plus. Cette polarisation des sous-unités confère aux microtubules une polarisation qui va permettre le fonctionnement de moteurs moléculaires. Ces moteurs moléculaires, chargés du transport de différentes molécules au sein de la cellule, diffèrent en fonction de leur direction. Ainsi, la dynéine se dirige vers l'extrémité plus du microtubule alors que les kinésines se dirigent vers l'extrémité moins. Les

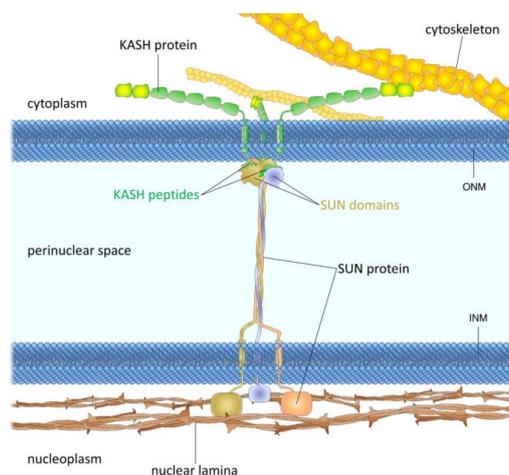
microtubules évoluent constamment, ils sont dans un équilibre dynamique entre deux états : une polymérisation croissante ou une dépolymérisation rapide. De ce fait, la taille des microtubules est constamment variable (Fletcher and Mullins 2010). En interphase, ils forment des « autoroutes » permettant le transport de type « cargo » de molécules par les moteurs protéiques dynéines et kinésines entre les différents compartiments intracellulaires (Fletcher and Mullins 2010, Block, Schroeder et al. 2015). Les microtubules sont également nécessaires à la ségrégation des chromosomes. En effet, lors du processus de mitose, les microtubules se réarrangent pour former le fuseau mitotique.

#### 2.3.2.1.1.3 Filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires ont un diamètre d'environ 10 nm. Leur qualificatif d'intermédiaire provient de cette taille qui est intermédiaire, c'est-à-dire entre le diamètre d'un filament d'actine et un microtubule. Ces filaments sont les plus résistants et plus durables en termes de longévité des cellules. Ils forment un réseau dans toute la cellule et entourent le noyau. Les filaments intermédiaires sont constitués de nombreux brins issus de la polymérisation de sous-unités protéiques. Ces unités protéiques peuvent être organisées en quatre ou cinq différentes classes selon le fait que les types de kératines soient différenciés ou non. Les filaments intermédiaires regroupent ainsi les kératines de type-I et de type-II (c'est-à-dire acides et basiques), les vimentines et les desmines, l' $\alpha$ -interneuxine et les protéines constituant les neurofilaments et enfin les lamines. Le type de filaments intermédiaires varie selon la nature des cellules et des tissus. Près de 80 maladies sont associées à des mutations dans les gènes codants pour les IF parmi lesquelles l'épidermolyse bulleuse (Block, Schroeder et al. 2015). Les filaments intermédiaires ne sont pas polarisés et de ce fait, ne peuvent pas supporter les mouvements directionnels de moteurs moléculaires comme le font les microfilaments d'actine et les microtubules. Contrairement aux cytosquelettes de F-actines et de MTs qui confèrent aux cellules une résistance aux forces de compression, les IFs, peu rigides, fournissent aux cellules une résistance aux forces de traction (Fletcher and Mullins 2010). Ces filaments se lient aux autres éléments du cytosquelette et au complexe LINC à l'aide d'une protéine, la plectine. Cette plectine et l'entrecroisement que les filaments intermédiaires forment ensemble sont indispensables pour résister aux pressions mécaniques inhérentes à la vie des vertébrés.

#### 2.3.2.1.2 Complexe LINC

Le complexe LINC (en anglais *Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton*) est, comme son nom l'indique, une connexion physique et fonctionnelle entre les différents éléments structurels d'une cellule, à savoir le cytosquelette et le nucléosquelette (**Figure 2-11**). Ce complexe est constitué de deux familles de protéines, les nesprines et les protéines SUN ainsi que des protéines associées. Ce complexe, particulièrement conservé au cours de l'évolution (Wang, Tytell et al. 2009), joue un rôle central dans les migrations cellulaires dans des environnements 2D et 3D en permettant les mouvements et le positionnement du noyau au sein de la cellule le long des MTs et des filaments d'actines ; et en formant un gradient de pression, qui conduit le noyau à former des extensions, facilitant la migration des cellules dans des espaces tridimensionnels (Wang, Tytell et al. 2009, Guilluy and Burridge 2015). Outre le fait d'être impliqué dans la régulation de l'organisation cytoplasmique durant les phénomènes de migration, d'adhésion et de polarité, ainsi que dans l'ancrage du noyau aux différents cytosquelettes, le complexe LINC facilite la mécano-transduction des signaux mécaniques provenant de l'extérieur de la cellule vers le noyau en transmettant directement les forces à travers ces composants (Mellad, Warren et al. 2011). Ce complexe est hautement dynamique ce qui lui permet de s'adapter rapidement à ses différentes fonctions (Chang, Worman et al. 2015).



**Figure 2-11 | Le complexe LINC.** Le complexe LINC est un complexe protéique permettant les connexions physiques et fonctionnelles des cytosquelettes d'actine, de microtubules et de filaments intermédiaires au nucléosquelette, qui forme la lamine nucléaire. Il est composé des différentes protéines telles que les nesprines, les protéines SUN ainsi que des protéines associées. INM : membrane nucléaire interne. ONM : membrane nucléaire externe. Adaptée de (Chang, Worman et al. 2015)

#### 2.3.2.1.2.1 Nesprines

Les nesprines sont des protéines localisées, conservées au cours de l'évolution, au niveau de la membrane plasmique nucléaire externe. Cinq isoformes de nesprines existent chez les mammifères : nesprines 1-4, codées par les gènes SYNE1-4, et KASH5 (Graham and Burridge 2016). Les deux premiers, nesprines-1 et nesprines-2, ont des sites de liaisons CH semblables à ceux trouvés sur les filaments d'actine. Cette similarité permet une liaison de haute affinité entre ces isoformes de nesprines et les filaments d'actine. Ces nesprines sont également capable d'interagir avec les microtubules à travers les moteurs moléculaires dynéines et kinésines. Les nesprines-3 interagissent avec les filaments intermédiaires à travers une protéine associée, la plectine. Les nesprines-4 lient les microtubules en interagissant avec les kinésines. Ces nesprines sont exclusivement retrouvées dans les cellules épithéliales sécrétrices (mammaires, salivaires ou encore pancréatiques). Les KASH5 sont présentes au niveau des organes reproducteurs. Les nesprines sont constituées d'une partie N-terminal qui interagit avec les éléments du cytosquelette, d'une répétition de domaines de spectrine (SR) qui sont extramembranaires et un domaine C terminal transmembranaire. Le nombre de répétitions de domaines SR (qui est l'origine de leur nom, NESPRIN = Nuclear Enveloppe SPECTRIN) varie selon les nesprines ; 72 pour la nesprine-1 et 56 pour la nesprine-2. Les nesprines disposent au sein de leur partie transmembranaire, d'un domaine fortement conservé KARSICH ANC-1 Syne Homology (KASH). Leur recrutement au niveau de l'enveloppe nucléaire se fait par l'intermédiaire des protéines SUN (Mellad, Warren et al. 2011, Sosa, Kutay et al. 2013, Uzer, Rubin et al. 2016).

#### 2.3.2.1.2.2 Protéines SUN

Les protéines SUN sont des protéines transmembranaires situées entre les membranes plasmiques interne et externe du noyau (Wang, Tytell et al. 2009, Uzer, Rubin et al. 2016). Elles sont caractérisées par un domaine C-terminal Sad1p UNC-84 (SUN) d'environ 175 acides aminés (Sosa, Kutay et al. 2013). Elles interagissent avec les domaines KASH des nesprines, des protéines associées au complexe LINC comme l'émerine et avec le nucléosquelette, et plus particulièrement avec le réseau de lamines A/C. Deux isoformes de la protéine ont été identifiées chez les humaines, SUN1 et SUN2. SUN 1 est capable d'interagir avec les lamines A mais aussi avec les structures d'ancrages des complexes de pores nucléaires (NPC pour l'anglais *Nuclear Pore Complex*) (Wang, Tytell et al. 2009). Leur taille est similaire à la distance entre les deux membranes plasmiques du noyau (Uzer, Rubin et al. 2016). Les protéines SUN1 et SUN2 forment une forte structure trimérique qui lie trois peptides KASH afin de connecter de manière efficace l'ensemble des protéines

formant le complexe LINC (Sosa, Kutay et al. 2013, Chang, Worman et al. 2015, Uzer, Rubin et al. 2016). Bien que leurs fonctions semblent similaires, SUN1 joue un rôle critique dans la méiose et est directement associé aux complexes des pores nucléaires. (Uzer, Rubin et al. 2016)

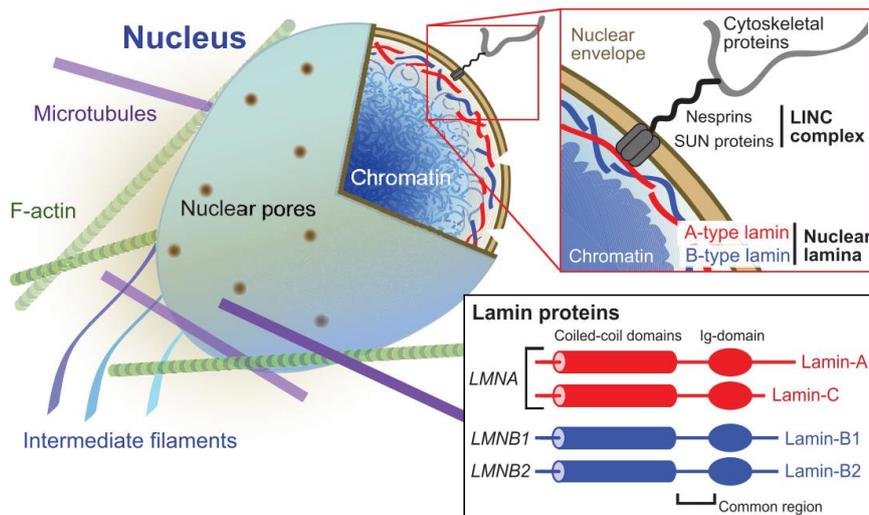
#### 2.3.2.1.2.3 Protéines associées

Plusieurs protéines localisées de part et d'autre de la membrane plasmique du noyau sont associées au complexe LINC. C'est le cas notamment de la plectine et de l'émerine. La **plectine** est une molécule située dans le cytoplasme permettant de créer une liaison entre les filaments intermédiaires et les nesprines du complexe LINC (Wang, Tytell et al. 2009, Isermann and Lammerding 2013). L'**émerine** est une protéine de liaison important pour le complexe LINC cependant sa présence n'est pas requise pour maintenir l'intégrité structurale du complexe. Elle joue un rôle dans l'assemblage du noyau et joue un rôle critique dans le mécanisme de translation des forces jusqu'au noyau. Lorsque le complexe LINC est soumis à une tension, l'émerine peut être phosphorylé par une Src kinase. Cette phosphorylation agit au niveau de la réponse mécanique nucléaire en renforçant la rigidité des réseaux de lamines A/C (Uzer, Rubin et al. 2016).

#### 2.3.2.1.2.4 Lamines

Ubiquitaire aux cellules de tous les métazoaires, les lamines représentent le constituant majeur de la lamina nucléaire (**Figure 2-12**). Situées au niveau de la membrane nucléaire interne, elles perçoivent les forces transmises de l'extérieur de la cellule vers le noyau grâce à leurs liaisons avec le complexe LINC dont elles font partie (Uzer, Rubin et al. 2016). Ce sont des filaments intermédiaires de types V encodés par trois gènes différents. Deux familles de lamines peuvent être distinguées : les lamines de type-A et les lamines de type-B (Dahl, Ribeiro et al. 2008, Wang, Tytell et al. 2009, Ho and Lammerding 2012).

Les lamines de type-A sont principalement représentées par les lamines A et les lamines C. Ces lamines sont issues d'un épissage alternatif d'un seul gène *LMNA*. Des mutations dans ce gène mènent à de nombreuses maladies, appelées laminopathies, comme par exemple, la dystrophie musculaire Emery-Dreifus ou, le syndrome d'Hutchinson-Gilford plus connu sous le nom de progéria (Ho and Lammerding 2012, Isermann and Lammerding 2013). Absente des cellules souches embryonnaires, les lamines de type-A apparaissent une fois que les cellules se différencient. Régulées au cours du développement, ces lamines sont présentes à des niveaux variables dans les tissus selon leurs spécificités. Ainsi, de hauts niveaux de lamines de type-A sont observés dans les cellules constituant le squelette et le muscle cardiaque. Ces lamines A et C jouent un rôle majeur dans le maintien de la forme, la stabilité et la structure du noyau. Il semblerait également que ces lamines, en plus de servir d'ancrages à l'émerine et SUN2, modulent l'expression des gènes à l'intérieur et à la périphérie du noyau. Les lamines de type-B sont principalement représentées par les lamines B1 et B2. Ces dernières sont codées par deux gènes différents *LMNB1* et *LMNB2*. Ces lamines sont constitutivement exprimées dans l'ensemble des cellules somatiques animales. Une seule maladie est attribuée à une mutation dans les gènes codant pour les lamines B. Cette mutation est une leucodystrophie autosomale dominante liée à une duplication au sein du gène *LMNB1* (Dahl, Ribeiro et al. 2008). Le fait qu'une seule maladie soit liée aux lamines de type-B peut en partie s'expliquer par le fait qu'une grande majorité des mutations au sein de ces gènes soient létales au niveau embryonnaire. En effet, diverses expériences ont montré que les lamines B sont non seulement nécessaires à la survie d'un organisme mais aussi à la survie des cellules. Les lamines B1 sont particulièrement essentielles pour les activités des ARN polymérases I et II et donc pour la synthèse des ARN (Dahl, Ribeiro et al. 2008, Ho and Lammerding 2012).



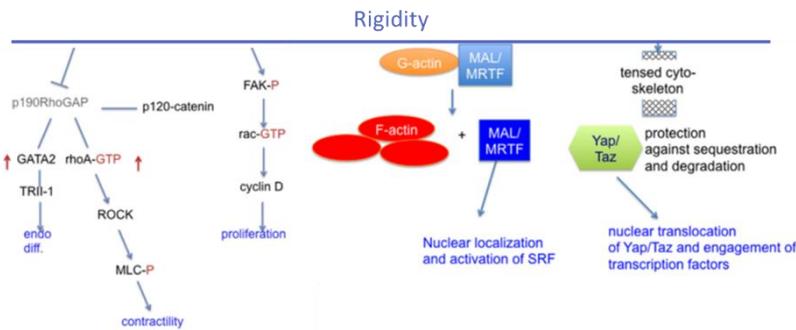
**Figure 2-12 | Organisation des lamines.** Les lamines sont des filaments intermédiaires de type V situés dans le noyau au niveau de la membrane nucléaire interne. Elles font partie du complexe LINC. Deux types de familles de lamines existent : les lamines A et C issues de l'épissage alternatif du gène *LMNA* et les lamines B issues de deux gènes *LMNB1* et *LMNB2*. Adaptée de (Swift and Discher 2014)

Les lamines en général interviennent dans de nombreuses fonctions cellulaires que ce soit en fournissant un support structural au noyau, en facilitant l'organisation de la chromatine ou en régulant des gènes. Elles interviennent également au niveau de la réparation de l'ADN. Les lamines sont importantes pour l'incorporation et l'espacement des pores nucléaires, la régulation de la taille du noyau, et les propriétés mécaniques et morphologiques du noyau. Les lamines se désassemblent durant la mitose ; leur réassemblage coïncide avec la formation de l'enveloppe nucléaire (Ho and Lammerding 2012).

Les lamines interagissent énormément que ce soit avec des facteurs de transcription (affectant la prolifération et la différenciation des cellules ou l'apoptose) ou avec des protéines comme le récepteur de lamine B (LBR), l'*Heterochromatin Protein 1* (HP1), la protéine BAF, l'émerine, la protéine MAN1 et des isoformes de LAP2. En modifiant l'organisation de la chromatine, les lamines peuvent moduler l'expression des gènes à travers une altération de l'accessibilité des gènes aux facteurs de transcription. La perte des lamines dans le cas de laminopathies conduit à un changement dans l'organisation de la chromatine et plus particulièrement une perte de l'hétérochromatine périphérique (Ho and Lammerding 2012).

### 2.3.2.2 Transmission chimique des forces

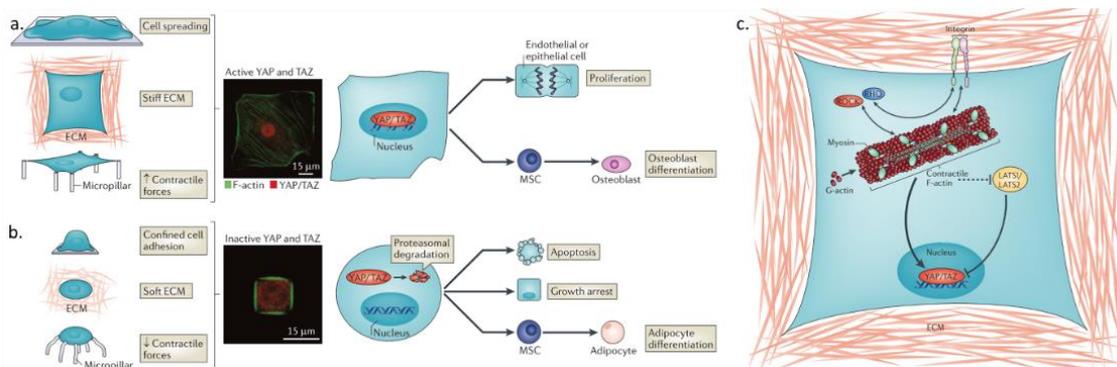
Plusieurs voies de signalisation cytoplasmiques (**Figure 2-13**) impliquant de petites GTPases, des kinases au niveau des contacts focaux ou encore les facteurs de croissance TGF- $\beta$  ainsi que des régulateurs de la transcription comme MRTF-A, NF $\kappa$ B et YAP/TAZ apparaissent comme d'importants médiateurs de la mécano-réponse cellulaire en permettant la transmission chimique des signaux mécaniques vers le noyau (Janmey, Wells et al. 2013, Humphries, Paul et al. 2015).



**Figure 2-13 | Principales voies de signalisation cytoplasmiques impliquées dans la mécano-transduction et leurs effets.** Les signaux mécaniques ressentis au niveau des contacts focaux déclenchent plusieurs voies de signalisation induisant prolifération, contraction du cytosquelette ou encore différenciation. Adaptée de (Janmey, Wells et al. 2013).

### Voie de signalisation Hippo, YAP & TAZ

La voie de signalisation Hippo est impliquée dans le contrôle de la taille des organes en régulant les processus de prolifération cellulaire et d'apoptose. Deux de ces effecteurs, YAP (*Yes associated protein*) et TAZ (*transcriptional co-activator with PDZ binding motif*), jouent un rôle clé dans les réponses biologiques aux propriétés mécaniques du microenvironnement et dans la topologie cellulaire (Dupont, Morsut et al. 2011, Halder, Dupont et al. 2012, Humphries, Paul et al. 2015). YAP et TAZ sont des cofacteurs de transcription. Lorsque la voie de signalisation est inactive, YAP et TAZ sont localisés dans le cytoplasme. Après activation mécanique de la voie de signalisation, YAP et TAZ sont transloqués dans le noyau où ils vont s'associer avec des facteurs de transcriptions comme les TEAD (TEA domain), RUNX2, T-box5 ou p72 qui sont spécifiques à certains promoteurs de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. Lorsque les cellules évoluent sur des substrats rigides, YAP et TAZ sont actifs et sont localisés dans le noyau où ils participent à la prolifération cellulaire et à la différenciation par exemple de MSC en ostéoblastes (**Figure 2-14 a.**). *A contrario*, lorsque des cellules évoluent sur des substrats mous, les co-facteurs de transcription YAP et TAZ restent dans le cytoplasme où ils seront dégradés. Ils ne peuvent donc pas s'associer aux facteurs de transcription spécifiques des gènes codant pour la prolifération, induisant alors un arrêt de la croissance cellulaire (**Figure 2-14 b.**).



**Figure 2-14 | Effet de la rigidité sur les cofacteurs de transcription YAP et TAZ.** Sur substrats rigides, YAP et TAZ sont localisés dans le noyau et participent à la prolifération cellulaire ainsi qu'à la différenciation des MSC en ostéoblastes (a.). Sur substrats mous, YAP et TAZ restent dans le cytoplasme où ils sont dégradés, conduisant à un arrêt de la prolifération cellulaire (b.). Modèle de régulation mécanique proposé impliquant le cytosquelette d'actinomyosine (c.). Adaptée de (Halder, Dupont et al. 2012)

La régulation mécanique de YAP et TAZ reste encore peu caractérisée. En 2012, Hadler et *al.*, proposaient un modèle plausible de cette régulation (**Figure 2-14 c.**) : lorsque des cellules sont capables de s'étaler librement sur l'ECM ou lorsque les cellules sont cultivées sur un substrat rigide, les forces extracellulaires conduisent à la formation des complexes d'adhérence au niveau des intégrines et au développement de

structures contractiles intracellulaires de filaments d'actine contenant des molécules de myosine. Ces éléments sont régulés par une signalisation bidirectionnelle entre RHO, ROCK (Kinase associé à RHO), les intégrines et l'activité des myosines. Les structures contractiles de F-actin maintiennent la localisation et l'activité nucléaire de YAP et TAZ grâce à des effecteurs encore non identifiés (Halder, Dupont et al. 2012).

## 2.4 Mécano-réponses

Les mécano-réponses sont l'ensemble des réponses cellulaires aux propriétés physiques de l'environnement. Si plusieurs réponses cellulaires se font de manière directe par une réorganisation des éléments cytoplasmiques comme par exemple l'activation des intégrines, la réorganisation des contacts focaux ou la génération de forces par le cytosquelette d'actino-myosine, certaines réponses cellulaires déclenchent des voies de signalisation spécifiques par l'intermédiaire de tyrosine kinases, de phosphatases et de RhoGTPases. Ces enzymes adaptent leurs activités en fonction des signaux biochimiques transmis. D'autres protéines changent de conformation en réponse à leur déploiement physique dans la cellule. Ces changements sont capables d'exposer des sites cryptiques comme par exemple lorsque la taline est étirée et expose un site d'interaction avec la vinculine. Les signaux transmis au noyau sont décryptés au niveau de la chromatine qui peut changer de conformation. L'intégration de l'ensemble de ces messages se traduit par une réponse d'amplitude variable d'activité transcriptionnelle impliquée dans de très nombreux processus fondamentaux pour les cellules tels que la synthèse de protéines, la prolifération et la différenciation cellulaire (Wang, Tytell et al. 2009, Dupont, Morsut et al. 2011).

### 2.4.1 Noyau cellulaire

Le noyau est la caractéristique principale des cellules eucaryotes. Il représente l'organite le plus grand et le plus rigide des cellules. Cet organite contient l'information génétique et des facteurs de transcription permettant de traiter de manière effective le génome (Dahl and Kalinowski 2011, Isermann and Lammerding 2013). Le noyau est divisé en deux : l'enveloppe nucléaire et l'intérieur nucléaire. L'enveloppe nucléaire est constituée d'une bicouche de phospholipides et d'une lamina nucléaire. Les membranes nucléaires interne et externe se rejoignent au niveau des pores nucléaires. Ces pores permettent le transport de molécules entre le noyau et le cytoplasme et vice-versa (Dahl, Ribeiro et al. 2008, Graham and Burridge 2016). La lamina nucléaire, composée principalement de lamines (**2.3.2.1.2.4**) fait partie intégrante du complexe LINC défini précédemment (**2.3.2.1.2**). Le nucléoplasme, quant à lui, est principalement composé de chromatine ainsi que d'autres structures nucléaires comme le nucléole ou les corps de Cajal ainsi que des biomolécules comme les spectrines, les myosines, l'actine nucléaire ou encore les lamines (Dahl, Ribeiro et al. 2008, Dahl and Kalinowski 2011, Isermann and Lammerding 2013).

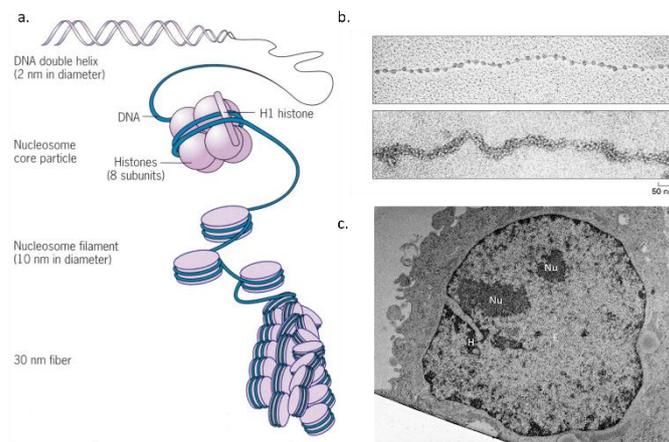
#### 2.4.1.1 *Lamina nucléaire, principal composant de l'enveloppe nucléaire*

Le noyau est totalement intégré d'un point de vue mécanique grâce au complexe LINC qui permet la liaison entre le cytosquelette et le nucléosquelette. Ce nucléosquelette, ou lamina nucléaire, est principalement composé de lamines (**2.3.2.1.2.4**). Ce réseau protéique dense et filamenteux, d'environ 20 à 50 nm d'épaisseur, se comporte comme une coquille élastique et confère au noyau sa morphologie. Il joue également un rôle dans l'espacement des pores nucléaires (Dahl and Kalinowski 2011, Isermann and Lammerding 2013, Fedorchak, Kaminski et al. 2014).

### 2.4.1.2 Chromatine, principal composant de l'intérieur nucléaire

Découverte par Walter Flemming dans les années 1880s (Flemming 1882), la chromatine doit son nom à son affinité pour les colorants (Olins and Olins 2003, Gaspar-Maia, Alajem et al. 2011). La chromatine est l'ensemble de l'ADN (acide désoxyribonucléique, support de l'information génétique) associé de manière directe ou indirecte à des protéines et des molécules parmi lesquelles les histones, des facteurs de liaison à l'ADN, les machineries de transcription, de réplication et de réparation qui respectivement transcrivent, copient et maintiennent en état l'ADN (Van Steensel 2011).

Le nucléosome est l'unité fondamentale de la chromatine. Il en existe près de  $3.10^7$  dans un noyau cellulaire humain. Il est composé de 147 paires de base d'ADN entourées autour d'un octamère composé de deux séries de 4 histones cœur différents (H3, H4, H2A et H2B). Les nucléosomes sont reliés entre eux par 20-50 paires de bases d'ADN (Kouzarides 2007, Van Steensel 2011). Ils forment alors des filaments de nucléosome de 10 nm de diamètre, eux même organisés en fibre de chromatine d'environ 30 nm (**Figure 2-15 a. et b.**). Cet enroulement de l'ADN autour des histones permet de compacter près de 2 mètres d'information génétique dans un noyau d'un diamètre de 10-20  $\mu\text{m}$ . La chromatine est une structure non homogène dont la structure, l'emplacement et la fonction sont corrélés (Dahl, Ribeiro et al. 2008) La chromatine existe sous deux formes plus ou moins condensées : l'hétérochromatine et l'euchromatine (**Figure 2-15 c.**).



**Figure 2-15|Organisation de la chromatine.** La chromatine est une superstructure dans laquelle la double hélice d'ADN est enroulée autour d'histones et de protéines associées pour former le nucléosome. Ces nucléosomes s'organisent en filament de 10 nm de diamètre qui eux même s'organisent en fibres de chromatine de 30 nm (a.). Cette structuration des nucléosomes en monofilaments puis en fibres de chromatine est visible en microscopie électronique à transmission (b.). La chromatine est une structure non homogène existante sous deux formes plus ou moins condensées : l'hétérochromatine (H) et l'euchromatine (E). Le nucléole (Nu) et la structuration de la chromatine sont visibles en microscopie électronique à transmission (c.).

#### 2.4.1.2.1 Hétérochromatine

L'hétérochromatine doit son nom à Emil Heitz qui observait dès 1928 que ce type de chromatine adoptait une teinte très importante lorsqu'elle était colorée à l'acide acétique carmin (Dillon and Festenstein 2002, Gaspar-Maia, Alajem et al. 2011). L'hétérochromatine est une forme très compacte de la chromatine, généralement située autour du nucléole et à la périphérie nucléaire (Van Steensel 2011). L'hétérochromatine existe sous deux types dans les cellules eucaryotes : constitutive et facultative. L'hétérochromatine constitutive correspond aux centromères et télomères des chromosomes alors que l'hétérochromatine facultative contient l'ensemble des gènes restreints (Dillon and Festenstein 2002). Les cellules spécialisées, ayant par définition une proportion de gènes éteints plus ou moins importante, ont plus d'hétérochromatine que les cellules souches (Meshorer and Misteli 2006).

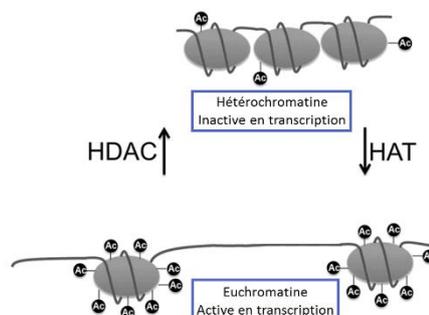
#### 2.4.1.2.2 Euchromatine

L'euchromatine est une forme très décondensée de la chromatine. L'euchromatine est très active en transcription car facilement accessible pour la machinerie transcriptionnelle. Elle concentre les gènes les plus souvent exprimés par les cellules (Van Steensel 2011)

#### 2.4.1.2.3 Plasticité de la chromatine

Le passage d'une forme décondensée, euchromatine, à une forme condensée, hétérochromatine, se fait par une modification des histones. En effet, les histones, en tant qu'éléments constitutifs clés du nucléosome, unité fondamentale de la chromatine, sont capable de réguler la réplication, la transcription ou encore la réparation de l'ADN. Ces histones agissent comme un régulateur épigénétique (c'est-à-dire qui induit un changement de phénotype mais pas un changement au niveau de la séquence d'ADN associée au phénotype) de la chromatine. Les modifications épigénétiques les plus caractérisées sont la méthylation et l'acétylation des histones.

Ainsi la tri-méthylation (3me) de H3K4, H3K36 ou H3K79 est un marqueur de la chromatine ouverte : euchromatine. Cette euchromatine est également caractérisée par une importante acétylation des histones. Ce marqueur épigénétique, induit par des histones acétylases transférases (HAT) peut être enlevé par des histones désacétylases (HDAC). Cette désacétylation mène à une répression de la transcription. En effet, l'extinction de gènes induite par HDAC permet le recrutement d'une histone méthyl-transférase spécifique à K9. Ce transfert de méthyl provoque une liaison avec la protéine HP1 (hétérochromatine protéine 1) permettant la répression de la transcription et la transformation en hétérochromatine (Figure 2-16). L'hétérochromatine est également enrichie en 3me au niveau de H3K9, H3K27 et H4K20. D'autres modifications épigénétique des histones existent comme la phosphorylation ou l'ubiquitinylation (Kouzarides 2007, Bártová, Krejčí et al. 2008).



**Figure 2-16|Plasticité de la chromatine associée aux modifications épigénétique des histones.** L'euchromatine est riche en histones acétylés. Cette acétylation des histones est réalisée par des histones acétylases transférases (HAT). Ce marqueur épigénétique peut être enlevé par des histones désacétylases (HDAC). Cette désacétylation induit le recrutement d'une histone méthyl-transférase spécifique à K9 permettant aux histones de lier HP1 qui à son tour conduit à la répression de la transcription et la transformation en hétérochromatine. Adaptée de (Whittle and Singewald 2014) et (Bártová, Krejčí et al. 2008)

#### 2.4.1.2.4 Histones Désacétylases (HDAC)

Les histones désacétylases correspondent à une très large famille d'enzymes préservée au cours de l'évolution. Présentes chez les procaryotes et les eucaryotes, elles jouent un rôle crucial dans de nombreux processus biologiques principalement en limitant la transcription. Le génome des mammifères encode pour 11 histones désacétylases différentes. Ces protéines bien qu'ayant un domaine désacétylase très conservé peuvent être classées en 4 classes : I, IIa, IIb et IV qui diffèrent à la fois en termes de structure, de fonctions enzymatiques ou encore en termes de localisation cellulaire. Un autre groupe de désacétylases souvent

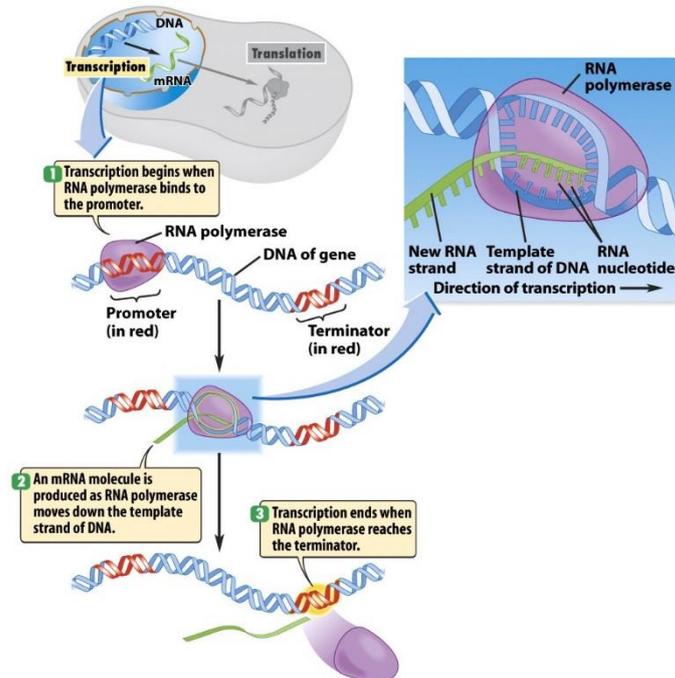
référé comme HDAC de classe III existe. Il s'agit des sirtuines qui comptent 7 représentants. (de Ruijter, van Gennip et al. 2003, Dokmanovic, Clarke et al. 2007, Haberland, Montgomery et al. 2009)

La classe I des histones est composée des HDAC 1, 2, 3 et 8. Ces histones désacétylases exprimées de manière omniprésente dans les cellules sont principalement localisées dans le noyau. Elles sont caractérisées par une activité enzymatique et une structure très simple composé du domaine désacétylase et de court domaine amino- et carboxy- terminal. La classe IIa des histones est composée des HDAC 4, 6, 7, et 9 qui sont caractérisée par de larges extensions N-terminal et des sites de liaison au facteur de transcription MEF2. Leurs expressions sont particulièrement restreintes. HDAC 5 et 9 sont particulièrement enrichies dans les cellules des muscles, du cœur et du cerveau. HDAC 7 est principalement retrouvé dans les cellules endothéliales. La classe IIb des HDAC est constituée de deux membres : HDAC 6 et 10. HDAC 6 est localisé dans le cytoplasme des cellules quand les autres HDAC de la classe II sont capables d'être localisées d'être dans le noyau ou le cytoplasme selon les signaux. La dernière classe, IV, ne comporte qu'un seul membre, HDAC 11. (Dokmanovic, Clarke et al. 2007, Haberland, Montgomery et al. 2009)

### 2.4.1.3 Transcription

La transcription est une activité nucléaire essentielle à la vie cellulaire. Cette activité permet de transcrire l'ADN en ARN (acide ribonucléique) messagers qui par la suite seront transférés vers le cytoplasme où ils seront traduits en protéines. La transcription fidèle de l'ADN en ARN se fait par l'ARN polymérase II à l'aide de plusieurs facteurs protéiques, les facteurs de transcription. La structure de la chromatine et le packaging de l'ADN sous la forme de nucléosome permettent aux cellules eucaryotes de réguler très précisément l'expression génétique. En effet, la décondensation de la chromatine rend accessible l'ADN à l'ARN polymérase II alors que condensation empêche la transcription et la synthèse d'ARN messager par l'ARN Pol II. Cette régulation de l'expression génétique est cruciale pour l'ensemble des fonctions des cellules et des organismes. (Venkatesh and Workman 2015)

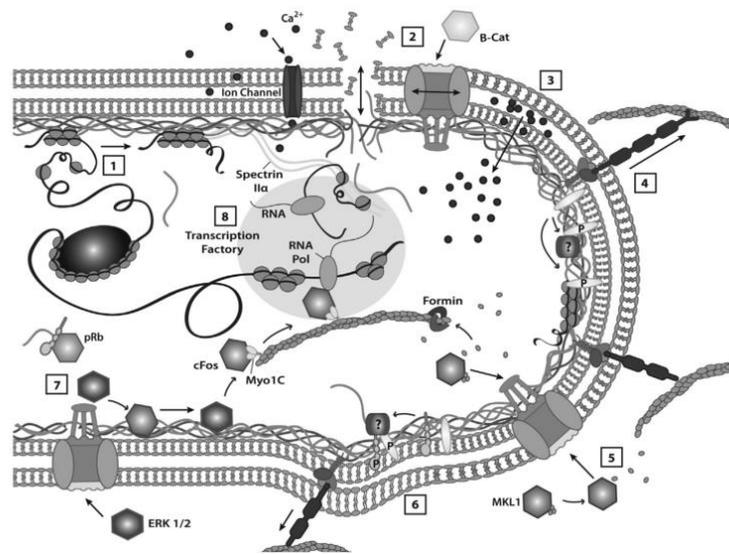
La transcription se fait généralement en 3 phases : initiation, élongation et terminaison. La phase d'**initiation** est la phase durant laquelle, l'ARN polymérase II reconnaît et se lie au promoteur des gènes. La phase d'**élongation** durant laquelle la synthèse d'ARN a lieu. La phase finale, de **terminaison**, est la phase dans laquelle l'ARN transcrit est relâché par l'ARN polymérase II qui a son tour se détache de l'ADN au niveau d'une zone spécifique, le terminateur (**Figure 2-17**). C'est la répétition de ce cycle qui détermine le niveau d'expression des gènes transcrits (Venkatesh and Workman 2015).



**Figure 2-17 | Mécanisme de transcription.** La transcription est une activité nucléaire au cours de laquelle l'ADN est transcrit en ARN messager. Elle est organisée en 3 phases : initiation, élongation et terminaison. L'ARN polymérase se lie à l'ADN au niveau d'un promoteur au cours de la phase d'initiation (1). Une molécule d'ARN message est produite par la polymérase au cours de la phase d'élongation (2). Enfin, au niveau du terminateur, l'ARN messager se sépare de l'ARN polymérase II qui elle-même se décroche de l'ADN (3).

## 2.4.2 Mécano-transduction nucléaire

Le génome est « directement » connecté au microenvironnement cellulaire. Cette connexion physique, outre le fait de permettre aux signaux mécaniques d'agir directement sur la transcription et l'organisation de la chromatine, permet de moduler l'entrée des signaux biochimiques dans le noyau à travers la régulation de la perméabilité des pores nucléaires (Fedorchak, Kaminski et al. 2014). Ces signaux modifient alors l'activité nucléaire et plus particulièrement la transcription de plusieurs manières. Les mécanismes impliqués dans cette altération restent encore particulièrement incompris, cependant différents modèles ont été proposés par Wang *et al.* ainsi que Fedorchak *et al.* (Wang, Tytell et al. 2009, Fedorchak, Kaminski et al. 2014).



**Figure 2-18 | Mécanismes potentiels d'altération de la transcription par les forces mécaniques.** Les forces appliquées au noyau peuvent induire une distorsion de la membrane nucléaire qui en se propageant à la chromatine modifie sa conformation. Les forces peuvent également modifier la structure de certaines protéines nucléaires et permettre ainsi la libération ou la rétention de facteurs de transcription ou l'import de molécules ou encore le transport d'ions de et vers le noyau. Adaptée de (Fedorchak, Kaminski et al. 2014)

La chromatine est liée à la lamina nucléaire à travers des domaines spécifiques, les LAD (*Lamina associated domain*). Chez les mammifères, près 1 300 LAD existent couvrant 35 à 40% du génome. Les gènes présents au sein de ces domaines spécifiques sont éteints. Des forces provenant du cytosquelette via les complexes LINC, en atteignant ces domaines, sont capables de modifier l'organisation physique de la chromatine. Ces changements d'organisation de la chromatine peuvent restreindre ou faciliter l'accessibilité des facteurs de transcription, des ADN/ARN polymérase, des hélicases ou encore des topoisomérases et donc éteindre ou allumer certains gènes (**Figure 2-18 a.**). Le complexe LINC et le nucléosquelette sont également liés au niveau des complexes des pores nucléaires ; les forces transmises sont donc capable de modifier la structure de ces complexes altérant au passage leur perméabilité et donc le transport de molécules vers l'intérieur ou l'extérieur du noyau (**Figure 2-18 b.**). La distorsion de la membrane nucléaire induite par les forces transmises le long du cytosquelette permet également aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  d'entrer et d'induire la transcription de gènes associés (**Figure 2-18 c.**). Etant donné que les lamines et l'émerine sont capables de lier des facteurs de transcription ainsi que des facteurs d'épissage, les forces transmises au noyau de manière mécanique sont capables d'altérer l'expression génétique et l'expression de protéines à travers la séquestration, ou la modification de ces facteurs (**Figure 2-18 d.**) (Wang, Gerstein et al. 2009, Fedorchak, Kaminski et al. 2014).

## 2.5 Cas particulier du cancer

Le rôle crucial des phénomènes de mécano-sensation et mécano-transduction dans les processus cellulaires ne sont désormais plus à démontrer. Il n'est donc pas étonnant qu'une altération ou une modification d'un des éléments impliqués dans ces phénomènes, comme par exemple une rigidification de l'environnement cellulaire ou une mutation de l'une des molécules impliquées dans la transmission des forces au noyau, soit à l'origine de nombreuses maladies parmi lesquelles l'ostéoporose, l'artériosclérose, la maladie polykistiques des reins dans le cadre de modification du microenvironnement ou encore la progéria (Syndrome de Hutchinson-Gilford) et de nombreuses dystrophies musculaires dans le cas de mutations (Jaalouk and Lammerding 2009). Ces modifications et altérations de la mécano-sensation et – transduction sont également impliquées dans la tumorigénèse et la formation de métastase. En effet, dans le cadre du cancer, une

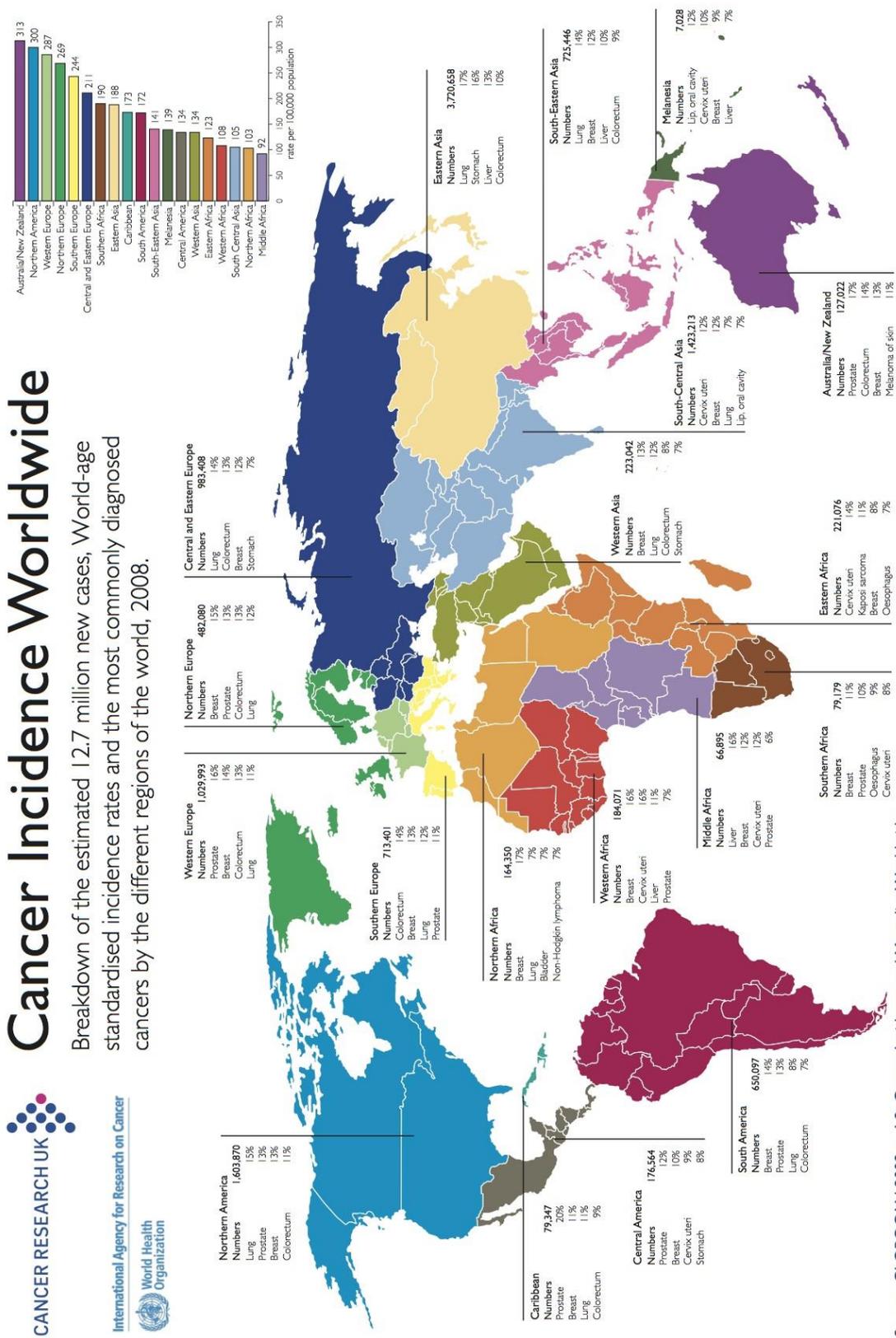
rigidification de l'ECM est associée à l'environnement tumoral. De plus, si le cancer résulte du fonctionnement anormal des cellules et plus particulièrement d'une dérégulation du cycle cellulaire, de la réparation de l'ADN ou encore de la suppression de l'apoptose, les processus de mécano-sensation et –transduction modulent de nombreuses fonctions nécessaires à la tumorigénèse et à la formation de métastases comme par exemple, la survie, la prolifération, la migration ou encore la (dé)-différentiation.

## 2.5.1 Cancer

Le terme « cancer » regroupe un large groupe de maladies hétérogènes pour lesquelles la prolifération cellulaire n'est plus contrôlée. Cette prolifération non contrôlée mène à la formation d'une tumeur. Le cancer est caractérisé par cette tumeur qui prend la forme d'une masse jusqu'à 10 fois plus rigide que son environnement. Cette caractéristique était déjà connue des Egyptiens qui détectaient déjà les tumeurs par palpation (une méthode de diagnostic toujours en vigueur aujourd'hui) et a conduit à l'origine du mot qualifiant la science qui étudie les cancers. En effet, le terme « oncologie » dérive du grec ancien « onkos » qui signifie masse. Le cancer est une maladie apparue très tôt dans l'histoire de l'humanité. En effet des traces d'ostéosarcome (tumeur maligne osseuse) ont été découvertes en Afrique du Sud sur une métatarse d'un individu, sans doute hominidé, ayant vécu il y a plus de 1,7 millions d'années (Edward, Patrick et al. 2016)

### 2.5.1.1 Incidence mondiale

Le cancer est un véritable fléau à l'échelle mondiale, touchant plusieurs millions d'hommes, de femmes et d'enfants. En 2012, les cancers les plus fréquents, sexes et âges confondus, sont les cancers du poumon (13%), les cancers de la poitrine (11,9%) suivi par le cancer colorectal (9,7%) (**Figure 2-20**). Ces incidences sont à replacées dans leurs contextes géographiques et médicaux. En effet, elles varient énormément d'une région géographique à l'autre et selon le type de cancer (**Figure 2-19**). En 2012, près 14 millions de nouveaux cas ont été diagnostiqués et près de 8 millions de personnes en sont décédées (Stewart and Wild 2016).

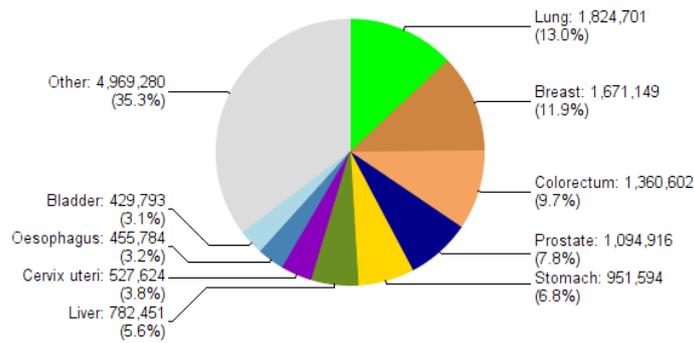


© Cancer Research UK  
 Registered charity no. 108944 (England & Wales)  
 & 230166 (Scotland)

<http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/>

Source: GLOBOCAN 2008, v. 1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide. IARC, 2010 (<http://globocan.iarc.fr>)  
 Map updated February 2011

**Figure 2-19|Incidence mondiale du cancer.** Si le cancer est un fléau mondial qui touche des millions d’hommes, de femmes et d’enfants, son incidence varie énormément selon les régions géographiques et les types de cancer. Ainsi, en Europe de l’Ouest, les principaux cancers sont ceux de la prostate, de la poitrine et le colorectal alors qu’en Afrique de l’Ouest, ce sont ceux de la poitrine, de l’utérus et du foie qui prédominent. Adaptée de l’agence internationale pour la recherche sur le cancer (IARC).



**Figure 2-20|Incidence des cancers autour du monde en 2012.** Ces résultats issus de l'enquête Globocan 2012 montrent que les cancers les plus répandus autour du monde sont les cancers du poumon, de la poitrine et les cancers colorectaux. Adaptée de (Stewart and Wild 2016)

### 2.5.1.2 Origines

Le cancer est une maladie issue de changements génétiques et épigénétiques au sein d'une cellule conduisant à une prolifération non contrôlée des cellules. Ces cellules ne sont plus sensibles aux signaux permettant un arrêt de la prolifération cellulaire et réussissent à échapper à la mort cellulaire par apoptose. Cette prolifération rapide entraîne le risque de mutations couplées à une mauvaise réparation de l'ADN et dans de nombreux cas à une instabilité chromosomique.

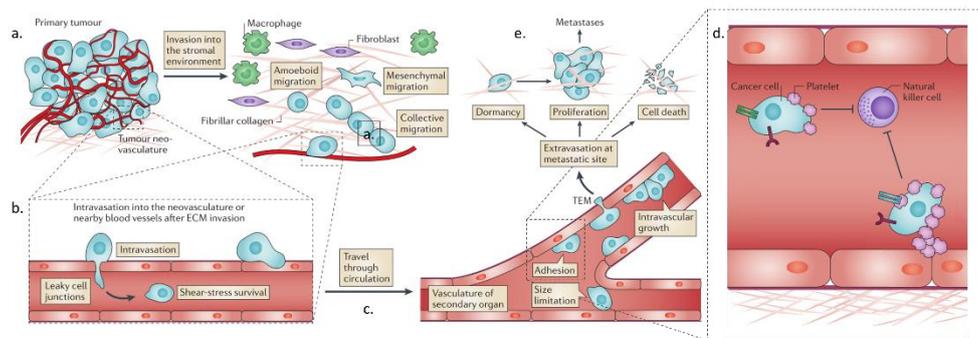
## 2.5.2 Métastase

Les métastases sont responsables de près de 90% des décès liés au cancer (Joyce and Pollard 2009, Reymond, d'Agua et al. 2013, Gilkes, Semenza et al. 2014). Afin de créer des métastases, les cellules de la tumeur primaire doivent quitter la tumeur primaire, se disséminer à travers la circulation sanguine, coloniser de nouveaux sites et enfin proliférer au sein d'organes cibles (Joyce and Pollard 2009, Nguyen, Bos et al. 2009, Reymond, d'Agua et al. 2013). La dissémination des cellules cancéreuses requiert une transition épithélio-mésenchymateuse. En effet, la dé-différentiation des cellules liées à la transition épithélio-mésenchymateuse augmente la motilité des cellules cancéreuses et favorise la dissémination. Si ces cellules sont très motiles, elles sont incapables de proliférer. De ce fait, la formation de métastase nécessite une transition mésenchymo-épithéliales des cellules afin qu'elles puissent à nouveau proliférer. (Brabletz 2012).

### 2.5.2.1 Dissémination métastatique

La dissémination métastatique est le phénomène en plusieurs étapes, souvent inefficaces (moins de 0,01% des cellules parviennent à créer des métastases), au cours duquel des cellules s'échappent de la tumeur primaire, intravasent dans le système circulatoire, y survivent, s'en extraient, colonisent de nouveaux sites à distance de la tumeur primaire et enfin parviennent à survivre. En effet, un certain nombre de cellules cancéreuses de la tumeur primaire commencent à s'en échapper au niveau de la membrane basale en envahissant par migration groupée ou individuelle allongée (également caractérisé de mésenchymateuse) ou ronde (amiboïde) le stroma (**Figure 2-21 a.**). Afin de pouvoir se disséminer dans l'ensemble de la circulation, les cellules entre dans les circulations sanguines et lymphatiques par un procédé d'intravasation paracellulaire ou trans-cellulaire. Elles utilisent généralement les capillaires nouvellement créés lors de l'angiogenèse qui présente de faibles jonctions cellulaires (**Figure 2-21 b.**). Ces cellules se retrouvent alors dans un microenvironnement mécanique drastiquement différent de leur microenvironnement d'origine (le sang se comportant comme un liquide viscoélastique). La circulation sanguine est la principale voie de dissémination des métastases (**Figure 2-21 c.**). Sur les dizaines de milliers de cellules cancéreuses qui parviennent à entrer chaque jour dans la circulation sanguine, moins de 0,01% parviendra à survivre pour créer

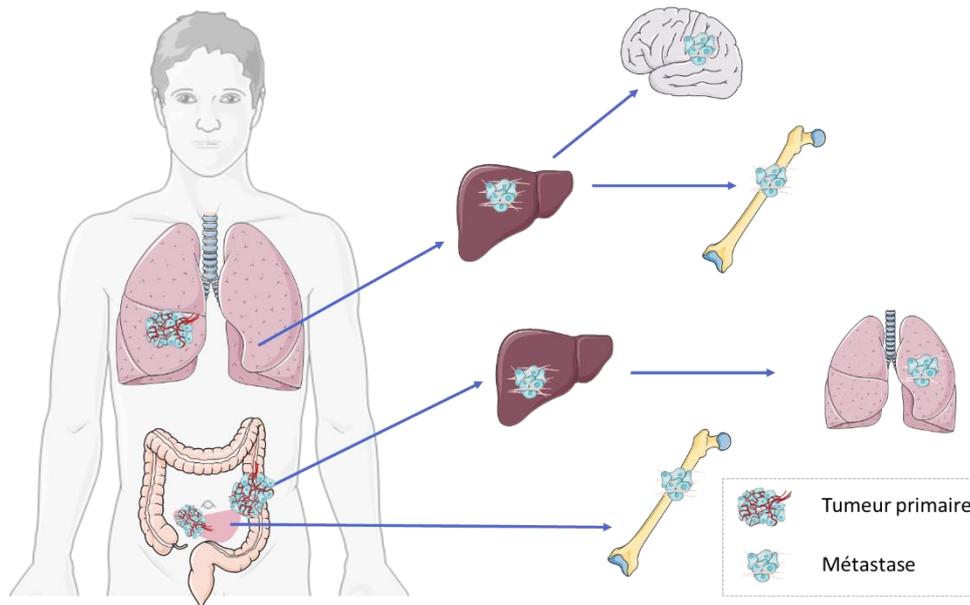
plus tard des métastases. Ce faible taux de survie s'explique par les forces de cisaillement de la circulation sanguine induit par les battements cardiaque et la surveillance par des cellules immunitaires et plus particulièrement les lymphocytes NKT (Natural Killer T). Les cellules utilisent différentes stratégies pour survivre à cet environnement hostile. L'une des stratégies les plus surprenantes mises en place par les cellules est leur association avec des plaquettes dès leur entrée dans la circulation sanguine. L'utilisation de thrombocytes comme bouclier par les cellules métastatiques vont non seulement leur permettre de résister aux forces de cisaillement et de passer inaperçues aux « yeux » des cellules immunitaires mais aussi favoriser l'attachement des cellules métastatiques à la paroi des vaisseaux sanguins (**Figure 2-21 d.**) En effet, la coagulation des thrombocytes favorise l'extravasation des cellules métastatiques dans des sites secondaires. Les sites métastatiques, dans lesquels les cellules s'extravasent, apportent leurs nouveaux lots de challenges aux cellules métastatiques qui doivent s'y établir et proliférer. Une fois arrivées, dans le parenchyme, la plupart de ces cellules entrent en quiescence et seules quelques-unes d'entre elles parviennent par la suite à se réactiver et induire une tumeur secondaire (**Figure 2-21 e.**) (Joyce and Pollard 2009, Reymond, d'Agua et al. 2013).



**Figure 2-21 | Dissémination métastatique.** La dissémination métastatique est le phénomène en plusieurs étapes, au cours duquel des cellules s'échappent de la tumeur primaire (a.), intravasent dans le système circulatoire (b.), y survivent en s'associant aux thrombocytes (c.), s'en extraient en adhérant aux cellules endothéliales grâce à la coagulation des plaquettes (d.), colonisent de nouveaux sites à distance de la tumeur primaire et enfin parviennent à survivre (e.). Adaptée de (Reymond, d'Agua et al. 2013).

### 2.5.2.2 Organotropisme

Le microenvironnement et ses propriétés physiques, biochimiques et mécaniques jouent un rôle clé à chacune des étapes de la dissémination métastatique. Ainsi une cellule cancéreuse issue d'un carcinome colorectal traversera des tissus ayant une importante amplitude de rigidité, passant par la membrane basale, le sang, le stroma, etc. Le lien entre les tumeurs et leurs microenvironnements a rapidement été mis en évidence. En 1889, Stephen Paget développe ainsi son hypothèse de « *Seed and Soil* ». Il part d'une observation simple : les grains de pollen des plantes sont disséminés partout grâce au vent, cependant de nouvelles plantes ne poussent que dans des environnements qui leurs sont favorables. Il applique cette observation au cancer et suggèrent que la formation de métastases dépend à la fois des cellules cancéreuses et d'un microenvironnement favorable (Paget). Cette hypothèse est toujours valable près de 130 ans après. De nombreux cancers métastasent ainsi dans des organes types (**Figure 2-22**). Ce phénomène est qualifié d'organotropisme.



**Figure 2-22 | Organotropisme et métastases.** Le lien entre les tumeurs et leurs microenvironnements est très important. Ce lien conduit certains cancers à ne métastaser que dans certains organes cibles. Ainsi le cancer de la prostate métastase principalement dans les os alors que le cancer du poumon métastase dans le foie, le cerveau et les os. Adaptée de (Obenauf and Massagué, Nguyen, Bos et al. 2009) et Servier Medical Art.

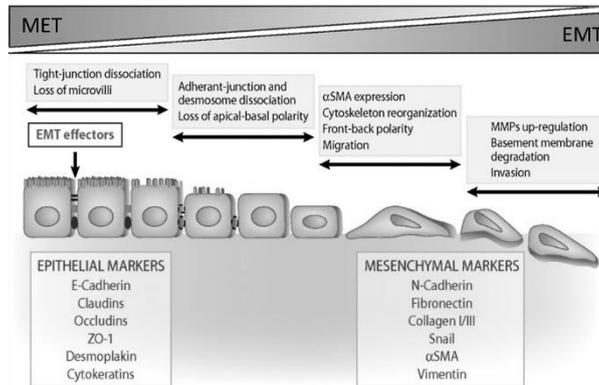
Rapidement, face au modèle de dissémination des cancers, le rôle de la circulation sanguine est évoqué. C'est le modèle développé par James Ewing en 1929 qui basait la dissémination métastatique principalement sur la circulation sanguine et la structure anatomique des vaisseaux plus ou moins étroits par lesquels les cellules passaient. Cette hypothèse prévaudra plusieurs dizaines d'années (Fidler 2003). Cependant même si la circulation et la taille des capillaires de certains organes comme le foie favorisent une implantation des métastases dans ces organes, le microenvironnement et ses propriétés intrinsèques jouent un rôle clé dans l'établissement et la prolifération des cellules.

### 2.5.2.3 Transition épithélio-mésenchymateuse et vice-versa dans le cancer

Les transitions épithélio-mésenchymateuse (TEM) et mésenchymo-épithéliale (TME) sont des événements biologiques cruciaux pour le développement de tissus et des organes. Ils jouent également un rôle dans la pathogénèse de certaines maladies ; ils sont par exemple impliqués dans la dissémination métastatique, les inflammations chroniques liées aux fibroses ou encore dans la carcinogénèse colorectale (Polyak and Weinberg 2009, Sipos and Galamb 2012). La transition épithélio-mésenchymateuse est impliquée dans la formation de métastases et l'acquisition de la résistance aux thérapies anti-cancéreuses, deux des principales causes de décès associés au cancer. Il semblerait également qu'elle soit impliquée dans la génération de cellules cancéreuses ayant des propriétés proches de celles des cellules souches.

Lors d'une TEM, les cellules épithéliales perdent progressivement leurs jonctions serrées, leurs desmosomes et leur polarité apico-basale et leurs marqueurs associés (E-cadhérine, ZO-1, Cytokeratines) au profit des caractéristiques des cellules mésenchymateuses (caractérisées par les marqueurs suivants : N-Cadhérine, Fibronectine, Vimentine, etc...). Ces dernières ont une polarité avant-arrière et une nouvelle organisation permettant une migration plus facile et rapide. Elles sont également capables de dégrader la membrane basale ce qui facilite l'invasion du stroma sous-jacent (**Figure 2-23**). Les cellules mésenchymateuses expriment également d'importante quantité de Twist1. Plusieurs voies de signalisation oncogéniques sont capables d'activer la TEM. Il est également intéressant de noter que certains éléments de ces voies se retrouvent de manière indirecte régulés par la rigidité de la matrice comme par exemple les myo-

sin light chain kinases (MLCK) ou encore les Rho-dependent protein kinase (ROCK) (2.3.2.2). L'activation de la phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K) joue également un rôle central dans la TEM (Sipos and Galamb 2012). En raison du rôle fondamental de la TEM dans la dissémination des cellules cancéreuses, l'inhibition de la TEM comme thérapie anticancéreuse fait l'objet de nombreuses études (Ginnebaugh, Ahmad et al. 2014, Kothari, Mi et al. 2014, Marcucci, Stassi et al. 2016).



**Figure 2-23 | Transition épithélio-mésenchymateuse.** La transition épithélio-mésenchymateuse (ici annotée EMT, pour l'anglais *epithelial mesenchymal transition*) est le phénomène par lequel les cellules épithéliales perdent progressivement leurs caractéristiques épithéliales et marqueurs associés au détriment de ceux des cellules mésenchymateuses. Cette transition permet de dédifférencier les cellules et les rendre plus motiles. Le processus inverse est la transition mésenchymo-épithéliale (ici annotée MET). Adaptée de (Aroeira, Aguilera et al. 2007).

La transition mésenchymo-épithéliale est le phénomène biologique inverse de la TEM. Au cours de cette transition, les cellules perdent leurs caractéristiques mésenchymateuses et plus particulièrement leur motilité au profit des caractéristiques des cellules épithéliales polarisées. Cette transition joue un rôle clé dans le développement et plus particulièrement dans le développement de tissus cardiaques ou encore dans le développement des tissus rénaux. Dans le cas du cancer, la TME permet aux cellules ayant survécu à la dissémination métastatique de pouvoir proliférer (Sipos and Galamb 2012).

## 2.5.3 Cancer colorectal

Le cancer colorectal est une cause importante de mortalité dans le monde et plus particulièrement dans les pays ayant un indice important de développement humain. La progression maligne de ce cancer s'étale sur plusieurs dizaines d'années et résulte d'un éventail de mutations génétiques et épigénétiques (Rajagopalan, Nowak et al. 2003, Lao and Grady 2011). Si cette progression maligne est longue, la dissémination métastatique qui s'ensuit est rapide et conduit à de nombreux décès chaque année (Nguyen, Bos et al. 2009).

### 2.5.3.1 Côlon

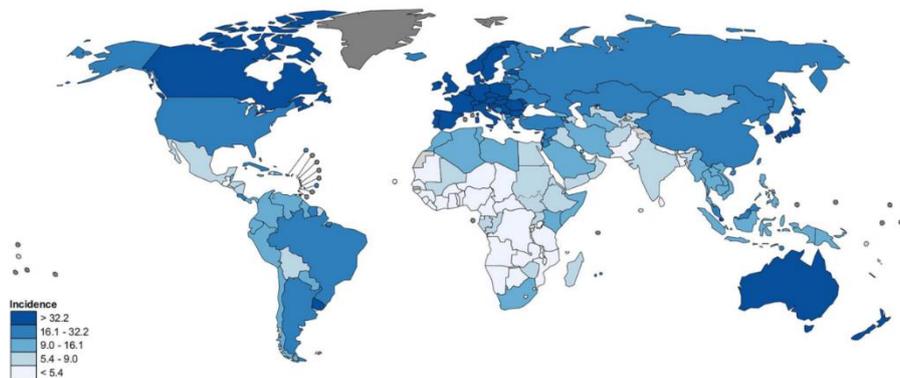
Le côlon, ou gros intestin, représente la dernière partie de l'appareil digestif humain. Le côlon débute au niveau de la valve iléocœcale qui marque la fin de l'intestin grêle. Le rectum représente la dernière partie du côlon qui prend fin au niveau de l'anus (Markowitz, Dawson et al. 2002). Le gros intestin mesure environ 1 mètre 50. Le côlon joue un rôle important dans la digestion : il permet de récupérer l'eau et donc de maintenir l'équilibre hydrique de l'organisme, ainsi que d'absorber certaines vitamines tout en stockant les déchets issus de la digestion.

Les cellules épithéliales du côlon se renouvellent tous les 5 jours au niveau de cryptes (Markowitz, Dawson et al. 2002). En effet, la paroi interne du côlon compte près de  $10^7$  cryptes. Chacune de ces cryptes contient

plusieurs milliers de cellules différenciées et quelques cellules souches. Si ces cellules souches se divisent lentement et asymétriquement, les cellules différenciées se multiplient rapidement avant de voyager vers le haut de la crypte où elles entreront en apoptose après avoir exercé leurs activités métaboliques. Ainsi chaque jour, c'est près de  $10^{10}$  cellules qui sont éliminées et remplacées (Rajagopalan, Nowak et al. 2003).

### 2.5.3.2 Incidence du cancer colorectal

Le cancer colorectal représente le troisième cancer le plus diagnostiqué au monde et la quatrième cause de décès liée au cancer dans le monde (Lao and Grady 2011, Arnold, Sierra et al. 2016). L'incidence du cancer colorectal devrait augmenter de 60% avec l'apparition de 2,2 millions nouveaux cas et de plus d'1,1 millions de décès d'ici 2030. Il est intéressant d'observer que l'incidence et la mortalité de ce cancer peut varier jusqu'à 10 fois selon les régions du monde. En effet, plus des 2/3 de l'ensemble des cas de cancer colorectal et près de 60% de décès associés ont lieu dans des pays ayant un indice de développement humain très importants (Arnold, Sierra et al. 2016) comme les pays de l'Union Européenne, le Canada, l'Australie ou encore les USA (**Figure 2-24**).



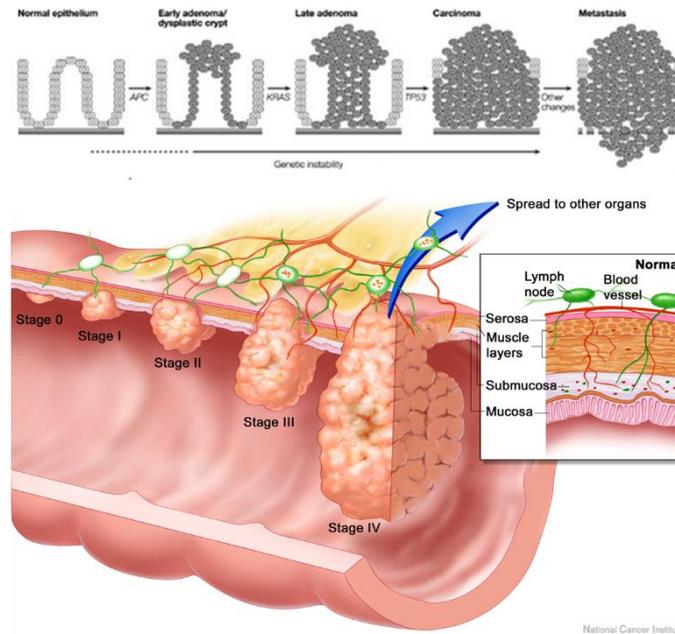
**Figure 2-24|Incidence des cancers colorectaux autour du monde.** L'incidence et la mortalité du cancer colorectal peut varier jusqu'à 10 fois selon les régions du monde. En effet, plus des 2/3 de l'ensemble des cas de cancer colorectal et près de 60% de décès associés ont lieu dans des pays ayant un indice de développement humain très important. Adaptée de (Arnold, Sierra et al. 2016)

D'un point de vue plus local, les cancers colorectaux constituent la seconde cause de décès par cancer en France. Ce chiffre est d'autant plus important en Alsace où la mortalité par cancer colorectal est la plus élevée chez les hommes et en seconde position chez les femmes.

### 2.5.3.3 Evolution du cancer colorectal

Le passage d'une hyperplasie colorectal à l'adénome au carcinome invasif est caractérisé par l'acquisition d'altérations génétiques sur une période allant de 20 à 30 ans (**Figure 2-25**) (Markowitz, Dawson et al. 2002, Rajagopalan, Nowak et al. 2003, Nguyen, Bos et al. 2009). Comme indiqué précédemment, près de  $10^{10}$  cellules sont remplacées chaque jour. Chacune de ces divisions cellulaires représente un risque de cancer colorectal. En effet, les événements de mutations ont lieu pendant la réplication de l'ADN et pendant la ségrégation des chromosomes. Parmi les principales mutations retrouvées dans les cancers, l'aneuploïdie (nombre anormal de chromosome) qui est caractérisée par une instabilité chromosomale importante (Rajagopalan, Nowak et al. 2003). Le cancer colorectal est initié par l'activation de la voie de signalisation *Wnt* que ce soit par une inactivation mutationnelle du suppresseur de tumeur *adenomatous polyposis coli* (*APC*) dans 85% des cas ou de l'activation de la voie de signalisation associée à  $\beta$ -caténine dans plus de la moitié des cas restants. La  $\beta$ -caténine étant régulée par *APC*, la mutation conduit au même effet. La crypte dans laquelle la cellule mutée pour *APC* se trouve devient alors dysplasique. Les cellules

s'accumulent peu à peu au niveau du haut de la crypte où elles vont former un polype. Pour que ce polype puisse évoluer en polype plus important, de nouvelles mutations sont requises comme par exemple *KRAS* ou *BRAF*. La transformation en carcinome apparait dans 10 à 20% des cas avec l'activation oncogénique de la voie de signalisation PI3K, l'inactivation de *TP53* et la perte de la voie de signalisation du suppresseur de tumeur TGF- $\beta$  (Rajagopalan, Nowak et al. 2003, Nguyen, Bos et al. 2009). Les cellules constituant la tumeur continuent de subir des mutations, la tumeur est donc hétérogène (Rajagopalan, Nowak et al. 2003).

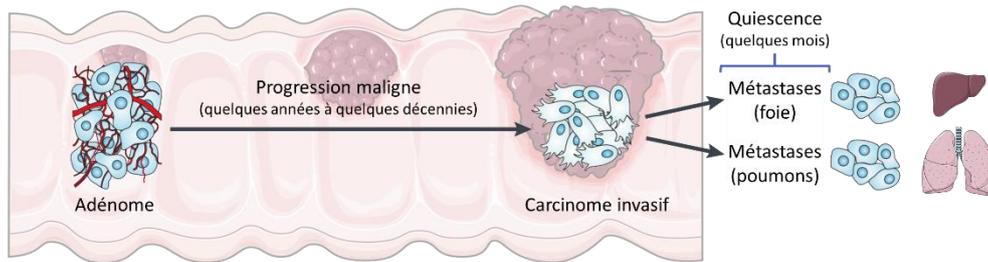


**Figure 2-25 | Mutations conduisant à la formation d'un carcinome colorectal.** Le cancer colorectal est initié par une inactivation mutationnelle du suppresseur de tumeur *adenomatous polyposis coli* (*APC*). La crypte dans laquelle la cellule mutée pour *APC* se trouve devient alors dysplastique. Les cellules s'accumulent peu à peu au niveau du haut de la crypte où elles vont former un polype. Ce polype évolue en adénome après une mutation pour *KRAS*. La transformation en carcinome apparait l'inactivation de la voie *TP53*. Les cellules cancéreuses sont ensuite capables de passer la membrane basale et de former des métastases. Adapté de (Rajagopalan, Nowak et al. 2003) et du National Cancer Institute.

Le cancer colorectal résulte non seulement l'accumulation de changements génétiques mais aussi épigénétiques ayant lieu dans les cellules épithéliales du colon les transformant en adénocarcinome. En effet, la plupart des cellules du cancer colorectal montrent une méthylation aberrante de l'ADN au niveau de certains gènes (entre plusieurs centaines et milliers de gènes anormalement méthylés) (Lao and Grady 2011).

#### 2.5.3.4 Dissémination métastatique du cancer colorectal

Les adénomes colorectaux, comme vu précédemment (2.5.3.3), mettent plusieurs dizaines d'années à se développer en carcinomes invasifs. Cependant une fois que ce stade est atteint, la dissémination et colonisation métastatique est très rapide (quelques mois). Les métastases issues des tumeurs colorectales s'étendent le long de la circulation mésentérique au niveau du foie dans près de 80% des cas. Il semblerait en effet, que la circulation mésentérique qui lie directement le côlon au foie et l'importante perméabilité des capillaires sinusoidaux du foie favorisent cette installation. Des métastases sont, dans de plus rares cas, retrouvées dans les poumons, ce qui suit la logique de la circulation sanguine. L'environnement mécano joue également un rôle dans cet établissement ; en effet, les cellules métastatiques issues de carcinomes colorectaux ont une préférence d'adhérence pour les tissus du foie et l'endothélium des poumons (Figure 2-26) (Markowitz, Dawson et al. 2002, Nguyen, Bos et al. 2009)



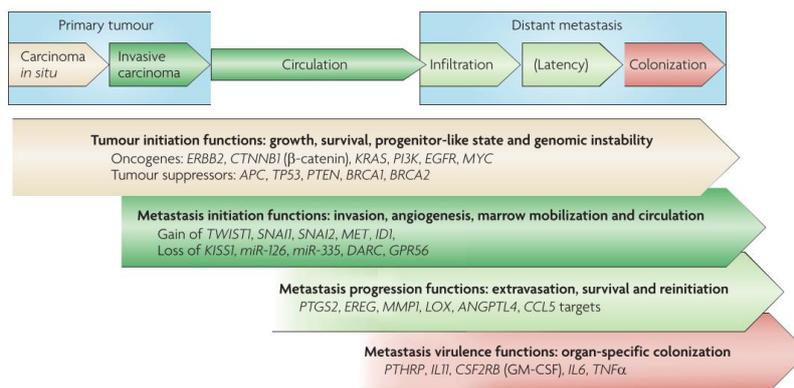
**Figure 2-26|Dissémination métastatique des cellules de carcinome colorectal.** Si la progression maligne de l'adénome au carcinome invasif met de nombreuses années, la dissémination métastatique qui s'ensuit est rapide. Les cellules cancéreuses du cancer colorectal établissent principalement des métastases au niveau du foie et des poumons par organotropisme en quelques mois. Adaptée de (Nguyen, Bos et al. 2009) et de Servier Medical Art

## 2.5.4 Cellule cancéreuse colorectale

La transition d'une tumeur non métastatique vers une tumeur métastatique s'accompagne d'un nombre important de changements génomiques et protéiques au sein des cellules tumorales (Lee and Wolgemuth 2016). Ces changements se traduisent par une morphologie, une organisation du cytosquelette, une architecture nucléaire et des comportements associés particuliers.

### 2.5.4.1 Changements génétiques associées au cancer

Afin de pouvoir proliférer et entrer en métastases, les cellules doivent pouvoir éviter l'apoptose, migrer, résister à l'anoikis (= apoptose des cellules épithéliales induite par un détachement du substrat), etc. De nombreux gènes et activités cellulaires spécifiques permettent la tumorigénèse (activation d'oncogènes et inactivation des gènes suppresseurs de tumeur) ou la formation de métastases. Les gènes impliqués dans ce dernier processus peuvent être classés en plusieurs catégories : initiation de la métastase, progression et enfin des gènes de virulence métastatiques (**Figure 2-27**) (Nguyen, Bos et al. 2009). Une analyse par transcriptome de ces gènes permet d'évaluer la virulence et le stade des cellules cancéreuses étudiées.



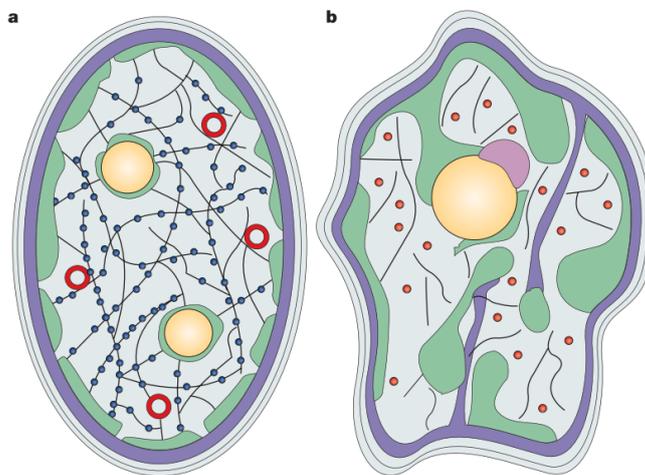
**Figure 2-27|Changements génétiques impliqués dans la tumorigénèse et la formation de métastase.** La transition d'une tumeur non métastatique à une tumeur agressive métastatique est gouvernée par l'activation de plusieurs oncogènes et l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeur. Adaptée de (Nguyen, Bos et al. 2009).

Ces changements génétiques et épigénétiques liés à la transformation maligne des cellules sont observables à l'échelle de la structure de la chromatine des cellules.

### 2.5.4.2 Architecture nucléaire

Comme indiqué précédemment (2.4.1.2), l'information génétique d'une cellule contenue dans l'ADN est organisée dans une superstructure, la chromatine, qui peut être plus ou moins condensée. Les zones condensées, en hétérochromatine, concentrent des gènes non exprimés par la cellule alors que l'euchromatine décondensée, concentre les gènes les plus souvent exprimés par la cellule. Les altérations de l'organisation de la chromatine sont donc associées à des changements de l'expression génétique et sont observables dans de nombreuses maladies comme par exemple dans la maladie de Huntington (qui est caractérisée par une acétylation et une méthylation aberrante des histones) (Portela and Esteller 2010). Les altérations de la morphologie et de la structure des noyaux sont donc des manifestations caractéristiques du cancer (Cherkezyan, Stypula-Cyrus et al. 2014).

Un changement au sein de l'organisation de la chromatine, associé à une expression altérée des gènes, est important dans le processus de transformation maligne. Le nucléole, qui est la sous-structure majeure du noyau, est également modifié. Ainsi, dans le cadre du cancer, les variations de tailles et de morphologies de noyaux, le nombre et la taille des nucléoles ainsi que l'organisation de la chromatine font partie des altérations de l'architecture nucléaire les plus fréquentes (Figure 2-28). Toutes ces altérations ne sont pas présentes en même temps et varient selon les cancers et les stades plus ou moins avancés de tumorigénèse. Les noyaux des cellules cancéreuses colorectales sont ainsi caractérisés par une perte de l'hétérochromatine périphérique et la formation d'agrégats intranucléaires dès les stades précoces (Cherkezyan, Stypula-Cyrus et al. 2014). Des stades plus avancés sont caractérisés par des nucléoles plus importants, des polylobulations (noyaux divisé en plusieurs lobes), des indentations et des variations importantes de taille et nombre de noyaux d'une cellule à l'autre (Zink, Fischer et al. 2004).



**Figure 2-28 | Architecture nucléaire d'une cellule saine vs celle d'une cellule cancéreuse.** Les noyaux de cellules saines disposent de plusieurs petits nucléoles (en jaune). L'hétérochromatine (ici en vert) est localisée au niveau de la périphérie nucléaire et au niveau des nucléoles (a.). Les noyaux des cellules cancéreuses sont très irréguliers. L'hétérochromatine perd sa localisation périphérique et forme des agrégats au sein du noyau. Les nucléoles sont également plus gros (b.). Adaptée de (Zink, Fischer et al. 2004).

Ces modifications de l'architecture nucléaire étaient déjà utilisées il y a plus de 150 ans dans le diagnostic du cancer. En effet, les premières traces écrites de l'observation de variation de taille de morphologies des noyaux nucléaires de cellules cancéreuses ont été réalisés en 1860 par Lionel Beale. Ces variations donneront même lieu au développement par George Papanicolaou d'un test permettant de mettre en évidence les cancers du col de l'utérus, plus communément appelé « Pap test » dans les années 1930s (Zink, Fischer et al. 2004).

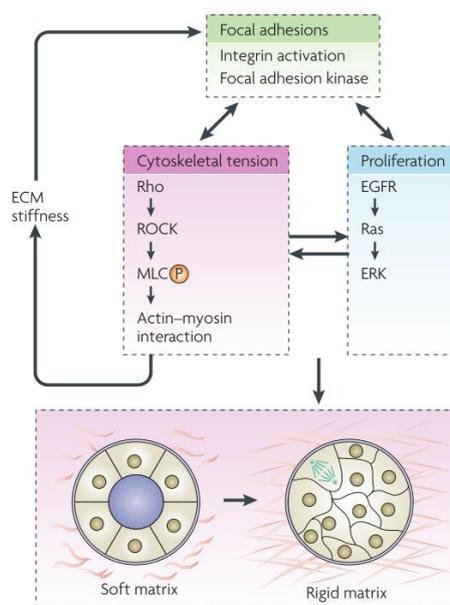
## 2.5.5 Cancer et mécano-transduction

Une tumeur est formée par des cellules biologiques qui fonctionnent mal. Ces cellules prolifèrent de manière incontrôlable et détruisent l'organisation du tissu dans lesquelles elles sont implantés (Suresh 2007). Ces cellules finissent par envahir le parenchyme et former des métastases. Depuis quelques années, de nombreuses études reconnaissent l'importance des phénomènes de mécano-sensation, -transduction et -réponses dans la tumorigénèse et la formation de métastases (Kumar and Weaver 2009) permettant d'établir un lien entre mécano-biologie et le fonctionnement de la cellule cancéreuse.

### 2.5.5.1 Rôle de la rigidité de l'environnement extracellulaire dans la tumorigénèse

Comme indiqué en introduction de cette partie sur le cas particulier du cancer (2.5), le cancer est une maladie liée à une altération de la mécano-transduction au sein des cellules et des tissus. L'environnement cellulaire et plus particulièrement la matrice extracellulaire subit de nombreuses transformations parmi lesquelles une augmentation importante du collagène et de la fibronectine au cours du processus de tumorigénèse (Gilkes, Semenza et al. 2014). Ces changements, conduisant à l'obtention d'un environnement jusqu'à 10 fois plus rigide vont avoir des incidences notables sur l'activité cellulaire à travers les voies de signalisation physiques et chimiques générées au sein de la cellule (2.3).

En effet, cette augmentation de rigidité du substrat associée à la rapide prolifération des cellules (Figure 2-29), induit une augmentation réciproque des forces de traction exercées par les cellules pour adhérer, ce qui entraîne une augmentation de la rigidité du cytosquelette d'actino-myosine ce qui conduit à son tour à une augmentation de la migration cellulaire (Gilkes, Semenza et al. 2014, Gu and Mooney 2016). La rigidité de la matrice régule donc l'invasion et la migration des cellules cancéreuses en favorisant la formation d'invadosomes et de lamellipodes (Kai, Laklai et al.). La réorganisation du cytosquelette d'actine associée à ce changement de rigidité est également liée à la famille des Rho GTPase et plus particulièrement ROCK qui est impliqué dans la mécano-transduction associée aux facteurs de transcription YAP et TAZ (2.3.2.2). YAP/TAZ par leur capacité à induire la prolifération cellulaire sont considérés comme d'importants oncogènes (Guo and Teng 2015, Moroishi, Hansen et al. 2015).



**Figure 2-29 | Rôle de la rigidité du substrat dans la tumorigénèse.** L'augmentation de la rigidité du microenvironnement cellulaire est sentie par les cellules au niveau des intégrines et des contacts focaux. Cette mécano-sensation conduit une augmentation des

forces générées par le cytosquelette qui vont en retour induire une nouvelle augmentation de la rigidité de l'ECM. La rigidité du microenvironnement conduit également à une prolifération cellulaire à la formation de la tumeur. Adaptée de (Jalouk and Lammerding 2009)

### 2.5.5.2 Rôle de la rigidité de l'environnement extracellulaire dans la formation de métastases.

Les forces mécaniques et plus particulièrement la rigidité de la matrice influençant la migration cellulaire (2.2.2). Elles jouent également un rôle important dans la formation de métastases (Indra, Undyala et al. 2011). Les cellules cancéreuses sont connues pour leurs prolifération et migration anormales. Cette migration est associée à une transition épithélio-mésenchymateuse (1.5.2.3). Cette TEM est induite par l'augmentation de la rigidité du microenvironnement tumoral, à travers le facteur de transcription Twist1. En 2015, Wei et al. ont démontré qu'une augmentation de la rigidité de la matrice provoque une phosphorylation au niveau des intégrines menant à la libération cytoplasmique de Twist1 par son ligand G3BP2. Twist1 est donc libre d'entrer dans le noyau et d'y induire la transcription des gènes impliqués dans la TEM et l'invasion cellulaire. YAP/TAZ et Twist1 ne font pas partie de la même voie de signalisation ; il semblerait donc que plusieurs voies de signalisation mécano-chimiques puissent être impliquées dans le cancer (Wei, Fattet et al. 2015).

Au cours du processus de dissémination métastatique, les cellules initiatrices de tumeurs sont confrontées à de nombreux environnements dont les propriétés mécaniques varient drastiquement d'un environnement à l'autre (**Tableau 2-1**).

Module de Young (Pa)	Tissus
175	Membrane basale
918	Stroma
320	Lymphes
120	Ganglion lymphatique
640	Foie

**Tableau 2-1 | Module de Young des microenvironnements traversés par les cellules cancéreuses.** Au cours du processus de dissémination métastatique, les cellules initiatrices de tumeurs sont confrontées à de nombreux environnements dont les propriétés mécaniques varient drastiquement d'un environnement à l'autre. Adaptée de (Rabineau, Kocgozlu et al. 2013).

Des travaux préliminaires ont démontré que sur ces substrats très mous, considérés comme défavorables, des cellules cancéreuses colorectales parviennent à survivre et à proliférer malgré d'importantes erreurs de ségrégation des chromosomes. Ces erreurs pourraient contribuer à augmenter l'agressivité des cellules tumorales (Rabineau, Kocgozlu et al. 2013).

En conclusion, les changements mécaniques de l'ECM associés au cancer ainsi que les voies de signalisation et la réorganisation du cytosquelette qui leur sont associés favorisent la transformation maligne, la tumorigénèse et la formation de métastases, en plus de toutes les mutations génétiques et de l'activité des oncogènes.

## Chapitre 3 Matériels et Méthodes

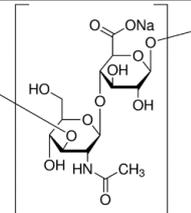
Afin d'étudier comment la plasticité de la chromatine oriente le destin des cellules saines et des cellules cancéreuses sur des matrices de faibles rigidités et d'étudier l'influence de la force d'interaction substrat-ligand sur l'adhérence cellulaire, de nombreuses techniques ont été mises en œuvre. Les substrats mous sont des films multicouches de polyélectrolytes à base de poly-L-lysine et d'acide hyaluronique rigidifiés par réaction chimique ou par ajout d'une strate de polyélectrolytes. L'organisation de la chromatine sur des substrats de faibles rigidités a été étudiée pour deux modèles de cellules épithéliales, les cellules épithéliales rénales de potaroo, PtK2 et les cellules d'adénocarcinome humain, SW480. Des expériences de viabilité cellulaire, d'immunofluorescence, de vidéo-microscopie et de microscopie électronique à transmission ont été réalisées afin de caractériser respectivement la survie, l'adhérence, la migration cellulaire et l'organisation de la chromatine. Des expériences d'analyse du transcriptome et des expériences *in vivo* ont également été réalisées afin d'étudier l'effet de la rigidité du substrat sur l'agressivité des cellules tumorales.

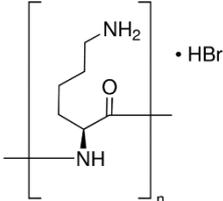
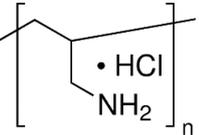
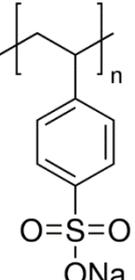
### 3.1 Films multicouches de polyélectrolytes

Afin de mimer l'environnement cellulaire et ses propriétés mécaniques, des films multicouches de polyélectrolytes sont utilisés. Ces films sont constitués, comme leur nom l'indique, de plusieurs couches de polyélectrolytes. Ces films, régulièrement utilisés dans la recherche biomédicale, présentent de nombreux avantages (**Cf. Chapitre 1.4**). Une fois construits, ils sont caractérisés par microscopie à force atomique.

#### 3.1.1 Polyélectrolytes

Un polyélectrolyte est un polymère chargé positivement ou négativement à sa surface lorsqu'il est en solution. Ces polymères peuvent être des polymères naturels comme l'acide hyaluronique et la poly-L-lysine ou des polymères synthétiques comme le poly-(sodium4-styrene sulfonate) et le poly-(allylamine hydrochloride). L'acide hyaluronique utilisé est un polymère commercial provenant de deux sources différentes. Il est soit isolé à partir de matrice extracellulaire synthétisée par des bactéries (*Streptococcus zooepidemicus*), soit extrait à partir de la crête de coqs (Liu, Liu et al. 2011). Six polyélectrolytes différents ont été utilisés pour former les biomatériaux usités lors de ces travaux de thèse. Les caractéristiques physico-chimiques de ces polyélectrolytes ainsi que leurs origines sont récapitulées dans le tableau suivant (**Tableau 3-1**).

Poly-électrolytes naturels			
Acide hyaluronique	HA (-)		Biolberica Mw = 357 kDa  Sigma Aldrich Réf. H5388 Mw = 400 kDa

Poly-L-lysine hydrobromide	PLL (+)		Sigma Aldrich Réf. P2636 Mw = 30-70 kDa  Alamanda Polymers Mw = 52 kDa
Poly-électrolytes synthétiques			
Poly-(allylamine hydrochloride)	PAH (-)		Sigma Aldrich Réf. 283215 Mw = 17,5 kDa
Poly-(sodium4-styrene sulfonate)	PSS (+)		Sigma Aldrich Réf. 243051 Mw = 30-70 kDa
Poly-électrolytes fluorescents			
Poly-L-lysine couplé à un isothiocyanate de fluorescéine	PLL <sup>FITC</sup> (+)		Sigma Aldrich Réf. P3069 Mw = 30-70 kDa
Poly-(sodium4-styrene sulfonate) couplé à de la rhodamine.	PSS <sup>RHO</sup> (+)		Mw = 30-70 kDa

**Tableau 3-1| Structures moléculaires, charges et notations des différents polyélectrolytes utilisés.** Les deux premiers polyélectrolytes (PLL et HA) sont des biomolécules chargées. Le PSS et PAH sont des polyélectrolytes synthétiques. Deux de ces polyélectrolytes ont été couplés à des molécules fluorescentes, le FITC qui émet dans le vert, et la rhodamine qui émet dans le rouge. Mw = masse molaire.

Les polymères d'acide hyaluronique et de poly-L-lysine ont été utilisés pour former la base du film très hydratée et très molle. Les polymères de PSS et de PAH ont été utilisés pour former une strate supérieure du film augmentant la rigidité de ce dernier. L'utilisation de polymères couplés à des molécules fluorescentes permet de mettre en évidence l'ensemble de l'architecture en strates de ces films construits.

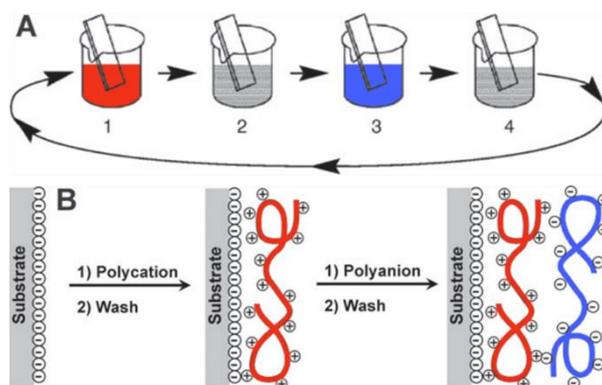
#### Préparation des solutions de polyélectrolytes

Les solutions de polyélectrolytes sont préparées à la concentration de 1 mg/mL dans une solution tampon Tris/NaCl puis réparties dans des pots à échantillon en polystyrène. Cette solution tampon à 20 mM de tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane abrégé en Tris (Sigma Aldrich réf. 252859 et Euromedex) et 150 mM de chlorure de sodium NaCl (VWR Chemicals) est préparée dans de l'eau ultra pure dite milli-Q. Cette eau ultra pure a une résistivité  $\rho = 22,5 \mu\text{S}$ . Le pH de la solution tampon est ensuite ajusté à 7,4 à l'aide d'acide chlorhydrique (HCl) fumant à 37% (Roth, réf. 92773). Les polyélectrolytes sont utilisés à une concentration finale de 1 mg/mL. Les solutions de polyélectrolytes sont laissées à dissoudre une nuit à 4°C puis filtrées à l'aide de seringues et de filtres 0,2  $\mu\text{m}$  avant de pouvoir être utilisées.

### 3.1.2 Construction des films multicouches de polyélectrolytes

Plusieurs méthodes de construction de films multicouches utilisant les polyélectrolytes existent. La méthode de construction utilisée au laboratoire repose sur une technique d'assemblage développée dans les années 1990 par Gero Decher (Decher 1997). Cette méthode de construction couche par couche (en anglais LbL pour « *Layer by Layer* ») repose sur les interactions électrostatiques entre des polymères chargés positivement (cationiques) et négativement (anioniques). Ces différents polymères sont absorbés successivement sur un support donné par immersion dans les différentes solutions de polymères (*dip-coating* en anglais).

Cette technique de construction est relativement simple et repose sur le fait que les surfaces d'un grand nombre de matériaux à l'image du titane, des silicones ou encore du verre soient chargées négativement en solution. Cette propriété est liée à l'oxydation de surface et l'hydrolyse. Le support, chargé négativement en solution est trempé dans une solution de polycations. Par interactions électrostatiques, le polymère chargé positivement se fixe au support chargé négativement. Le support est ensuite immergé dans la solution de tampon Tris/NaCl afin d'éliminer le polymère positif en excès. Le support est ensuite trempé dans une solution de polyanions où le polymère chargé négativement compense l'excès de charge positif en s'y fixant (**Figure 3-1**). Le support est une nouvelle fois rincé dans la solution tampon. Le cycle est répété 24 fois formant un film de couches de polycations et polyanions superposées. Le temps de trempage dans la solution de polyélectrolytes est de 5 minutes. Les premiers polyélectrolytes utilisés dans la construction de ce type de film étaient des polyélectrolytes synthétiques. Depuis de nombreux autres polymères chimiquement chargés sont utilisés, dont certains naturels comme l'acide hyaluronique et la poly-L-lysine utilisés dans ce travail de thèse.



**Figure 3-1 | Processus de construction couche par couche des films multicouches de polyélectrolytes par *dip-coating*.** Schéma du processus de dépôts des différents électrolytes. Le bécier 1 contient le polymère chargé positivement (polycation) alors que le bécier 3 contient un polymère chargé négativement (polyanion). Les béciers 2 et 4 contiennent une solution de rinçage (A). Pour un substrat chargé négativement (cas du verre), une couche de polycations est apposée. Les polycations se lient au substrat par liaison électrostatique (B). Adaptée de (Tang, Wang et al. 2006).

Au laboratoire, les films multicouches sont construits sur des lamelles de verres de 12 mm  $\varnothing$  (Knittel Glass) ou de 18 mm  $\varnothing$  (Marienfeld Laboratory Glassware) selon les expériences. Ces lamelles de verre sont nettoyées et traitées au préalable. Elles sont trempées dans une solution à 10 mM de Sodium Dodecyl Sulfate SDS (ProLabo, réf. 27926.23) chauffée à 70°C durant 15 minutes. Les lamelles sont ensuite rincées à l'aide d'eau ultra-pure milli-Q avant d'être mises dans une solution à 100 mM d'acide chlorhydrique chauffée à 70°C durant 15 minutes. Les lamelles sont à nouveau rincées avant d'être séchées et placées à l'étuve durant 24 heures.

Une fois nettoyées et stérilisées, les lamelles sont placées sous PSM sur des portoirs conçus au laboratoire. Ces supports sont capables de contenir 3 lamelles de 18 mm de diamètre ou 6 lamelles de 12 mm de diamètre. Ces portoirs sont montés sur un bras automatisé (Dipping Robot, Riegler et Kirstein, GmbH, Berlin, Allemagne) piloté par un logiciel DipWin32.exe. Le bras se déplace séquentiellement selon un programme donné qui prend en compte la durée de trempage dans chacun des pots ainsi que leurs positions dans l'espace.

### 3.1.3 Modulation de l'élasticité des films multicouches de polyélectrolytes

De nombreuses techniques physico-chimiques permettent de moduler l'élasticité des films multicouches de polyélectrolytes. Par exemple, la modulation de la rigidité peut se faire au cours du procédé de déposition des polyélectrolytes en modifiant le pH d'une des solutions de polymères. Ce changement va avoir pour effet de modifier les liaisons ioniques entre les polymères et donc par extension leur réticulation. La chimie des carbodiimides peut également être utilisée. Dans ce cas, l'assemblage du film est modifié par la création de liaisons covalentes. Au cours de ces travaux de thèses, deux techniques de réticulation ont été utilisées : l'ajout d'un nombre variable de couches de polyélectrolytes synthétiques PSS/PAH et une réticulation par une réaction EDC/NHS. L'élasticité des films obtenus est ensuite caractérisée par AFM.

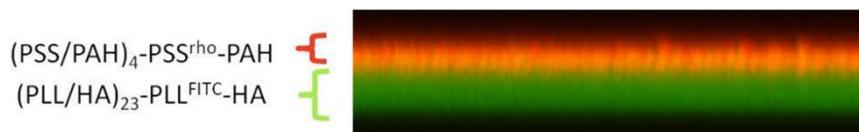
#### 3.1.3.1 Modulation par ajout de couches de poly-électrolytes synthétiques.

Dans le cas d'une modulation par ajout de couches de polymères, le film est alors constitué d'une première strate épaisse et molle  $(PLL/HA)_{24}$  recouverte d'une seconde strate fine et rigide  $(PSS/PAH)_n$ . La rigidité du film obtenu est fonction du nombre de bicouches  $n$  de polyélectrolytes déposées avec  $n=1, 2$  et  $5$ . Les films construits de cette manière sont associés à leur module de Young apparent (**Tableau 3-2**).

Architecture	Module de Young E (kPa)	Notation
$(PLL/HA)_{24}$	$\approx 0$	$E_0$
$(PLL/HA)_{24}-(PSS/PAH)_1$	$\approx 20$	$E_{20}$
$(PLL/HA)_{24}-(PSS/PAH)_2$	$\approx 50$	$E_{50}$
$(PLL/HA)_{24}-(PSS/PAH)_5$	$\approx 200$	$E_{200}$

**Tableau 3-2** | Architectures et modules de Young E relatifs des films multicouches à élasticité modulée. Les films sont annotés selon la forme E pour module de Young suivi en indice de leur module de Young relatif.

L'architecture de ces films peut être mise en évidence en utilisant des polyélectrolytes couplés à des molécules fluorescentes comme la fluorescéine et la rhodamine (**Figure 3-2**).



**Figure 3-2** | Architecture des films  $(PLL/HA)_{24}-(PSS/PAH)_n$ . La première strate du film  $(PLL/HA)_{24}$  est mise en évidence par microscopie confocale à l'aide de PLL couplée à de la FITC. La seconde strate  $(PSS/PAH)_n$  est mise en évidence à l'aide d'un PSS couplé à de la rhodamine. Adaptée de (Kocgozlu, Lavalley et al. 2009).

L'ajout de ces couches de polyélectrolytes se fait de manière manuelle. Les films  $(PLL/HA)_{24}$  sont déposés à l'aide d'une pince et d'une aiguille stériles dans des plaques de 24 ou 12 puits. Un volume d'1 mL de solution de polyanions PSS est ajouté dans chaque puits. La durée d'interaction des polyélectrolytes synthétiques est plus courte que celle des polymères naturels : 4 minutes au lieu de 5. Les films sont rincés à l'aide

de la solution tampon pour enlever l'excédent de polyanions deux fois durant 5 minutes. Une solution de polycation PAH est alors ajoutée durant 4 minutes dans les puits. Les films sont ensuite rincés à nouveau deux fois durant 5 minutes. L'opération est répétée 1, 2 ou 5 fois selon l'architecture du film et donc la rigidité souhaitée avant l'ensemencement des cellules.

### 3.1.3.2 Modulation par réaction EDC/NHS

Dans le cas d'une modulation par réaction EDC/NHS, le film est constitué d'une strate épaisse et molle  $(PLL/HA)_{24}$  modifiée après construction par la formation de liaisons peptidiques entre les groupements carboxyles de HA et les groupements amines de la PLL (**Cf. 1.4.3 pour plus d'informations**). L'EDC et le NHS sont dissous dans une solution à 0,15 M de NaCl. La concentration finale d'EDC utilisée est fixée à 20 et 60 mg/ml alors que la concentration finale de NHS est maintenue constante à 11 mg/mL. Un volume de 1 mL est déposé par film et laissé à réagir durant 12 heures à 4°C. Les films sont ensuite rincés à l'aide de la solution à 0,15 mM.

## 3.1.4 Fonctionnalisation des films multicouches de polyelectrolytes

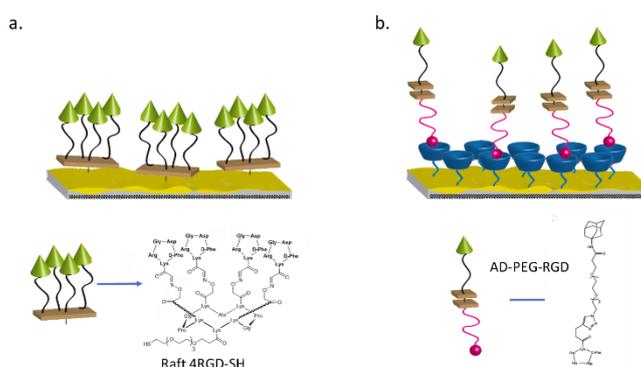
Dans le cadre de l'influence de la force d'interaction substrat-ligands sur l'adhésion cellulaire, les films obtenus et réticulés par la suite par une réaction chimique EDC/NHS ont été fonctionnalisés premièrement par un Mal-(PEG)<sub>2</sub>-NHS puis par un raft RGD ou par un système « hôte-invité » suivant les conditions.

### 3.1.4.1 Fonctionnalisation avec le Mal-(PEG)<sub>2</sub>-NHS

Le 3-(2-(2-(3 Maleimidopropanamido) ethoxy) ethoxy) propanoic acid succinimidyl ester (Mal-(PEG)<sub>2</sub>-NHS) est dissous dans une solution contenant 150 mM de NaCl à une concentration finale de 0,1 mg/mL. Seule la moitié des films sont fonctionnalisés à l'aide de cette solution. Un volume de 1 mL de la solution de Mal-(PEG)<sub>2</sub>-NHS est déposé par film. La réaction se fait pendant 3 heures à 4°C. Les films sont ensuite rincés à l'aide de la solution à 150 mM. Cette étape de fonctionnalisation permet d'avoir des groupes SH en surface du film permettant les liaisons covalentes avec les rafts RGD ou les polycyclodextrines.

### 3.1.4.2 Fonctionnalisation avec le RGD

Deux types de fonctionnalisation à l'aide de molécules RGD ont été utilisées (**Figure 3-3**) : une fonctionnalisation basée sur des liaisons covalentes avec le raft RGD ou une fonctionnalisation basée sur un système « hôte-invité » composé de polycyclodextrine (polyCD) fixées au film de manière covalente et des adamantanes-RGD (AD-RGD) qui réagissent de manière non covalente avec les polyCD.



**Figure 3-3 | Fonctionnalisations des films multicouches de polyelectrolytes.** Une première fonctionnalisation basée sur des liaisons covalentes avec le raft RGD a été effectuée (a.). Une seconde fonctionnalisation basée sur un système hôte-invité a été réalisée (b.). Les polycyclodextrines agissant comme hôte (représentées en bleu) sont fixées par des ponts disulfures au film. L'adamantane (représenté en rose) de l'invité « adamantane-PEG-RGD » va ensuite réagir par des liaisons spécifiques avec les cyclodextrines.

#### 3.1.4.2.1 RGD covalent

Deux rafts RGD synthétisés par l'équipe de Liliane Guérente au sein du département de chimie moléculaire de l'Université de Grenoble ont été utilisés : raft 4RGD-SH (Masse molaire : 4143,52 g/mol) et le raft 1RGD-SH (Masse molaire : 1044,22 g/mol). Ces RGD ont été dissous à une concentration finale de 0,1mg/mL dans une solution de NaCl 150 mM. Les films sont déposés sur des supports conçus en laboratoire permettant l'utilisation d'un volume 10 fois moindre par rapport au volume utilisé dans les puits : 100 µL/film à la place d'1 mL/films. La réaction de fonctionnalisation par la création de ponts disulfures entre les rafts et la surface fonctionnalisée à l'aide du Mal-(PEG)<sub>2</sub>-NHS se fait durant 12 heures à 4°C.

#### 3.1.4.2.2 RGD non covalent

La fonctionnalisation par un système hôte-invité nécessite d'abord une formation de ponts disulfures entre la surface fonctionnalisée à l'aide du Mal-(PEG)<sub>2</sub>-NHS et l'hôte, la polyCD-SH. La polyCD-SH est synthétisée à l'Institut Charles Sadron par Loic Jierry. Le système invité, composé de molécules AD-PEG-RGD (Masse molaire : 1109,3 g/mol), est synthétisé à Grenoble comme les rafts RGD. Les polyCD ont été diluées dans une solution NaCl 150 mM à une concentration finale de 0,1mg. Un volume de 100 µL de la solution est déposé par film et laissé à réagir durant une heure à température ambiante. L'AD-PEG-RGD qui doit se lier de manière non covalente aux polyCD est dissous à une concentration finale de 0,1 mg/mL dans la même solution.

## 3.2 Biologie cellulaire

### 3.2.1 Modèles cellulaires utilisés

Deux modèles cellulaires ont été utilisés au cours de cette thèse portant sur l'étude de l'influence de la rigidité du substrat sur la plasticité de la chromatine : des cellules épithéliales rénales de potoroo PtK2 et des cellules de carcinome colorectal humain SW480.

#### 3.2.1.1 Cellules PtK2

La lignée cellulaire PtK2 signifie *Potorous tridactylus* Kidney 2. Ces cellules sont issues de cellules épithéliales rénales d'un rat-kangourou à long-nez (*Potorous tridactylus*) male. Le rat-kangourou à long nez ou potoroo à long-nez est un petit marsupial nocturne de la famille des rats-kangourous. Il vit en Australie et est décrit pour la première fois par Rober Kerr en 1792. Cette lignée cellulaire est établie par Kristen Walen et Spencer Brown en 1962. (Walen and Brown 1962) Ces cellules sont très utilisées comme modèle pour l'étude de la mitose. En effet, les chromosomes des cellules PtK2, bien qu'ayant le même nombre de gènes, sont moins nombreux et plus gros que les chromosomes humains, et donc plus faciles à observer.

Les cellules PtK2 cultivées au laboratoire proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC) et prolifèrent dans un milieu minimum essentiel de Eagle (EMEM pour Eagle's Minimum Essential Medium) Ce milieu de culture cellulaire a été développé par Harry Eagle et est composé de sels inorganiques, d'acides aminés, de vitamines, de glucose ainsi que d'un indicateur coloré de pH, le rouge phénol. Ce milieu EMEM est complété en laboratoire par l'ajout de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (FBS<sub>d</sub> pour decompemented Fetal Bovin Serum) et 5% d'un cocktail d'antibiotiques : pénicilline et streptomycine. Le sérum de veau fœtal est décomplémenté par une réaction d'inactivation thermique ayant lieu à 56°C durant 30 min. Cette inactivation thermique a pour conséquences de réduire le complément protéique contenu dans le sérum et également de détruire les éventuels mycoplasmes.

### 3.2.1.2 Cellules SW480<sup>-/-</sup>

Les cellules SW480<sup>-/-</sup> utilisées dans le cadre de ce projet sont des cellules SW480 mutées au niveau du gène *adenomatous polyposis coli* (APC) (Faux, Ross et al. 2003).

A l'origine, les cellules SW480 viennent d'un adénocarcinome primaire colorectal d'un homme caucasien d'une cinquantaine d'années. Ces cellules cancéreuses expriment les oncogènes suivants *myc*, *myb*, *ras*, *fos*, *sis*, *p53*. Elles n'expriment pas les oncogènes *abl*, *ras* et *scr*. Ces cellules sont très tumorigènes. En effet, 100% des souris auxquelles des cellules SW480 ont été inoculées avec  $10^7$  cellules ont développé des tumeurs en moins de 21 jours.

La lignée cellulaire SW480 a été déposée par A. Leibowitz dans les années 1970. Les premiers articles sont publiés en 1977. Ces cellules prolifèrent dans un milieu de culture Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640. La particularité de ce milieu de culture est de contenir une importante quantité de phosphates en plus des sels inorganiques retrouvés communément dans les milieux de culture (comme le calcium, le chlorure de sodium, etc.), les acides aminés, les vitamines, le glucose et l'indicateur coloré de pH. Le pH de ce milieu de culture est également légèrement plus élevé que celui des autres milieux de culture (pH = 8 au lieu de 7). Le milieu RPMI 1640 + Glutamax<sup>®</sup> (Gibco, Life Technologie, réf. 61870) utilisé au laboratoire est complété avec 10% de FBSd, 5% de pénicilline/streptomycine, 2% d'hydrocortisone (Sigma Aldrich, Réf. H69009-10), 2,5% de géniticine G418 (HyClone<sup>™</sup>, GE Healthcare, USA) ainsi que 10% d'insuline à une concentration de 0,025U/mL.

## 3.2.2 Culture cellulaire

### 3.2.2.1 Entretien des cellules

Les cellules PtK2 et les cellules SW480<sup>-/-</sup> sont cultivées dans des flasques T75 cm<sup>2</sup> (Sarstedt, réf. 83.3911.082, Nümbrecht, Allemagne) et maintenues dans un incubateur (HERACell 150i, Thermo Scientific) à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>.

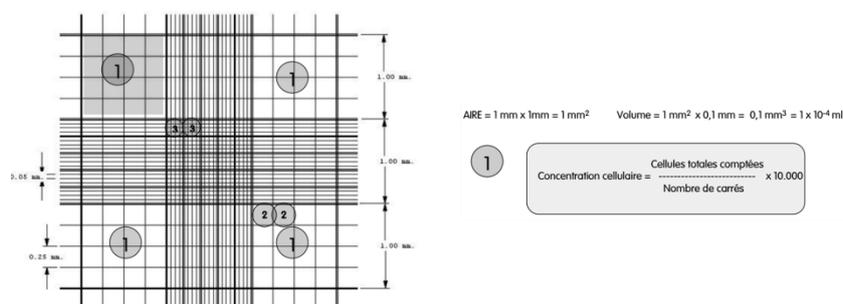
Les cellules sont rincées à l'aide d'une solution tampon de phosphate salin 1X stérile (PBS 1X pour Phosphate Buffered Saline ; Dutscher L0615-500). Deux millilitres de trypsine-EDTA (Dutscher L0940-100) sont ajoutés dans la flasque. La flasque est ensuite mise à incuber à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. La trypsine est très utilisée en biologie cellulaire pour décrocher les cellules adhérentes. Cette enzyme est synthétisée par le pancréas et a pour rôle de digérer les protéines. Elle clive les liaisons protéiques existantes au niveau des lysines et arginines responsables de l'adhérence cellulaire. La trypsine ayant un impact néfaste à long terme sur les cellules, elle est inhibée par l'ajout en grand nombre de protéines contenues dans le sérum de veau fœtal FBS du milieu complet (10% du volume total ce qui représente un volume très important de protéines. L'inhibition de l'enzyme se fait alors par excès de substrat). En effet, une fois les cellules détachées du fond de la flasque, 13 mL de milieu complet sont ajoutés dans la flasque. Les cellules sont alors dissociées et homogénéisées dans la flasque. Une petite fraction, généralement comprise entre 500 µL et 1 mL, est alors ajoutée dans une nouvelle flasque T75 cm<sup>2</sup> contenant 13 mL de milieu complet frais.

### 3.2.2.2 Comptage et ensemencement des cellules

Lors des expériences effectuées, les cellules sontensemencées à une concentration de  $1.10^5$  cellules/mL ou  $1,5.10^5$  cellules/mL selon la taille des lamellesensemencées (respectivement, 12mm ou 18mm Ø). Afin d'obtenir ces concentrations souhaitées, un comptage préalable des cellules est nécessaire. De nombreuses cellules de comptage existent telles que les cellules de Malassez, ou de Kova, cependant c'est la cellule de

Neubauer qui est utilisée en routine au laboratoire. Cette cellule de comptage permet de compter le nombre de cellules en suspension dans une solution (**Figure 3-4**).

La cellule de Neubauer est une lamelle de verre d'environ 30x70 mm. Elle est composée en 3 parties. La partie centrale dispose de deux réticules (zones gravées permettant le comptage). A l'aide d'eau déposée sur les deux rebords extérieurs, la lamelle couvre-objet est maintenue en place au-dessus du réticule. A l'aide d'une micropipette, un volume de 20 µL de solution est déposé sur la cellule de comptage. A l'aide d'un microscope, les cellules présentes dans les carrés [1] sont comptées. La concentration cellulaire est obtenue par la division du nombre total de cellules comptées par le nombre de carrés comptés, le tout multiplié par 10 000. Un minimum de  $2,5 \cdot 10^5$  cellules/mL est nécessaire pour donner une estimation suffisamment stable de la concentration cellulaire. Cette estimation est impossible lorsqu'il y a plus de  $2,5 \cdot 10^6$  cellules/mL : la probabilité d'erreurs et le temps nécessaire augmentant de manière trop importante.



**Figure 3-4| Comptage des cellules avec la lame de Neubauer.** A l'aide d'un microscope, les cellules présentes dans les carrés [1] sont comptées. La concentration cellulaire est obtenue par la division du nombre total de cellules comptées par le nombre de carrés comptés, le tout multiplié par 10 000.

### 3.2.2.3 Congélation des cellules

La congélation des cellules permet la constitution d'une banque cellulaire. Afin de constituer un stock de cellules suffisant pour toute l'étude, une réserve cellulaire est réalisée de la manière suivante.

Pour un résultat optimal, les cellules doivent être congelées lors de leur phase exponentielle de croissance et non pas à confluence. Les cellules sont d'abord rincées à l'aide de PBS 1x (Dutscher, réf. L0615-500). Un volume d'un à deux millilitres de trypsine –EDTA (Dutscher, réf. L0940-100) est ajouté dans la flasque. La flasque est ensuite mise à incuber durant 5 min à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> dans l'incubateur. Douze millilitres de milieu complet (c'est-à-dire contenant du sérum de veau fœtal FBS) sont ajoutés une fois les cellules décrochées afin d'inhiber l'activité clivante de la trypsine. Les cellules sont bien remises en suspension, via un mouvement « de va et vient » réalisé en présence de trypsine. La solution obtenue (milieu complet + cellules) est ensuite transférée dans un tube Falcon® de 15 mL avant d'être centrifugée à 1200 rpm durant 5 min. Le surnageant est alors retiré et le culot remis en suspension dans 1 mL de milieu de congélation (PAN Biotech, réf. P0790050).

L'utilisation d'un milieu de congélation permet d'éviter les effets nuisibles d'une congélation tels que la formation de gel pouvant faire exploser les membranes cellulaires. Ce milieu contient une forte concentration d'un cryoconservateur, le diméthylsulfoxyde (DMSO) et du sérum de veau fœtal contenus dans du milieu de culture. Les cellules en suspension sont transférées dans un cryotube (Dutscher, réf. 390708). Ce cryotube est fermé avec précautions et annoté (Type cellulaire, passage, date...) avant d'être placé dans un conteneur CoolCell® (Biocision, USA) déposé dans un congélateur à -80°C. Ce container permet une congé-

lation progressive avec une diminution de 1°C par min et augmente le taux de viabilité et de reprise des cellules congelées. Après une nuit à -80°C, le cryotube est placé dans de l'azote liquide à -195,7°C.

#### 3.2.2.4 Décongélation des cellules

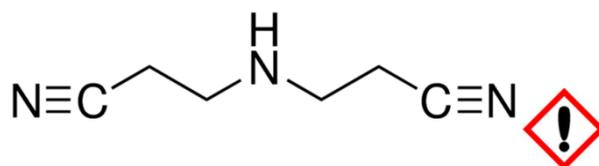
Le nombre de passages d'un type de cellulaire influence énormément son comportement. Afin de travailler dans des conditions optimales, de nouvelles ampoules doivent régulièrement être décongelées. Les cellules sont conservées dans un milieu de congélation contenant du DMSO. Une flasque de 75 cm<sup>2</sup> contenant 14 mL de milieu complet est préparée. L'ampoule, sortie de l'azote liquide, est chauffée rapidement à 37°C. Une fois le contenu de l'ampoule réchauffé, les cellules sont transférées dans la flasque. Le milieu de la flasque est changé le lendemain.

### 3.2.3 Inhibition

Afin de mettre en évidence l'importance d'une protéine, d'une enzyme ou encore d'un constituant cellulaire comme le cytosquelette dans un processus donné, plusieurs techniques existent. Parmi elles, se trouvent la surexpression, l'inhibition, le RNA silencing du ou des gènes d'intérêt ou encore l'utilisation de mutants knock-outs (c'est-à-dire la création d'organismes génétiquement modifiés pour lesquels le gène d'intérêt est totalement inactivé). La mise en évidence de l'implication de l'élément étudié se fait ensuite par l'observation du phénotype résultant de la modification apportée par l'application d'une des techniques précédemment citées

#### 3.2.3.1 Inhibition des filaments intermédiaires par l'IDPN

La majorité des propriétés physiques et mécaniques d'une cellule sont conférées par son cytosquelette. Ce cytosquelette est composé de polymères protéiques en constante réorganisation. Ces polymères de protéines sont de trois types : les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires. Ces derniers sont les éléments les plus stables et les plus résistants du cytosquelette. La résistance importante des filaments intermédiaires est conférée par leur structure. Ces filaments sont en effet principalement constitués de protéines fibrillaires comme la vimentine. Un inhibiteur chimique, le 3,3'-iminodipropionitrile (IDPN, **Figure 3-5**) a été utilisé afin de démontrer leur rôle clé dans un certain nombre de processus cellulaires. L'IDPN (Sigma Aldrich, réf. 317306) agit comme inhibiteur en dépolymérisant les protéines de vimentine conduisant à une désorganisation de la structure du cytosquelette de filaments intermédiaires.



**Figure 3-5** | Structure chimique du 3,3'-iminodipropionitrile (IDPN). La manipulation de cette molécule doit se faire avec précaution.

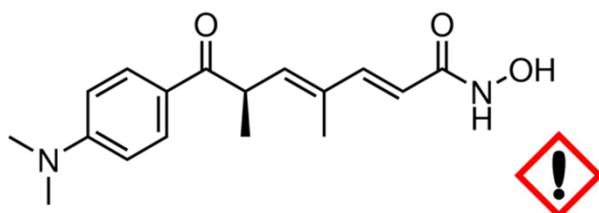
L'IDPN a été utilisé à une concentration de 2%. Plusieurs expériences préliminaires ont en effet démontré qu'une concentration à 1% était insuffisante pour obtenir la dépolymérisation des filaments intermédiaires et une concentration à 5% était trop cytotoxique.

#### 3.2.3.2 Inhibition des histones désacétylases HDAC par la TSA

En interphase, la chromatine, support de l'information génétique, s'organise structurellement sous deux formes : l'euchromatine et l'hétérochromatine. Sous sa forme compactée hétérochromatine, l'information génétique est inaccessible aux ARN polymérase II et donc reste non exprimée dans la cellule. Le passage

de la forme euchromatine à sa forme hétérochromatine est régulé par des enzymes les histones désacétylases (HDAC). Certaines de ces enzymes peuvent être inhibées par l'utilisation de trichostatine A (**Figure 3-6**), un antibiotique antifongique produit naturellement par une bactérie filamenteuse Gram-positive, *Streptomyces sp.*

La trichostatine A (Sigma Aldrich, réf. T8552) a pour effet d'inhiber de manière spécifique les HDAC de classe I et II des mammifères (Vanhaecke, Papeleu et al. 2004). Dans ce travail de thèse, elle est utilisée à une concentration de 50mM. La solution mère est préparée dans de l'éthanol 100%. La solution se conserve à -20°C durant 6 mois avant de perdre significativement son activité inhibitrice.



**Figure 3-6** | Structure chimique de la trichostatine A (TSA) produite par *Streptomyces sp.* La manipulation de cette molécule doit se faire avec précaution.

Pour un résultat optimal, les cellules sont pré-conditionnées avec la TSA selon le protocole suivant. Les cellules sontensemencées dans une flasque T25 cm<sup>2</sup> (Corning, réf. 430639). Vingt-quatre heures avant l'expérience, le milieu de la flasque est remplacé par un milieu contenant 50 mM de TSA. Lors de l'expérience, les cellules sont trypsinisées, comptées avant d'être ensemencées à une concentration de 1.10<sup>5</sup> ou à 1,5.10<sup>5</sup> cellules/mL suivant la taille des lamelles (respectivement 12 ou 18 mm Ø) en présence de TSA 50 mM. Les cellules sont ensuite incubées durant 24h à 37°C et sous atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub> avant d'être soit analysées par un test de viabilité, soit observées par vidéo-microscopie (test de migration) ou soit fixées (**Cf. protocole de fixation immunocytochimie 3.4.2.2.2 ou de fixation pour la microscopie électronique à transmission 3.5.2.2**).

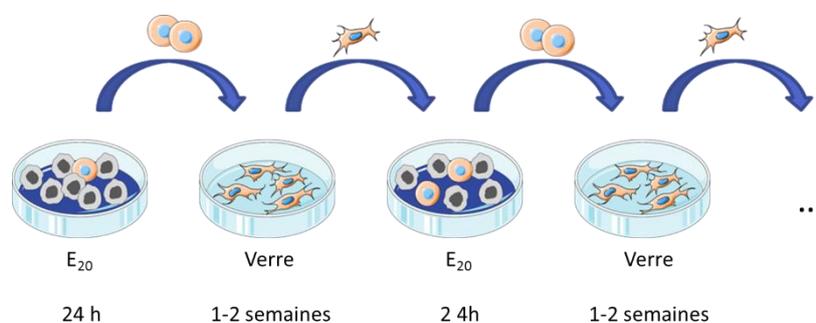
### 3.3 Processus de sélection des cellules résistantes.

L'un des projets de recherches présentés dans cette thèse (**Chapitre 5**) concerne la sélection de cellules du cancer du côlon par modulation des propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire et de l'identification de leurs oncogènes. Afin de sélectionner des cellules particulièrement résistantes aux propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire, un processus de sélection a été mis en place.

#### 3.3.1 Protocole de sélection

Lors d'un cancer colorectal, une tumeur primaire se forme et évolue en modifiant les propriétés physico-chimiques de son environnement tissulaire. Cela se traduit par la formation d'une masse (*onco*-en grec) dur. Les cellules prolifèrent au sein de la tumeur. Cependant certaines cellules vont quitter cette tumeur primaire, passer dans des tissus de différentes rigidités avant de rejoindre la circulation sanguine ou lymphatique où la rigidité est très faible. Une grande partie de ces cellules meurent en raison des modifications importantes des propriétés biochimiques et physiques des différents environnements qu'elles rencontrent au cours de cette étape de dissémination. Cependant certaines parviennent à survivre et former des métastases, le plus souvent dans le foie. Un système de culture *in vitro* constitué de substrats de faibles élasticités a été développé afin de sélectionner les cellules cancéreuses fortement agressives.

Les cellules sont cultivées pendant 24 heures sur un substrat de faible élasticité ( $20\text{kPa} = E_{20}$ , mesuré par nano-indentation AFM). Les cellules survivantes sont ensuite transférées sur une lamelle de verre où elles prolifèrent et atteignent un état de confluence après une à deux semaines de culture (**Figure 3-7**). Ce cycle de culture alterné entre substrats mous ( $E_{20}$ ) et substrats rigides (lamelle de verre) est réalisé trois à quatre fois selon les expériences.



**Figure 3-7 | Protocole de sélection de cellules résistantes aux substrats mous.** Afin de mimer les variations mécaniques rencontrées par les cellules lors du processus de dissémination métastatique, les cellules sont alternativement cultivées sur des substrats très mous ( $E_{20}$ ) et des substrats très rigides comme le verre.

### 3.3.2 Transfert des cellules

Lors du transfert des cellules survivantes sur  $E_{20}$  vers les lamelles de verre, les lamelles couvertes du film  $E_{20}$  sont déplacées à l'aide d'une pince et d'une aiguille stérilisées à l'éthanol 70% dans une nouvelle plaque de 24 ou 12 puits selon la taille des lamelles (respectivement 12 mm et 18 mm  $\varnothing$ ) afin de ne pas récupérer des cellules ayant été cultivées sur la surface plastique non recouverte par la lamelle (au fond du puits). Un volume de 150  $\mu\text{L}$  de trypsine-EDTA est alors ajouté dans chaque puits. La plaque est ensuite mise à incuber durant 15 min à  $37^\circ\text{C}$  dans une atmosphère humide à 5% de  $\text{CO}_2$ . La plaque est mise plus longtemps à incuber car les cellules sont plus difficiles à décrocher de leurs substrats, sans doute en raison du film qui rend l'accès aux protéines d'adhérence plus difficile pour la trypsine. Un volume de 850  $\mu\text{L}$  est ensuite ajouté à chaque puits afin de neutraliser l'effet de la trypsine. Les cellules isolées sont remises en suspension par un mouvement de « va et vient » induit par la pipette au fond du puits. Le milieu de culture contenant les cellules provenant des différents puits est collecté dans un même Falcon® 15 mL puis homogénéiser avant d'être redistribuer dans une nouvelle plaque contenant des lamelles de verre stériles de verre au fond des puits. Un volume d'1mL avec cellules est redistribué dans chacun des puits. Aucune dilution n'est réalisée lors du passage  $E_{20}$  vers Verre.

Dans le cas d'un transfert de verre vers  $E_{20}$ , les grandes lignes du protocole présenté précédemment restent les mêmes. Seul le temps d'incubation en présence de trypsine est réduit (7 minutes au lieu de 15) et une dilution est effectuée à 1:2 ou 1:3 selon la confluence des cellules sur verre.

## 3.4 Comportement cellulaire

La sélection de cellules résistantes par des substrats de faibles élasticités (**Chapitre 5**) ou la présentation de ligand RGD de manière covalente ou non sur des substrats d'élasticités variables (**Chapitre 6**) peuvent influencer de nombreuses activités cellulaires comme par exemple l'adhésion, la division, la viabilité, la motilité, l'agressivité des cellules cancéreuses qui se manifestent également par des modifications importantes de la structure interne des cellules ; du cytoplasme (cytosquelette) jusqu'au noyau (enveloppe nucléaire,

chromatine...). Pour étudier ces activités cellulaires, différents techniques d'observation et de quantification, décrites ci-dessous, ont été utilisées.

### 3.4.1 Viabilité cellulaire

En réponse aux propriétés chimiques et physiques des substrats d'élasticités variables, le premier comportement déterminant dont découle l'ensemble des autres phénomènes cellulaires est la viabilité des cellules. De nombreux protocoles permettent d'évaluer ce paramètre de viabilité cellulaire comme le test MTT ou le test HRP. Il existe également des kits de test de viabilité comme celui proposé par la compagnie Promokine (Life/Dead). Ce test permet une détection rapide (sans fixation préalable ou action détergente des cellules saines, nécrotiques et apoptotiques).

#### 3.4.1.1 Test Life/Dead

Le test Life/Dead est l'autre nom donné au kit de détection des cellules saines, nécrotiques et apoptotiques (Apoptotic/Necrotic/Healthy Cells Detection Kit, Promokine, PK-CA707-30018). Ce test est utilisé en routine au laboratoire afin d'évaluer la viabilité des cellules au contact de nouveaux biomatériaux ou en réponse à de nouveaux agents thérapeutiques. Dans le cadre des travaux réalisés dans le cadre de cette thèse, il a été utilisé pour mettre en évidence le phénomène de survie de ces cellules cancéreuses cultivées sur substrats mous et la viabilité des cellules sur des substrats d'élasticité variable fonctionnalisés par des ligands RGD.

##### 3.4.1.1.1 Principe du test

L'Hoechst 33342 est une petite molécule capable de traverser les membranes cellulaires et nucléaires afin d'interagir de manière non covalente avec les petits sillons de l'ADN (Latt, Stetten et al. 1975). Il émet de la fluorescence dans le bleu ( $\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}} = 350/461$  nm) et permet de marquer les noyaux de l'ensemble de la population cellulaire. Les cellules apoptotiques sont marquées à l'aide d'une molécule, l'annexine V qui est couplée à une fluorescéine, la FITC ( $\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}} = 492/514$  nm). L'annexine V est une protéine phospholipidique de 35kDa dont l'activité dépend des ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Elle a une haute affinité pour la phosphatidylsérine exposée à la surface des cellules apoptotiques. L'apoptose est une mort cellulaire programmée dite « propre », aussi qualifiée de « suicide cellulaire », où cours de laquelle la cellule se fragmente selon un certain nombre d'étapes. Ces étapes de fragmentation vont de pair avec une modification de la membrane cytoplasmique. A travers ces modifications, la phosphatidylsérine qui se trouve normalement du côté interne de la membrane plasmique est transférée du côté externe où elle sert de signal de reconnaissance pour les phagocytes. Contrairement à l'apoptose qui est une « mort propre », la nécrose est le résultat de nombreux dommages cellulaires comme par exemple lors d'une présence de toxines ou lors d'une infection. Les membranes plasmiques des cellules se rompent. Il en résulte une libération dans le milieu extérieur de la majorité du matériel cellulaire (cytoplasme, nucléoplasme, organites...). Ce kit permet également un marquage des cellules par un homodimère III d'éthidium (EtD-III) qui reconnaît les acides nucléiques. L'EtD-III ne marque que les cellules nécrotiques lysées car il est incapable de pénétrer dans les cellules vivantes ou apoptotiques.

##### 3.4.1.1.2 Protocole

Le marquage se réalise très rapidement selon le protocole suivant. Une solution tampon Binding Buffer 1X est préparée en diluant au 1:5 la solution « Binding Buffer » 5X dans de l'eau ultra-pure 18,2  $\mu\text{S}$ . Les cellules sont rincées une première fois à l'aide de la solution tampon « Binding Buffer » 1X. Dans un microtube, la solution de marquage est préparée en ajoutant 5  $\mu\text{L}$  d'Annexine V couplée à du FITC, 5  $\mu\text{L}$  d'EtD-III et 5  $\mu\text{L}$  d'Hoechst 33342 complété à 100  $\mu\text{L}$  par du Binding Buffer 1X (Quantité indiquée pour une lamelle). A l'aide

de pinces et d'aiguilles stérilisées à l'éthanol 70%, les lamelles sont déposées sur des supports conçus au laboratoire (réalisés à partir de capuchon de microtubes collés au fond de petites boîtes en plexiglas). Cette technique permet d'économiser les solutions de marquages. Un volume de 90  $\mu\text{L}$  de la solution de marquage est déposé par lamelles. Les supports sont alors recouverts par un couvercle pour éviter un assèchement des lamelles et laisser à incuber durant 15 min à température ambiante et à l'obscurité. Les lamelles de 12 mm  $\varnothing$  sont ensuite remises dans la plaque 24 puits contenant 1 mL de « Binding Buffer » 1X par puits. Les lamelles sont ensuite rincées une fois avec ce « Binding Buffer » 1X puis recouverte de Binding Buffer avant d'être observées à l'aide d'objectifs  $\times 10$  et  $\times 20$  en microscopie optique inversée à épi-fluorescence.

### 3.4.1.2 Microscopie optique inversée à épi-fluorescence

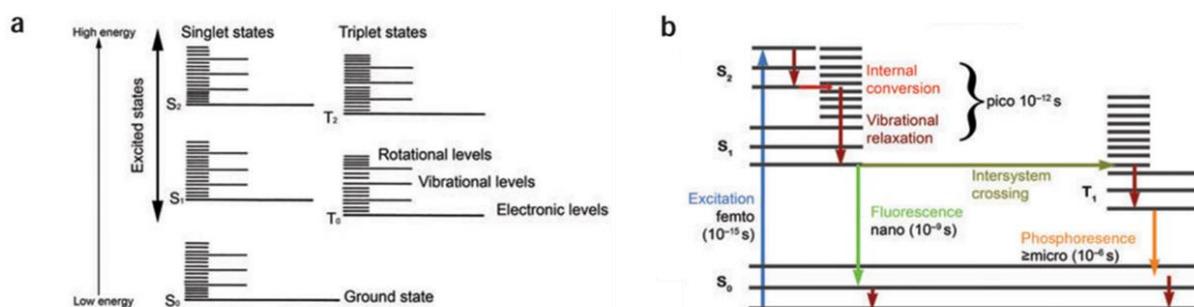
#### 3.4.1.2.1 Principe de fluorescence

Certaines molécules, appelée fluorochromes ont la capacité d'absorber un photon. Ce phénomène peut être relativement facile à comprendre en utilisant un diagramme de Jablonski. Ce diagramme, conçu dans les années 1930 par un physicien polonais Alexandre Jablonski, représente les états électroniques des molécules et les transitions qui s'opèrent entre ces états (**Figure 3-8**). L'absorption d'un photon mène à la transition de la molécule d'un état fondamental  $S_0$  à un état singulet excité  $S_0^*$  en l'espace de quelques femto-secondes. La molécule retourne ensuite à son état initial par émission de photons. Cette émission de photons peut être rapide dans le cas d'une émission par fluorescence (quelques nanosecondes) ou plus long lorsqu'il se fait par phosphorescence (mécanisme nécessitant un passage par un état triplet  $T_1$ ).

Lorsqu'un fluorochrome absorbe un photon, l'ensemble de l'énergie de ce dernier est transféré au fluorochrome. Cette énergie  $E$  (exprimée en Joules) est inversement proportionnelle à la longueur d'onde du photon selon la relation ci-dessous où  $h$  est la constante de Plank,  $c$ , la célérité de la lumière dans le vide et  $\lambda$ , la longueur d'onde du photon.

$$E = \frac{h * c}{\lambda}$$

Si cette énergie absorbée est plus importante que l'énergie nécessaire au passage à l'état singulet  $S_1$ , le fluorochrome passera à l'état singulet  $S_2$  ou subira des changements vibrationnels. Dans le cas où il passe à l'état singulet  $S_2$ , le retour à l'état  $S_1$  se fait en quelques picosecondes par conversion interne et relaxation vibrationnelle. Ce phénomène de conversion interne et de relaxation vibrationnelle se manifeste par une énergie émise plus faible que l'énergie absorbé. Cette différence porte le nom de déplacement de Stokes et est liée à la loi de Kasha. Cette règle empirique stipule qu'après l'absorption d'un photon, l'émission de fluorescence se fait à partir de l'état excité de plus basse énergie.



**Figure 3-8 | Phénomène de fluorescence.** Diagramme de Jablonski qui illustre les états électroniques des molécules ( $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $T_1$  et  $T_2$ ) et les transitions opérantes entre ces différents états (a.). Chronologies des différents éléments impliqués dans les processus de fluorescence et de phosphorescence (b.). Figure adaptée de (Lichtman and Conchello 2005)

La fluorescence est un phénomène relativement présent dans la nature. Elle diffère de la phosphorescence par le temps d'émission d'un photon comme vu précédemment et de la bioluminescence (dans ce cas le photon émis résulte d'une réaction chimique) dont les lucioles sont les ambassadrices les plus connues. De nombreuses molécules vivantes comme la chlorophylle ou minérales comme la fluorite sont capables de fluorescence.

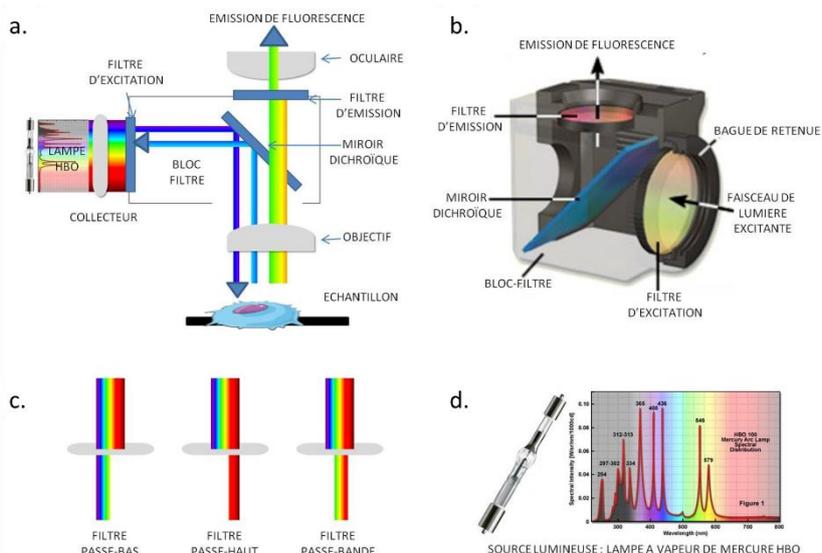
#### 3.4.1.2.2 Principe du microscope optique à épi-fluorescence

La microscopie optique à épi-fluorescence repose sur le déplacement de Stokes. Cette propriété des fluorochromes qui correspond à la différence en termes de longueur d'onde entre le pic du spectre d'absorption et celui du spectre d'émission. Cette différence est particulièrement intéressante car en filtrant la lumière d'excitation sans bloquer la lumière émise, il est possible d'observer uniquement les objets émettant de la fluorescence. Cette filtration se fait par l'ajout de filtres au sein du trajet optique.

Le principe de fonctionnement d'un microscope à épi-fluorescence est similaire à celui d'un microscope optique classique. La différence se trouve dans le fait qu'un certain nombre d'éléments tels que des blocs filtres ont été ajoutés au niveau du trajet optique afin de détecter des échantillons auto-fluorescents ou marqués à l'aide de fluorochrome (**Figure 3-9 a.**). Plusieurs blocs filtres peuvent être montés sur un microscope afin de pouvoir observer des fluorochromes ayant des spectres d'émissions différents lors de marquages.

Un bloc filtre est composé d'un filtre d'excitation, d'un filtre d'émission et d'un miroir dichroïque (**Figure 3-9 b.**). Les filtres d'excitation et d'émission permettent de ne laisser passer qu'une certaine fraction de longueur d'onde. Ces filtres peuvent être passe-haut, passe-bas ou passe-bande. Ils permettent de limiter la pollution lumineuse liée à la source de photons ou à l'auto-fluorescence de l'échantillon. Un filtre passe-haut ne laisse passer que les longueurs d'onde supérieures à une certaine valeur. À l'inverse, les filtres passe-bas ne laissent passer que les longueurs d'ondes inférieures à une certaine valeur. Un filtre passe-bande laisse passer comme son nom l'indique que les longueurs d'ondes comprises entre deux valeurs (**Figure 3-9 c.**). Un miroir dichroïque est quant à lui un miroir ayant la capacité de ne laisser passer et de réfléchir qu'une certaine longueur d'onde qui lui est propre.

La source lumineuse est également différente dans un microscope optique à épi-fluorescence. Si traditionnellement ces sources lumineuses sont des lampes à vapeur de mercure HBO ou de xénon XBO (**Figure 3-9 d.**), de nouvelles sources lumineuses composées de LED (pour Light-emitting diode) reliées à des fibres optiques font progressivement leur apparition.



**Figure 3-9|Principe de microscopie optique en epi-fluorescence.** Le principe de fonctionnement d'un microscope optique à épi-fluorescence est similaire à celui d'un microscope optique classique. Cependant, la source lumineuse est différente : lampe à vapeur de mercure, lampe à vapeur de xénon ou une série de lasers. Il contient également un bloc filtre (a.). Le bloc filtre est l'élément indispensable d'un microscope à épi-fluorescence. Il est composé d'un miroir dichroïque et deux filtres (d'émission et d'excitation). Un miroir dichroïque est un miroir qui a la capacité de ne laisser passer ou de réfléchir qu'une certaine longueur d'onde (b). Les filtres d'émission et d'excitation peuvent être passe-bas, passe-haut ou passe-bande. Ils permettent de limiter la pollution lumineuse liée à la source de photons ou à l'échantillon (c.). Les lampes HBO ont distribution spectrale plus importante dans les basses longueurs d'ondes (d.).

### 3.4.1.2.3 Matériel utilisé

L'unité INSERM U1121 dans laquelle cette thèse a été effectuée dispose deux microscopes optiques inversés à épi-fluorescence. La plupart des observations ont été réalisées sur le matériel le plus récent, c'est-à-dire un microscope Nikon Eclipse Ti-S. Ce dernier dispose de deux sources lumineuses, une lumière blanche pour l'observation d'échantillon en lumière transmise et une lampe Intensilight permettant d'observer les échantillons fluorescents. La première est fournie par une LED (Nikon CoolLEDpE-100 excited light source). Il est possible de modifier l'intensité lumineuse à partir du boîtier relié. La seconde source lumineuse Nikon Intensilight C-HGFIE peut être modulée (6 niveaux possibles) via un appareil de contrôle. Cela permet de minimiser l'impact de la lumière sur des échantillons trop photosensibles. Les images sont réalisées en niveau de gris par une caméra CDD Nikon Digital Sight DS-U3 et acquises via un logiciel dédié : NIS Element. Le logiciel NIS Element permet de commander le microscope et le passage des différents filtres.

Ce microscope Nikon Eclipse Ti-S dispose de quatre objectifs dédiés permettant de réaliser des images au  $\times 10$ ,  $\times 20$ ,  $\times 40$  et  $\times 60$ . Les différentes caractéristiques de ces objectifs se trouvent dans le tableau suivant :

<p><b>Objectif <math>\times 10</math> Phase 1</b> PI Fluor 10<math>\times</math>/0.30 ph1 inf/0.17 WD16</p>
<p><b>Objectif <math>\times 20</math> Phase 1</b> S PI Fluor ELWD 20<math>\times</math>/0.45 ph1 inf/0-2 WD 8,2-6,9</p>
<p><b>Objectif <math>\times 40</math> Phase 2</b> S PI Fluor ELWD 20<math>\times</math>/0.60 ph2 inf/0-2 WD 3,6-2,8</p>
<p><b>Objectif <math>\times 60</math> Huile à immersion</b> PI Apo <math>\lambda</math> 60<math>\times</math>/1.40 oil inf/0,17 WD 3,313 OFN 25 DIC N2</p>

**Tableau 3-3|Caractéristiques des différents objectifs du microscope inversé à épi-fluorescence** Nikon Eclipse Ti-S présent au laboratoire. Chaque objectif a des caractéristiques particulières gravées sur la monture. Parmi les principales, le grossissement  $n\times$

suivi de l'ouverture numérique (1,4 dans le cadre du 60×). L'épaisseur optimale de la lamelle couvre objet est également indiquée (0,17 p.e.). WD correspond à la distance de travail, en mm.

Les objectifs ×10 et ×20 ont principalement été utilisés lors des expériences de viabilité cellulaire (test Life/Dead) alors que le ×60 a été utilisé pour observer les immunocytochimies.

Le second microscope inversé à épi-fluorescence du laboratoire est un Nikon Eclipse TE200. Ce microscope dispose également de deux sources lumineuses : une lampe à lumière blanche ainsi qu'une lampe à vapeur de mercure. Les images sont réalisées en niveau de gris à l'aide d'une camera CCD Nikon DS-Q11MC et acquises via un logiciel dédié : NIRS Element 3.0. Les images obtenues avec ce microscope l'ont été à l'aide d'un objectif à immersion plan apochromate ×60 à huile disposant d'une ouverture numérique ON : 1,40.

### 3.4.1.3 Quantification de la viabilité cellulaire

La détection des cellules saines, en apoptose ou en nécrose a été réalisée, comme indiqué précédemment, par le kit Life/Dead (Promokine, PK-CA707-30018) selon les instructions données par le fournisseur. Les cellules, marquées au Hoechst 33342, à l'annexine V-FITC et/ou EtD-III, sont observées en microscopie optique à épi-fluorescence. Pour chaque conditions, 3 lamelles ont été imagées, chacune contenant 17 champs représentatifs de la population cellulaire. Pour chacun de ces champs, une image a été acquise pour chacun des fluorochromes, c'est-à-dire dans le bleu, le vert et le rouge. Le comptage des cellules a ensuite été réalisé via un logiciel d'analyse d'images très utilisé dans le domaine scientifique, ImageJ. Ce logiciel dispose d'un plug-in adapté au comptage cellulaire. Ce dernier se trouve selon le chemin suivant Plug-ins -> Particle analysis -> Cell counter.

Ce plug-in permet de compter les cellules présentes à l'image d'un simple clic. Une étiquette, dont la couleur est choisie par l'utilisateur, permet de visualiser les cellules déjà comptées. Le nombre de cellules pour chacun des canaux et chacun des champs est transféré dans un document Excel où le pourcentage d'apoptose, de nécrose et de survie cellulaire sont calculés selon les formules suivantes :

$$\frac{\text{nombre de cellules rouges}}{\text{nombre de cellules bleues}} * 100 = \text{pourcentage de nécrose}$$

$$\frac{\text{nombre de cellules vertes}}{\text{nombre de cellules bleues}} * 100 = \text{pourcentage d'apoptose}$$

$$\left( 1 - \left( \frac{\text{nombre de cellules rouges} + \text{vertes}}{\text{nombre de cellules bleues}} \right) \right) * 100 = \text{pourcentage de survie cellulaire}$$

## 3.4.2 Adhérence cellulaire

### 3.4.2.1 Un processus essentiel

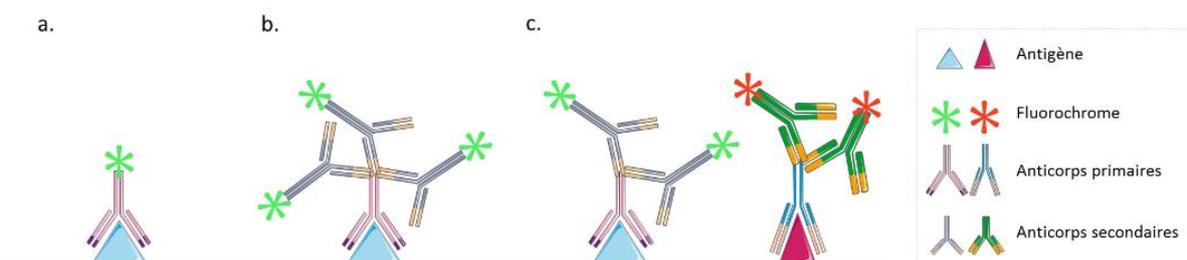
L'adhésion des cellules (**Chapitre 2**) est un processus clé de la formation des tissus et plus particulièrement des tissus épithéliaux. Au niveau des tissus, ce phénomène d'adhérence est nécessaire au maintien de la forme et au fonctionnement des différents tissus tandis qu'au niveau cellulaire, l'adhérence conditionne de nombreux autres processus tels que la division cellulaire, la migration ou encore la mort cellulaire. Cette adhérence cellulaire est médiée par l'implication de nombreuses molécules comme les intégrines et la vinculine. Afin de visualiser l'activation et la localisation de ces protéines clés de l'adhérence cellulaire, des expériences d'immunofluorescences ont été réalisées.

### 3.4.2.2 Immunofluorescence

La méthode d'immunofluorescence est une technique d'immunocytochimie développée par Coons et introduite dès 1941 au monde scientifique (Vandesande 1979). Cette méthode d'immunofluorescence est une des méthodes les plus couramment utilisées afin de localiser et visualiser une molécule biologique cible et/ou d'intérêt. Cette technique repose sur la forte affinité qui lie les anticorps à leurs antigènes.

#### 3.4.2.2.1 Principe d'immunofluorescence

En immunofluorescence, la molécule à localiser est reconnue comme un antigène par des anticorps spécifiques. Monoclonaux ou polyclonaux, ces anticorps spécifiques sont synthétisés par le système immunitaire d'animaux ne produisant pas par nature les molécules cibles. Une fraction de la molécule cible est injectée dans un animal sain. Son système immunitaire va développer une réponse immunitaire adaptative aboutissant à la création d'anticorps spécifiques à la fraction de molécules cibles injectées. Les anticorps sont ensuite récupérés dans le sérum de l'animal. Ces anticorps spécifiques à l'antigène peuvent directement être munis d'un traceur dans le cas d'un immunomarquage direct (**Figure 3-10 a.**). Dans le cas d'un marquage indirect, il est nécessaire d'utiliser des anticorps secondaires équipés de traceurs fluorescents capables de réagir de manière spécifique avec les anticorps primaires. Le marquage indirect est utilisé de manière plus importante au sein des laboratoires car il induit une augmentation importante de l'intensité lumineuse. En effet, plusieurs anticorps secondaires peuvent se fixer sur l'anticorps primaire (**Figure 3-10 b.**). Les anticorps secondaires sont dirigés contre l'espèce animale dans laquelle ont été synthétisés les anticorps primaires (anti-souris, anti-lapins...) et sont bien évidemment produit par d'autres espèces animales. Des marquages multiples sont également possibles. Dans ce cas les différents anticorps primaires utilisés doivent provenir de différentes espèces animales (**Figure 3-10 c.**).



**Figure 3-10 | Principe d'immunofluorescence.** L'immunofluorescence repose sur la forte affinité qui lie les anticorps à leurs antigènes. Un fluorochrome est fixé sur l'anticorps primaire dans le cas d'un immunomarquage (a.) ou sur l'anticorps secondaire dans le cas d'un marquage indirect (b.). Des marquages multiples sont également possibles (c.). Anticorps et antigènes réalisés par Servier Medical Art.

Outre le fait d'être rapide, fiable et facile, l'immunofluorescence est compatible avec d'autres marquages fluorescents ne nécessitant pas de relation de type antigène-anticorps. C'est par exemple le cas de la phalloïdine qui marque les filaments d'actine ou du Hoechst 33258 qui marque spécifiquement les noyaux en se liant à l'ADN. Les résultats sont révélés en microscopie optique à épi-fluorescence. Cependant, les échantillons doivent être préparés au préalable. D'autres variations d'immunomarquage que l'immunofluorescence existe. Les principales différences figurent au niveau des traceurs et de la méthode de révélation comme par exemple l'utilisation d'or colloïdal qui peut être révélé en microscopie optique à fond clair ou en microscopie électronique à transmission.

#### 3.4.2.2.2 Préparation des échantillons

Avant d'être immunomarquées, les cellules nécessitent une préparation spécifique qui s'articule en trois parties : fixation, perméabilisation et saturation. La **fixation** est l'étape la plus importante de cette prépara-

tion. L'utilisation de paraformaldéhyde (PFA) crée des ponts entre les protéines afin de maintenir leur localisation et ainsi permettre leur visualisation dans un état proche du vivant. Il est utilisé à une concentration de 3,7%. Pour que les anticorps puissent pénétrer à l'intérieur de la cellule où ils se lieront avec leurs antigènes respectifs, les cellules doivent subir une étape de **perméabilisation**. Un détergent, le triton X-100® est utilisé afin de rendre perméable les membranes cellulaires et nucléaires. Il est utilisé à une concentration de 0,1%. Les étapes de fixation et de perméabilisation se font en même temps. La solution de PFA 3,7%-Triton 0,1% est déposée sur les cellules à température ambiante durant 15 minutes. Les échantillons, une fois rincés à l'aide de PBS 1X, subissent une étape de **saturation**. Cette étape consiste à saturer à l'aide de FBS décomplémenté à 10% tous les sites aspécifiques. La solution de FBS à 10% est préparée dans du PBS et déposée sur les échantillons durant 12 heures à 4°C.

### 3.4.2.2.3 Protocole d'immunofluorescence

Une fois les échantillons fixés, perméabilisés et saturés durant 12 heures, le protocole d'immunofluorescence à proprement parlé peut commencer. Les échantillons sont rincés à l'aide de PBS 1X tandis que la solution d'anticorps primaire est préparée dans du PBS 1X. La quantité d'anticorps utilisée dépend de l'affinité de l'anticorps pour son antigène. Il est généralement nécessaire d'effectuer une première analyse de l'anticorps après réception pour évaluer la dilution à utiliser pour un marquage optimal (**Tableau 3-4**).

Anticorps primaires	Provenance	Type	Dilution	Fournisseur et référence
Contacts focaux				
Intégrine $\alpha$ V (P2W7)	Souris	Monoclonal	1:100 <sup>e</sup>	Santa Cruz (sc-9969)
Intégrine $\beta$ 3 (B-7)	Souris	Monoclonal	1:100 <sup>e</sup>	Santa Cruz (sc-46655)
Vinculine (VIN-1)	Souris	Monoclonal	1:100 <sup>e</sup>	US Biological (V2122-63)
Cytosquelette				
Vimentine V9	Souris	Monoclonal	1:100 <sup>e</sup>	Santa Cruz (sc-6260)
Activité nucléaire				
HnRNP A1 [9H10] (ab5832)	Souris	Monoclonal	1:100 <sup>e</sup>	AbCam (ab5832)
Nucléo-squelette				
Lamine B	Lapin	Polyclonal	1:50 <sup>e</sup>	Spring Bioscience (E13490)

**Tableau 3-4|Tableau récapitulatif des anticorps primaires utilisés.** Afin d'observer des molécules d'intérêt impliquées dans la mécano-transduction, de nombreux anticorps primaires ont été utilisés.

Afin d'économiser les solutions mères d'anticorps primaires, les lamelles sont déplacées à l'aide de pinces et aiguilles sur des supports conçus au laboratoire permettant l'utilisation de 90  $\mu$ L ou 150  $\mu$ L de solution d'anticorps primaire pour, respectivement, des lamelles de 12mm ou de 18 mm  $\varnothing$ . Les anticorps réagissent avec leurs antigènes spécifiques durant 1h30 à température ambiante avant d'être rincés deux fois à l'aide de PBS 1X durant 5 minutes. La solution d'anticorps secondaire est alors préparée dans du PBS1X (**Tableau 3-5**). Une dilution au 1:500<sup>e</sup> de l'anticorps secondaire est réalisée. Un volume de 280  $\mu$ L est déposé par échantillon et laissé incuber durant 30 minutes à température ambiante. Les anticorps secondaires fluorescents sont incubés à l'obscurité.

Anticorps secondaire	Fluorophore	Dilution	Fournisseur et référence
Chèvre anti-souris	Alexa 488 (vert)	1:500 <sup>e</sup>	Life technologies A11001

Chèvre anti-lapin	FITC (vert)	1:500 <sup>e</sup>	Santa Cruz sc-2012
-------------------	----------------	--------------------	--------------------

**Tableau 3-5 | Tableau récapitulatif des anticorps secondaires utilisés.** Afin de révéler les anticorps primaires utilisés, deux anticorps secondaires munis d'un fluorophore émettant dans le vert ont été utilisés.

Les lamelles sont ensuite rincées deux fois à l'aide de PBS 1X pendant 5 minutes. Les échantillons subissent ensuite des marquages fluorescents non liés à des relations anticorps et antigènes : la phalloïdine et le Hoechst. La phalloïdine (Sigma, réf. P1951) est diluée au 1:100<sup>e</sup> dans du PBS 1X. Un volume de 280  $\mu$ L est déposé par lamelle durant 15 minutes à température ambiante et toujours à l'obscurité. Les lamelles sont une nouvelles fois rincées deux fois à l'aide de PBS 1X pendant 5 minutes avant d'être incubées en présence de Hoechst 33258 (Sigma, réf. 861405) dilué au 1:50<sup>e</sup> dans du PBS 1X. L'incubation se fait durant 5 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Les lamelles sont une dernière fois rincées deux fois durant 10 minutes avant d'être montées sur des lames de verres permettant leur observation en microscopie. Le montage se fait à l'aide d'une goutte de Vectashield® (Vector Laboratories, Burlingame, Californie, USA) déposée sur la lame sur laquelle, la lamelle retournée est déposée. La lamelle est définitivement scellée à l'aide d'un vernis à ongles transparent. Les lamelles sont ensuite observées en microscopie optique à épi-fluorescence (3.4.1.2).

### 3.4.3 Migration cellulaire

#### 3.4.3.1 Un processus essentiel

La migration joue un rôle clé dans de nombreux processus biologiques et plus particulièrement au cours du développement d'un organisme ou de la cicatrisation. L'adhérence cellulaire est un prérequis à la migration cellulaire. La migration étant un processus dynamique dans laquelle la cellule se déplace (**Cf. 2.2.2 pour plus d'informations**).

#### 3.4.3.2 La vidéo-microscopie

Les organismes vivants, les tissus, les cellules et les molécules sont des éléments très dynamiques. Cependant, ils sont souvent observés à l'état statique après fixation. L'importance de l'observation à long terme de ces éléments bien que reconnue dès le 17<sup>ème</sup> siècle par Antoni van Leeuwenhoek, est limitée technologiquement. Le développement de la photographie, de la microcinématographie, couplé à l'apparition de la microscopie à épi-fluorescence et des techniques de culture cellulaire aux 19<sup>e</sup> et 20<sup>e</sup> siècles ont permis le développement de la vidéo-microscopie. Avant même l'invention du cinéma par les frères Lumières, Etienne Jules Maray avait développé un chronophotographe afin d'observer le mouvement des oiseaux (Coutu and Schroeder 2013).

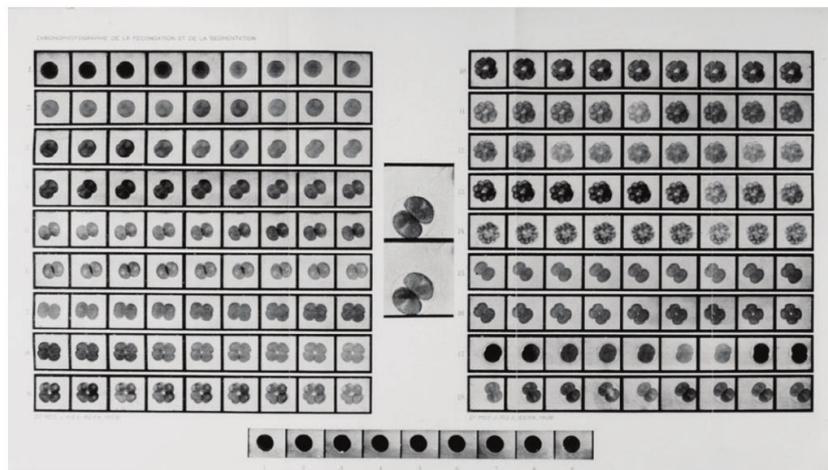
Un certain nombre de challenges sont liés à la vidéo-microscopie. Le premier de ces challenges fut le maintien des cellules vivantes le temps de l'expérience. L'utilisation de milieu de culture complet et d'incubateurs à la température, au pH, au taux d'O<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> contrôlés ont permis de régler ce problème. Une nouvelle problématique est alors apparue : l'évaporation liée aux échanges gazeux constants entre le milieu de culture et l'environnement. L'utilisation d'huile minérale en surface a permis d'apporter une solution à cette question. Un autre problème était la phototoxicité. La solution a été de réduire l'intensité lumineuse lors de la prise de vue en utilisant des caméras de plus en plus sensibles (Coutu and Schroeder 2013).

##### 3.4.3.2.1 Principe de l'accélééré ou time-lapse

En 1896, le cinématographe est développé par Louis et Alphonse Lumière. Cet appareil permet non seulement la prise de vue mais aussi la projection de films sous la forme d'une série d'images d'un même champ

prises et projetées à intervalles de temps régulier. C'est presque par accident que l'accélééré ou time-lapse, très utilisé en biologie, est inventé. Afin de développer le cinématographe, des centaines de photographes sont envoyées autour du monde pour tourner des films. Un de ces photographes commettra l'erreur d'augmenter le temps entre les prises de vue des toreros qu'il filmait donnant un film aux actions accélérée ; le time-lapse était né.

Bien que la vidéo-microscopie soit souvent vue comme une technique récente, l'un des premiers films vidéo-microscopique utilisé en biologie date de 1907. Il s'agissait de la fertilisation et du développement d'un oursin (**Figure 3-11**). Grâce à cette technique, les chercheurs se sont rendu compte qu'il leur était désormais possible d'observer des choses invisibles auparavant comme par exemple le mouvement des cellules qui est généralement trop lent pour être perçu par l'œil humain (Landecker 2009). Cette technique de vidéo-microscopie a ensuite profité des avancées technologiques et plus particulièrement du développement de nouveaux microscopes et de l'insertion de sondes fluorescentes dans les cellules vivantes.



**Figure 3-11 | Pellicule de l'une des premières vidéo-microscopies réalisées.** Cette vidéo-microscopie a été réalisée par Julien Ries à Paris en 1907. Cette expérience montre la fertilisation et le développement de l'oursin. Julien Ries a réalisé cette vidéo-microscopie pour prouver à ces étudiants en médecine que les cellules d'un organisme proviennent de la division d'une cellule. Adaptée de (Landecker 2009).

Afin d'observer des événements dynamiques s'étalant sur quelques secondes à plusieurs jours, le microscope se devait de reproduire les conditions physiologiques dans lesquelles les cellules vivent. A ces fins, le microscope était équipé d'un certain nombre d'éléments. Le microscope était le plus souvent placé dans un incubateur où la température, le pH et le taux de dioxyde de carbone sont contrôlés et régulés. Les microscopes généralement utilisés étaient des microscopes inversés. Ces microscopes présentent l'avantage d'avoir un volume libre plus important au-dessus de la platine, permettant le montage et/ou l'implémentation de chambres d'acquisition.

#### 3.4.3.2.2 Préparation des échantillons

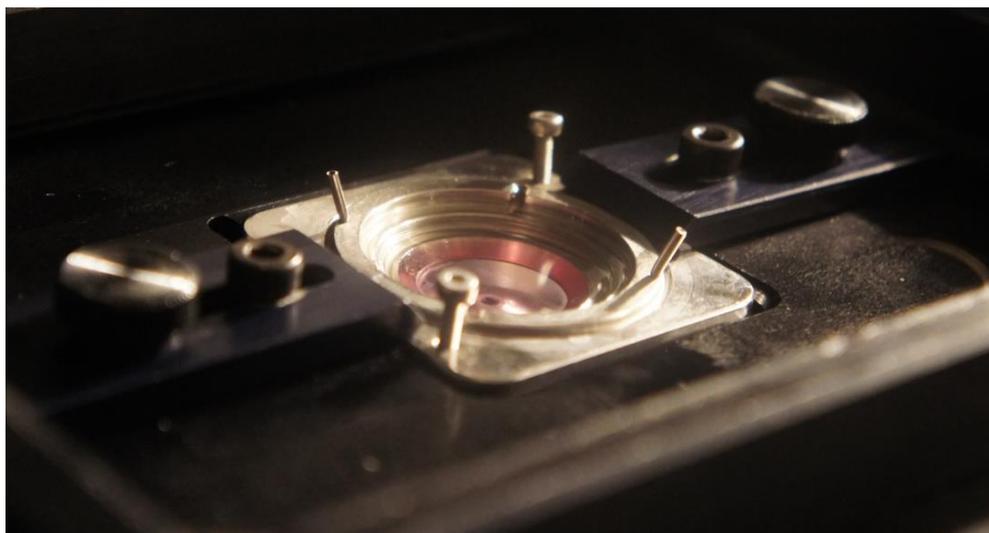
Afin d'être observés en vidéo-microscopie, les échantillons nécessitent une préparation spécifique. Les cellules sontensemencées sur des lamelles de verre de 18 mm de diamètre ou sur des films  $E_{20}$  construits sur des lamelles de verre de 18 mm de diamètre selon les expériences. Le diamètre de 18 mm permet aux échantillons d'être montés dans la chambre de Ludin. Les cellules sontensemencées (**Voir 3.2.2.2.**) sur les films et lamelles puis laissées à incuber  $37^{\circ}\text{C}$  et  $5\% \text{CO}_2$  à l'incubateur 24 heures avant l'expérience de vidéo-microscopie.

### *Marquage au Hoechst 42*

L'Hoeschst 33342 (Sigma, réf. B2261) est une sonde fluorescente permettant de marquer l'ADN des cellules et donc le noyau. L'Hoeschst 33342 qui doit son nom à la compagnie qui le produit est perméable aux cellules ; il est excité par la lumière ultraviolette et émet une lumière fluorescente dans le bleu. Contrairement au Hoechst 33258, le Hoechst 33342 (H42) peut être utilisé sur des cellules vivantes. Les cellules sont marquées à l'Hoeschst car cela rend le suivi et l'analyse post-acquisition des mouvements cellulaires beaucoup plus faciles. La solution mère est préparée à une concentration de 1 mg/mL dans de l'eau MilliQ. Cette solution est diluée au 1:100<sup>e</sup> dans du milieu de culture complet. Un volume de 20 µL de la solution obtenue est déposé par puits. Les cellules en présence du Hoechst sont remises à l'incubateur durant 30 minutes.

### *Montage dans la chambre de Ludin*

La chambre de Ludin (Life Imaging Service, Switzerland) est une chambre de perfusion en acier inoxydable permettant le montage des échantillons pour des observations en vidéo-microscopie (**Figure 3-12**). A l'aide de pinces et aiguilles, la lamelle marquée au H42, est montée dans la chambre sans rinçage. Un volume de 800 µL de milieu de culture complet est ensuite déposé sur la lamelle dans la chambre de Ludin. Un volume identique d'huile minérale (Sigma Aldrich) est déposé en surface afin d'éviter l'évaporation du milieu de culture. Un soin important est apporté pour qu'aucune bulle ne soit formée lors de la déposition du milieu de culture et de l'huile minérale.



**Figure 3-12|Chambre de Ludin.** Afin de procéder à l'étude de la migration cellulaire, les lamelles sur lesquelles sont ensemencées les cellules sont montées dans une chambre de Ludin.

### 3.4.3.2.3 Matériel utilisé

L'unité INSERM U1121 dans laquelle cette thèse a été effectuée dispose d'un microscope optique inversé à épi-fluorescence adaptée à la vidéo-microscopie. Ce microscope inversé Nikon Eclipse Ti-S est équipé d'une plateforme motorisée sur laquelle est montée la chambre de Ludin afin de retrouver les champs choisis. Afin de reproduire des conditions les plus proches de celles rencontrées dans le vivant, le microscope est placé dans un incubateur où la température, le pH et l'humidité sont maintenus constants et régulés le cas échéant. Le microscope est également équipé de deux sources lumineuses, une lumière blanche pour l'observation d'échantillon en lumière transmise et une lampe Intensilight permettant d'observer les échantillons fluorescents. La première est fournie par une LED (Nikon CoolLEDpE-100 excited light source). Il est possible de modifier l'intensité lumineuse à partir du boîtier relié. La seconde source lumineuse Nikon Intensi-light C-HGFIE peut être modulée (6 niveaux possibles) via un appareil de contrôle. Cela permet de

minimiser l'impact de la lumière sur des échantillons trop photosensibles. Les images sont réalisées en niveau de gris grâce à une caméra Andor Zyla sCMOS et acquises via un logiciel dédié : NIS Element AR Analysis fourni par Nikon. Ce logiciel permet la gestion des allumages des sources lumineuses, des temps d'expositions, des canaux, des différentes positions des champs d'intérêts (13 champs par échantillon) ainsi que l'acquisition toutes les 15 minutes des images sur une durée de 24 heures. Les images ont été réalisées en contraste de phase et en DAPI à l'aide d'un objectif plan  $\times 40$  DL PH2 ayant une ouverture numérique de 0,65.

#### 3.4.3.3 Analyse des images

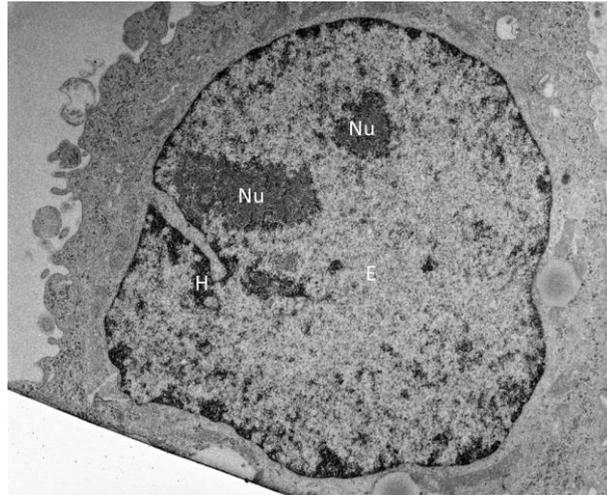
Les images obtenues sont ensuite analysées par ImageJ et par un logiciel d'analyse NIS-Elements AR Analysis (Nikon). L'analyse de la migration cellulaire se fait à partir des images obtenues à chaque intervalle de temps en DAPI pour chaque position. Le contraste des images est ajusté dans l'onglet LUTs du logiciel puis un seuillage est réalisé. Ce seuillage permet de détecter les noyaux cellulaires à l'aide de paramètres de taille et de circularité sur la séquence d'acquisition.

Le pistage des cellules se fait dans l'onglet « Tracking options » où les paramètres de pistages tels que le temps minimum de suivi d'une cellule sont définis. L'analyse « Track binaires » est ensuite appliquée. L'utilisation des images en champs clair permet de vérifier en parallèle la viabilité des cellules suivies. Les cellules pistées qui meurent au cours de l'expérience sont alors supprimées. Cela permet de n'obtenir que les données de migration cellulaire pour des cellules vivantes. Le logiciel permet ensuite d'extraire des données de vitesse, de distances parcourues, ou encore de directions pour chaque cellule.

## 3.5 Chromatine

### 3.5.1 Etat de la chromatine

L'ADN est le constituant fondamental de la chromatine du noyau. La chromatine existe sous forme décondensée active, euchromatine et condensée silencieuse, hétérochromatine. Afin de quantifier la proportion de chacune de ces formes au sein d'un noyau cellulaire, la microscopie électronique à transmission est utilisée. Cette technique permet d'observer l'ultrastructure d'une cellule. Cela en fait donc un outil de choix pour l'observation d'organites tels que les mitochondries, le réticulum endoplasmique ou encore la structure de la chromatine. L'hétérochromatine est localisée à la périphérie du noyau et du(des) nucléole(s) sous la forme d'un bord irrégulier ainsi que dans des granules répartis dans le nucléoplasme alors que l'euchromatine remplit la majeure partie du noyau (**Figure 3-13**).



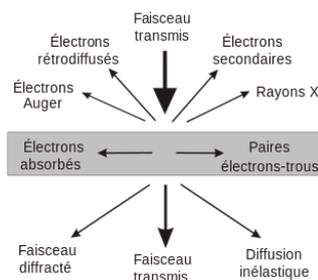
**Figure 3-13| Chromatine observée en microscopie électronique à transmission.** Les amas noirs en périphérie correspondent à de l'hétérochromatine (H): l'ADN est plus concentré et laisse moins facilement passer les électrons. Les zones granuleuses grises à l'intérieur du noyau correspondent à de l'euchromatine (E). L'ADN étant décondensé, il laisse passer plus facilement les électrons. La zone plus foncée au cœur du noyau correspond au nucléole (Nu).

### 3.5.2 Microscopie électronique à transmission

En microscopie électronique à transmission, des électrons projetés à haute vitesse par un canon à électrons sur l'échantillon remplacent les photons. L'utilisation d'électrons en lieu et place des photons permet d'atteindre une résolution de l'ordre du nanomètre (contrairement à une résolution de 0,2  $\mu\text{m}$  obtenue avec les photons en microscopie optique). Les électrons projetés vont interagir avec la matière constituant l'échantillon. Les électrons sélectionnés afin de former l'image dépendent en grande partie du mode d'imagerie choisie. Ainsi, en microscopie électronique en transmission, seuls les électrons ayant traversé l'échantillon c'est-à-dire transmis participeront à la construction de l'image sur un écran de phosphore.

#### 3.5.2.1 Interactions des électrons avec la matière

Comme indiqué précédemment, la microscopie électronique repose en grande partie sur la capacité des électrons à interagir avec la matière. Lorsqu'un faisceau d'électrons atteint l'échantillon, ces électrons peuvent interagir de diverses manières (**Figure 3-14**): certaines seront rétrodiffusées, certains absorbés... Quelques électrons seront aussi diffractés mais une partie de ces électrons parvient à traverser cet échantillon, ce sont les électrons transmis.



**Figure 3-14| Interactions des électrons avec la matière.** Lorsqu'un faisceau d'électrons atteint l'échantillon, ces électrons peuvent interagir de diverses manières : certaines seront rétrodiffusées, certains absorbés... Quelques électrons seront aussi diffractés mais une partie de ces électrons parvient à traverser cet échantillon, ce sont les électrons transmis.

L'ensemble des techniques de microscopie électronique joue sur les paramètres de chacune des interactions des électrons avec la matière. En effet, plusieurs modes d'imagerie existent en microscopie électro-

nique à transmission : champ clair, champ sombre, contraste de diffusion, faible dose, en transmission à balayage ainsi qu'en haute résolution.

La chromatine présente dans le noyau cellulaire a pour particularité d'avoir une structure inhomogène. Afin d'obtenir les meilleurs résultats, deux modes d'imagerie en microscopie électronique à transmission peuvent être utilisés. Le premier mode, nommé « Contraste de diffusion » nécessite un marquage avec des atomes lourds. Les électrons diffusés sont pris en compte dans la formation de l'image avec l'utilisation de ce mode. La seconde méthode qui convient à l'imagerie de la chromatine est le mode « Champ clair ». Seuls les électrons transmis sont considérés dans la construction de l'image selon ce mode.

### 3.5.2.2 Préparation des échantillons

L'utilisation d'électrons nécessite une préparation spécifique des échantillons. Ces échantillons sont d'abord fixés afin de conserver la structure, puis déshydratés et inclus en résine Epoxy. Les blocs obtenus sont ensuite taillés, puis des coupes ultrafines sont réalisées et montées sur des grilles. Ces dernières sont ensuite colorées pour permettre d'obtenir du contraste.

L'étape de **fixation** est primordiale en microscopie électronique à transmission. Etant donné le grossissement utilisé, la structure cellulaire se doit d'être parfaitement conservée. La solution de fixation utilisée ne doit en effet avoir un pH et un tampon particulier afin de ne pas dégrader la structure. Pour que les organites soient maintenus dans un état aussi proche que celui du vivant, la fixation doit être instantanée. Dans un premier temps, un fixateur à base de glutaraldéhyde (Euromedex, réf. 16220, Souffelweyersheim, France) et de paraformaldéhyde (Euromedex, réf. 15714,) est utilisé. Bien que le glutaraldéhyde pénètre les tissus moins rapidement (0,1 mm/h) que le PFA (1 mm/h), les liaisons formées avec les groupements NH<sub>2</sub> des protéines sont beaucoup plus stables. Les cellules sont brièvement rincées avec un tampon cacodylate 0,125M pH7,4 (Euromedex, réf. 12300, Souffelweyersheim, France.) avant d'être fixées d'abord durant 2 heures à température ambiante dans du tampon cacodylate 0,05 M pH7,4 + 4% glutaraldéhyde + 0,5% PFA final. Cette fixation au glutaraldéhyde est suivie d'une seconde fixation à l'acide osmique OsO<sub>4</sub> à 1% (Euromedex, réf. 19140) dans du tampon cacodylate 0,125 M. L'utilisation d'acide osmique permet de fixer les phospholipides des membranes tout en permettant un meilleur contraste (en raison de son poids atomique élevé). Les échantillons sont ensuite rincés 3 fois durant 10 minutes à l'aide de tampon cacodylate 0,125 M pH 7,4.

Les échantillons sont ensuite déshydratés afin de permettre l'inclusion des échantillons. L'eau est donc progressivement remplacée par un solvant miscible dans l'élément d'enrobage. Les échantillons sont déshydratés par des passages successifs de 10 min dans des bains d'éthanol de degré croissant : 50%, 70%, 95% puis 3 bains de 7 min d'éthanol absolu. L'étape d'imprégnation est réalisée par transfert des échantillons dans un mélange de 50% d'éthanol absolu et de 50% de résine Epoxy pendant 30 min.

L'**inclusion** est une étape nécessaire afin d'obtenir des coupes suffisamment minces pour laisser passer des électrons. Afin de procéder à des coupes ultrafines, les échantillons sont inclus dans une résine dure, l'Epon (Sigma Aldrich, réf. 45359-1EA-F Saint Quentin Fallavier, France). La composition de la résine utilisée est la suivante : 2,03 mL d'Epon 812, 1,53 mL d'anhydride nadic methyl, 0,5 ml d'anhydride [2-dodeceny] succinic, et de 0,061 mL 2,4,6-tris diméthylaminoethyl phenol. Les échantillons sont placés dans de la résine pure durant 30 min puis 2 heures à température ambiante. Afin d'inclure de manière optimale les échantillons, les lamelles (sur lesquelles les cellules ont été cultivées en surface) sont déposées à l'envers sur des petits godets remplis de résine, puis l'ensemble est retourné. Ceci permet d'éviter que l'échantillon soit découvert car la résine se rétracte légèrement lorsqu'elle polymérise. Les godets sont laissés 2h à tempéra-

ture ambiante avant d'être mis dans une étuve à 60°C pendant 48h pour permettre la polymérisation de la résine. Afin de pouvoir couper les blocs, les lamelles de verre sont décollées par choc thermique (par trempage dans de l'azote liquide). Les blocs sont ensuite passés à la scie circulaire pour obtenir des petits blocs (réduction) car compte-tenu de la faible épaisseur des coupes, il n'est pas possible de couper des surfaces importantes. Afin de pouvoir réaliser de coupes transversales des cellules, les petits blocs sont collés sur des blocs en résine seule polymérisée dans des moules en silicone réorientés afin de les réorientés à 90° en les collant sur des blocs en résine seule polymérisée dans des moules en silicone. Les échantillons obtenus sont ensuite taillés sous binoculaire à l'aide d'une lame de rasoir pour obtenir un parallélépipède d'une surface environ de 0,2 x 0,3mm.

Les **coupes ultrafines** sont réalisées à l'aide d'un ultra-microtome modèle Reichert Ultracut-E (Société Leica Microsystems, Nanterre, France) équipé d'un couteau de diamant avec réservoir d'eau intégré pour récupérer les coupes. Le bloc de résine préparé est ensuite monté sur un porte objet qui va progressivement avancer (selon l'épaisseur des coupes souhaitées) vers le couteau de diamant. Les coupes très fines réalisées sont ensuite récupérées dans un godet d'eau distillée. L'épaisseur des coupes est indiquée par la polarisation que ces coupes ultrafines présentent à la lumière blanche. Avant de réaliser les coupes ultrafines (d'une épaisseur d'environ 100 nm), des coupes semi fines sont d'abord préparées et colorées au bleu de toluidine avant d'être observées en microscopie optique. Cette étape permet de vérifier que l'on se situe dans le bon plan de coupe (cellule + film + noyau + nucléole). Les coupes ultrafines ensuite réalisées sont montées sur des petites grilles (3 mm de diamètre et 0,17 mm d'épaisseur) à l'aide d'ose avant d'être « contrastées ». Les grilles en cuivre sont recouvertes d'un film de formvar et d'une couche de carbone (Euromedex, réf. FCF100-CU-50). Le film de formvar a pour rôle de stabiliser les coupes sous le faisceau d'électron. La couche de carbone permet de protéger l'échantillon en déviant une partie des électrons. De l'acétate d'uranyle à 5% (Euromedex, réf. 22400) est utilisé pour contraster l'échantillon. Les grilles à colorer sont déposées sur des gouttes de ce produit pendant 20 minutes. L'acétate d'uranyle permet de mettre en évidence les acides nucléiques. La « **coloration** » est complétée par l'utilisation de citrate de plomb (obtenu à partir d'un mélange de nitrate de plomb et de citrate de sodium) (Euromedex, réf. 17900 et 21140) à 4% pendant 10 min. Ce dernier lie les membranes. Le contraste, donc la coloration finale dépend surtout de l'épaisseur de la coupe et moins du temps, les épaisseurs pouvant être visualisées au MET varient entre 60 et 180 nm.

### 3.5.2.3 Principe du microscope électronique à transmission

Comme indiqué précédemment (**3.5.2**), en microscopie électronique, les électrons remplacent les photons. En raison de cette différence fondamentale, les microscopes électroniques à transmission diffèrent sur bien des points des microscopes optiques. L'une des différences majeures, est le fait que le vide soit réalisé à l'intérieur du microscope. Ce vide est réalisé dans la colonne afin de ne pas perturber le flux d'électrons. Le canon à électrons remplace la source lumineuse des microscopes optiques. Un canon à électrons est composé d'un filament de tungstène (ayant une durée de vie d'à peu près un an), d'un blindage et d'une anode relié à la terre. Un microscope électronique à transmission est également caractérisé par l'utilisation de lentilles magnétiques. En effet, contrairement à la microscopie optique où la focalisation se fait par déplacement de la lentille, cette dernière se fait par changement du champ magnétique dans le cadre de la microscopie électronique. Afin d'obtenir une image optimale, l'échantillon subit une longue préparation (**Cf. 3.5.2.2**). La grille, sur laquelle est l'échantillon, est ensuite déposée sur le goniomètre porte-échantillon. Les électrons transmis sont détectés par des négatifs (argentiques), des plaques optiques ou une caméra. Bien que l'utilisation d'électrons ait nécessité des modifications structurelles du microscope, l'axe optique est

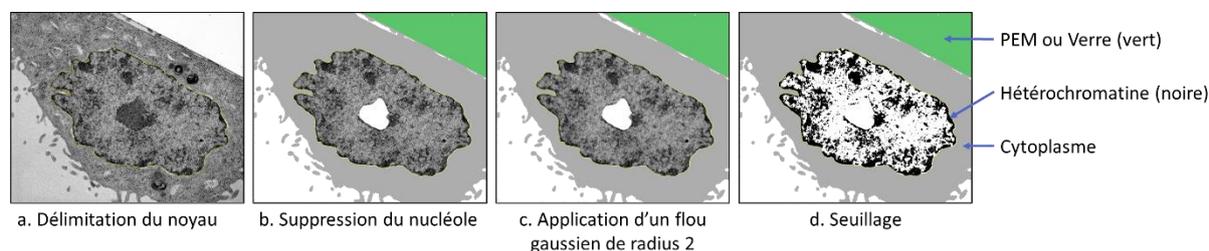
similaire à celui d'un microscope optique. Cet axe optique est le suivant : source d'électrons – condenseur – échantillon – objectif – lentille intermédiaire – projecteur – écran.

#### 3.5.2.4 Matériel utilisé

Les grilles sont observées au microscope électronique en transmission modèle Philips EM208 (FEI, Eindhoven, Pays Bas) sous une tension d'accélération de 70kV. Les images ont été acquises sur films argentiques SO-163 (Sigma Aldrich, réf. F8145-250EA, Saint Quentin Fallavier, France). Les négatifs ont été développés 15 min à 22°C dans du révélateur D19 (Euromedex, réf. 74200, Souffelweyersheim, France) et fixés 17 min dans du fixateur photo Superfix Plus (Téténal, réf. 102762 Monéteau, France). Les négatifs sont enfin numérisés à l'aide d'un scanner Epson Perfection V500 PRO (Epson France, Levallois-Perret).

### 3.5.3 Quantification de l'hétérochromatine

La quantification de l'hétérochromatine se fait à l'aide du logiciel ImageJ à partir des images de microscopie électronique à transmission scannées. A l'aide des outils « Selection » et « Brush », le contour du noyau est délimité. La zone est alors ajoutée au ROI Manager. Il est alors possible d'obtenir l'aire totale occupée par le noyau. Il en est de même pour le(s) nucléole(s) ou toutes anomalies. Les zones correspondantes aux nucléoles et aux éventuelles anomalies sont alors supprimées de l'image via la commande CTRL X. Leurs aires sont ensuite soustraites de l'aire totale du noyau. Un filtre gaussien de radius 2 est ajouté à la zone délimitant le noyau afin d'appliquer un flou sur l'image permettant une meilleure quantification de l'hétérochromatine, représentée sous la forme de pixels noirs. Une étape de seuillage (Image -> Adjust -> Threshold...) permet de mettre en évidence l'aire occupée par l'hétérochromatine. Cette aire est ensuite rapportée à celle du noyau (**Figure 3-15**)



**Figure 3-15 | Quantification de l'hétérochromatine.** La quantification de l'hétérochromatine à l'aide d'ImageJ se fait en plusieurs étapes. D'abord, le noyau et le(s) nucléole(s) sont détournés et ajouté au ROI (a). Le(s) nucléole(s) est(sont) supprimé(s) (b). Un flou gaussien de radius 2 est appliqué à la zone détournant le noyau (c). Un seuillage est ensuite réalisé afin d'obtenir la surface occupée par l'hétérochromatine (d).

Les mesures de quantification ont été réalisées pour de nombreuses conditions dans les **Chapitre 4** et **Chapitre 5**. Chaque condition a fait l'objet de deux expériences indépendantes.

## 3.6 Transcriptome

Un transcriptome correspond à l'ensemble des molécules d'ARN d'une cellule ou d'une population cellulaire. La durée de vie d'un ARN messager est très courte. En effet, l'ADN est transcrit en ARN par une ARN polymérase, mûri puis transporté dans le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, il est rapidement traduit en acides aminés conduisant à la synthèse de protéine. Cette durée de vie limitée représente bien des avantages. Cela permet entre autres d'observer quels gènes sont exprimés en réponse à des conditions environnementales externes (changement physique ou chimique de l'environnement cellulaire).

L'un des principaux éléments des travaux présentés dans le **Chapitre 5** est la compréhension à tous niveaux (incluant le niveau génétique) du phénomène de résistance aux substrats de faible élasticité observé chez certaines cellules cancéreuses. Dans le but d'identifier les gènes impliqués dans cette résistance, une analyse du transcriptome a été réalisée.

### 3.6.1 Extraction du transcriptome

Afin d'être analysés à la plateforme de « Biopuces et séquençage » de l'IGBMC, les échantillons d'ARN doivent être extraits des cellules, précipités, purifiés, solubilisés et quantifiés. Etant donné les coûts liés à une analyse transcriptomique, la qualité des échantillons est également vérifiée.

#### 3.6.1.1 Préparation des échantillons

L'extraction des acides ribonucléiques se fait sur les cellules vivantes contrôles (Verre)<sub>9</sub> et sélectionnées selon la séquence (E<sub>20</sub>-Verre)<sub>4</sub> en culture sur des lamelles de verre de 18 mm Ø placées au fond de plaques de 12 puits. L'extraction à proprement parler des ARN (**Figure 3-16**) se fait sous hotte à aspiration en raison de la toxicité des produits utilisés. L'ensemble des manipulations doivent se faire avec des gants et des cônes stériles. En effet, l'ARN est sensible aux ribonucléases. Ces ribonucléases sont facilement trouvées à la surface de la peau où elles agissent comme mécanisme de défense contre les infections (Dyer and Rosenberg 2006).

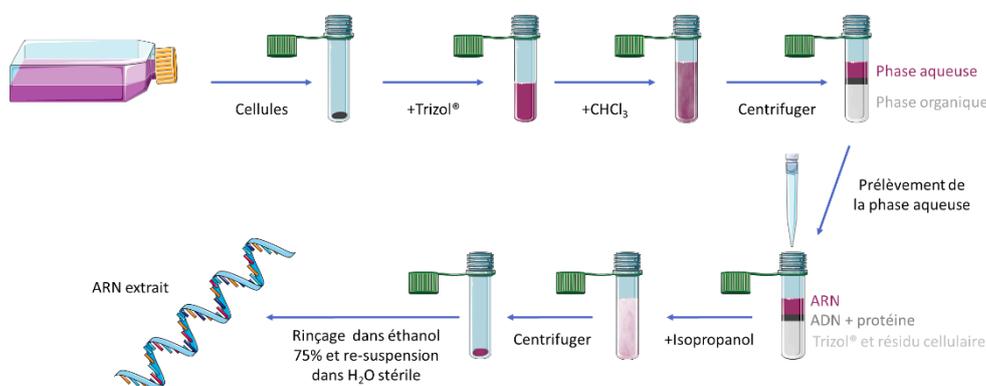
Le milieu de culture des cellules est délicatement retiré tout en veillant à ce que le tapis cellulaire reste humide. Un volume de 250 µL de Trizol® est déposé par puits. Incubé 5 minutes à température ambiante, le Trizol® va induire la lyse des membranes cellulaires et nucléaires. Les acides nucléiques vont alors rendre le Trizol® visqueux. Le contenu de 4 puits est ensuite rassemblé dans un microtube de 2 ml. Ces derniers sont ensuite vigoureusement vortexer.

L'extraction des ARN se fait à l'aide de solution de chloroforme CHCl<sub>3</sub>. Un volume de 200 µL de CHCl<sub>3</sub> est ajouté par tube. Au bout de 10 minutes de réaction à température ambiante, le contenu de tube est triphasique. Au fond, une phase aqueuse correspondant au Trizol®, puis un précipité blanc liée au CHCl<sub>3</sub> et enfin en surface, une phase aqueuse contenant les ARN. Les microtubes sont centrifugés à 12 000 g durant 15 min à 4°C. Cette phase de centrifugation va permettre une séparation optimale des différentes phases et accélérer le phénomène dans les tubes retardés.

Cette phase aqueuse est ensuite transférée, en prenant soin de ne pas prélever du soluté blanc, dans un nouveau tube. Un volume de 500 µL d'isopropanol est ajouté dans chacun des microtubes. Cette étape a pour but de faire précipiter les ARN au fond du tube. L'isopropanol agit durant 5 à 10 minutes à température ambiante. Il est important de ne pas vortexer les solutions obtenues lors de cette étape, les ARN étant relativement fragiles. L'homogénéisation se fait par plusieurs retournements lents des tubes. La précipitation des ARN est ensuite accélérée par une centrifugation à 12 000 g à 4°C durant 8 minutes. Le surnageant et l'ensemble de l'isopropanol sont délicatement enlevés en totalité afin d'éviter toute pollution de l'échantillon d'ARN.

Les précipités sont ensuite rincés avec de l'éthanol 75% afin d'éviter toute présence résiduelle de l'agent de précipitation isopropanol. Les échantillons sont une nouvelles fois centrifugés durant 5 minutes à 7 500 g avant d'être conservé une nuit à -20°C. Le lendemain, les ARN sont une nouvelle fois rincés à l'éthanol 75% avant de passer par l'étape de solubilisation. Dans le cadre de cette étape, la solution d'éthanol présent dans les tubes à l'issue de ce nouveau rinçage est retirée à l'aide d'une P1000 et d'une P200. Les culots

d'ARN sont mis à sécher à l'air libre durant 5 minutes. Le fragile culot est ensuite délicatement repris dans 50  $\mu\text{L}$  d'eau ultra-pure milliQ autoclavée. La dissolution se fait lentement. Durant ces étapes de solubilisation, les microtubes sont placés dans de la glace. La concentration idéale des ARN est 1 ng/mL. Les échantillons obtenus seront quantifiés par spectrophotométrie et le volume d'eau ultra-pure milli-Q ajouté sera adapté aux concentrations mesurées.



**Figure 3-16 | Schéma récapitulatif du protocole d'extraction des ARN.** Les cellules sont lysées par le Trizol®. L'utilisation de chloroforme permet de séparer l'ARN des différents composés issus de la lyse cellulaire, les ARN messagers sont précipités à l'aide d'isopropanol puis rincés à l'aide d'éthanol avant d'être remis en suspension dans de l'eau stérile.

### 3.6.1.2 Quantification des échantillons

La quantification des échantillons d'ARN s'est fait par spectrophotométrie UV. La spectrophotométrie est une méthode de quantification reposant sur l'absorbance de certaines longueurs d'ondes par des molécules en solution. Les acides nucléiques (ADN & ARN) ont un pic d'absorbance dans l'UV. Due à la faible quantité d'ARN disponible, un spectrophotomètre adapté à la taille des échantillons a été utilisé, le Nano-Drop®.

#### 3.6.1.2.1 Principe de spectrophotométrie

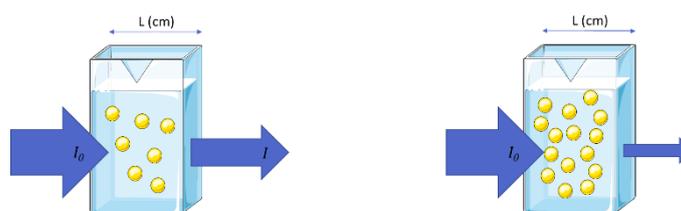
La spectrophotométrie repose sur le fait que lorsqu'une solution est traversée par une lumière d'intensité  $I_0$ , une partie de cette dernière est absorbée par les molécules en solution (**Figure 3-17**). La lumière ayant traversé la solution (appelée lumière transmise)  $I$  est donc inférieure à l'intensité lumineuse  $I_0$ . L'absorbance est donc la résultante du ratio  $I_0/I$ . Elle est donnée par la formule suivante :

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

Le principe de mesure utilisé par les spectrophotomètres repose sur la relation de Beer-Lambert. Cette relation stipule que pour une longueur d'onde donnée  $\lambda$ , l'absorption est proportionnelle à la concentration d'une solution et à la longueur du trajet optique. Cette relation est la suivante :

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda l c$$

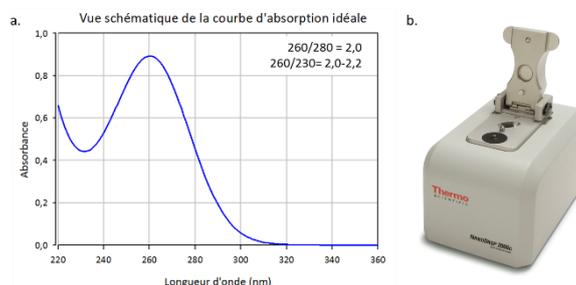
Avec  $A_\lambda$ , l'absorbance d'une molécule à une longueur d'onde donnée (sans unité),  $\varepsilon_\lambda$ , le coefficient d'extinction molaire de la molécule absorbante (en  $\text{m}^3/\text{mol}/\text{cm}$ ),  $l$  la longueur du trajet optique et finalement  $c$ , la concentration de la molécule en solution ( $\text{mol}/\text{m}^3$ ).



**Figure 3-17|Principe de spectrophotométrie.** La spectrophotométrie repose sur le fait que lorsqu'une solution est traversée par une lumière d'intensité  $I_0$ , une partie de cette dernière est absorbée par les molécules en solution ; la lumière transmise  $I$  est donc inférieure à l'intensité lumineuse  $I_0$ . L'absorbance est donc la résultante du ratio  $I_0/I$ . une longueur d'onde donnée  $\lambda$ , l'absorption est proportionnelle à la concentration d'une solution et à la longueur du trajet optique. Plus une solution est concentrée, plus l'absorption sera élevée. Adaptée de Servier Medical Art.

### 3.6.1.2.2 Utilisation du NanoDrop

La densité optique des ARN est mesurée à l'aide d'un NanoDrop (Thermo Fisher). Les acides nucléiques ont une absorbance maximale à 260 nm. La concentration est déterminée par spectrophotométrie d'une goutte de 1  $\mu\text{L}$  de solution. Le blanc a été réalisé à l'aide d'une goutte d'eau ultra-pure milli-Q stérilisée. Le support est au préalable nettoyé et désinfecté avec une solution d'éthanol à 75%. Les longueurs d'onde maximale des acides nucléiques et des protéines sont respectivement de 260 nm et 280 nm. Le ratio 260/280 permet de définir la pureté de la solution d'ARN. Lorsque ce ratio est proche de 1,8, la solution est une solution d'ADN pure. Dans le cas de solution d'ARN pure, ce ratio approche 2. Un autre ratio est également observé. Ce ratio 230/260 permet de mettre en évidence la présence d'autres contaminants (liés au processus d'extraction comme des restes de Triazol<sup>®</sup> ou d'éthanol). Un ratio compris entre 2 et 2,2 est signe de pureté de l'échantillon (**Figure 3-18**)



**Figure 3-18|Vue schématique de la courbe d'absorption idéale des acides nucléiques obtenue et réalisée à l'aide du NanoDrop.** L'absorption des acides nucléiques à un pic maximal pour la longueur d'onde 260 nm. Deux autres valeurs sont également observées à 280 nm (pic maximal d'absorption des protéines) et 230 nm (pic maximal des solvants utilisés dans l'extraction des ARN). Les ratios obtenus à partir de ces valeurs sont utilisés comme indice de pureté des échantillons (a.). Exemple de spectrophotomètre NanoDrop (Thermo Fisher) utilisé pour la quantification des échantillons (b.).

## 3.7 Xéno-transplantation

Par définition, une xéno-transplantation est la transplantation de cellules, tissus ou organe d'une espèce donnée dans une autre espèce. Le mot provient du grec *xenos* qui signifie étranger. La xéno-transplantation est à ne pas confondre avec l'allo-transplantation qui consiste en la transplantation entre individus d'une même espèce et l'iso-transplantation. Cette dernière consiste à une transplantation entre deux individus d'une même espèce ayant la même information génétique. La xéno-transplantation est méthode très utilisée dans le domaine de la recherche oncologique. Dans ce cas, des cellules cancéreuses humaines sont transplantées dans des souris immunodéprimées.

### 3.7.1 Modèle de souris utilisé

Des souris nues immunodéprimées NMRI (for Navy Medical Research Institut) ont été utilisées pour les expériences de xéno-transplantation de cellules cancéreuses. Ces souris NMRI proviennent d'un croisement ayant eu lieu en 1937 au NIH. Ce croisement effectué au sein d'un stock suisse (celui de Lynch) par Poiley avait pour nom d'origine NIH/PI comme nom avant d'être transféré au Etats-Unis dans les laboratoires du NMRI où il a acquis son nom final (Chia, Achilli et al. 2005).

Onze souris nues immunodéprimées NMRI femelles (Janvier Labs, France) âgées de 3 mois lors des transplantations ont été utilisées. Parmi elles, cinq souris ont été injectées avec les cellules SW480<sup>-/-</sup> contrôles et six avec les cellules SW480<sup>-/-</sup> sélectionnées selon le protocole expliqué précédemment (3.3). Ces souris ont hérité du surnom de souris nues (« *nude* » en anglais) de leur phénotype sans poils. La caractéristique la plus intéressante de ces souris n'est pas leur manque de poils mais l'absence de thymus due à une mutation homozygote récessive dans le gène *Foxn1*<sup>-/-</sup>.

Le thymus est un organe lymphoïde qui joue un rôle clé dans les réactions immunitaires. En effet, c'est dans le thymus que les cellules immunitaire T (T pour thymus) sont maturées. Cet absence de thymus mène à l'incapacité par la souris de monter des réponses immunitaires qui requièrent des lymphocytes T matures (tels que les lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> ou auxiliaires CD4<sup>+</sup>). Ces cellules sont impliquées dans la formation d'anticorps, l'immunité cellulaire, l'hypersensibilité retardée ainsi que les réactions d'élimination de cellules infectées par des virus ou des cellules cancéreuses. Les lymphocytes cytotoxiques CD8<sup>+</sup>, qui doivent leur nom à une glycoprotéine CD8<sup>+</sup> qu'ils expriment à leurs surfaces, sont aussi responsables des réactions de rejets de greffes. Cette absence de thymus rend ces souris immunodéprimées et fait de cette lignée un modèle murin adapté à la xéno-transplantation (aucun risque de rejet).



**Figure 3-19 | Différences entre une souris NMRI nu et son homologue non mutée.** La souris gauche est une souris ayant une mutation homozygote récessive du gène *Foxn1*<sup>-/-</sup>. La souris albinos située à droite est son homologue mutant hétérozygote *Foxn1*<sup>+/-</sup> ou son homologue sauvage. En effet, seules les souris ayant subi une mutation dans les deux allèles du gène présentent ce phénotype. Les souris NMRI nues sont obtenues par croisement entre un mâle homozygote et une femelle hétérozygote pour le gène *Foxn1*. L'utilisation de mâles homozygotes plutôt que de femelles homozygotes s'explique par le fait que ces dernières sont incapables d'allaiter leurs petits.

Les souris utilisées doivent être identifiées afin de garantir un suivi optimal. De nombreuses méthodes d'identification existent parmi lesquelles l'identification temporaire, la perforation du lobe d'oreille, l'utilisation de micro-puces, le tatouage ou l'utilisation d'étiquettes fixées au lobe d'oreille. Le marquage temporaire dure seulement quelques jours et n'est donc pas adapté à l'expérience réalisée. En effet, le suivi des souris se fait sur plusieurs mois. L'utilisation d'une micro-puce d'identification nécessite une anesthésie de l'animal qui subit alors un stress supplémentaire. Les marquages par étiquetage ou perforation au niveau du lobe de l'oreille peuvent être source d'infection. En finalité, le tatouage de points au niveau de la

queue était la méthode d'identification la plus adaptée. Les souris utilisées pour ces transplantations ont entre un et six points tatoués sur le milieu de leur queue.

### 3.7.2 Préparation des échantillons

Les cellules sélectionnées et les cellules « contrôles » sontensemencées sur des lamelles de verres nettoyées et stérilisées placées au fond de plaques de 12 puits. Chacun de ces puits contient 1mL de milieu RPMI1640 complet. Le milieu de culture est délicatement retiré à l'aide d'une pompe à aspiration. Les lamelles sont ensuite rincées à l'aide de PBS 1x stérile. Avant de laisser incuber les plaques durant 15 min à 37°C et sous atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>, un volume de 150 µL de trypsine-EDTA est déposé dans chaque puits. Afin de neutraliser l'effet clivant de la trypsine, un volume de 850 µL de milieu RPMI 1640 complet est ajouté dans chaque puits. Les cellules sont remises en suspension à l'aide d'une micropipette de 1 000 µL avant d'être rassembler dans un tube Falcon® de 15 ml. Une fois la solution homogénéisée, un volume de 20 µL est utilisé pour l'étape de comptage. Ce volume est alors placé dans une cellule de Neubauer. Une fois, la concentration cellulaire déterminée, la solution est centrifugée à 1200 rpm durant 5 minutes. Le surnageant est ensuite retiré avec précaution afin de pas décrocher le culot. Le culot est ensuite remis en suspension dans un volume de milieu RPMI 1640 complet permettant d'obtenir une concentration finale de 20.10<sup>6</sup> cellules SW480<sup>-/-</sup> par millilitre. Cette étape de re-suspension est primordiale. En effet, les cellules doivent être le plus isolées possible afin d'être injectées à la souris. Le matériel obtenu (cellules en solution) est alors transféré dans un tube plus large afin de faciliter l'accès de la seringue au fond du tube.

### 3.7.3 Procédure d'injection intraveineuse dans la queue de la souris

De nombreuses voies d'injections de cellules cancéreuses sont possibles chez la souris comme l'injection intramusculaire, intrapéritonéale, intraveineuse ou sous-cutanée. Le but de cette expérience étant de mimer le processus de dissémination métastatique dans la souris et d'observer les différences d'agressivité et d'organotropisme entre les cellules SW480<sup>-/-</sup> d'origine et sélectionnées sur substrats mous, l'injection intraveineuse est le mode d'injection le plus proche de ce processus. Les cellules seront alors directement injectées dans la voie sanguine.

Avant l'injection par intraveineuse, les souris sont légèrement réchauffées sous une lampe à chauffer puis place dans un appareil de contention. Pour cela, la souris doit être manipulée avec les deux mains, maintenue au niveau de la nuque. De nombreux appareil de contention existent. Dans certains cas, ces appareils nécessitent que la tête de l'animal soit présentée en premier au niveau de l'orifice d'entrée de l'appareil, dans d'autres, c'est la queue. Ce dernier type d'appareil est particulièrement conseillé dans le cadre d'injection dans la veine de la queue de l'animal. La souris est alors attrapée par la base de la queue puis glissée dans l'appareil en guidant la queue dans la fente. L'appareil doit ensuite être sécurisé afin que la souris ne tente pas de s'enfuir.

Une fois l'animal sécurisé et immobilisé, sa queue est stabilisée entre le pouce et l'index de la main qui ne manipule pas la seringue. La queue est désinfectée avec une solution d'éthanol à 70% afin d'éviter tout risques d'infection. Le matériel obtenu lors de la préparation des échantillons (la solution de cellules à 20.10<sup>6</sup> cellules/mL) est ensuite prélevé à l'aide d'une seringue et d'une aiguille stérile. L'injection se fait dans la partie légèrement distale de la queue. Afin de procéder de manière correcte à l'injection, l'aiguille est présentée biseau vers le haut parallèlement à la veine. L'aiguille est ensuite insérée d'au moins 3 mm dans la veine de la queue. Le matériel est injecté doucement d'un mouvement fluide. Un volume de 50 µL

de solution est injecté par souris. Une fois l'injection terminée, la souris est libérée et replacée dans son groupe.

### 3.7.4 Procédure de suivi des souris

Le jour suivant la transplantation de cellules cancéreuses humaines, un premier suivi est effectué afin de voir si les souris ont bien supporté l'injection et qu'aucune n'est décédée. Dans de très rare cas, une bulle d'air peut être injectée provoquant un arrêt cardiaque. La pesée initiale des animaux a également lieu à ce moment-là. Afin de peser les souris, un récipient contenant des copeaux de bois est préparé et placé sur la balance puis la tare est réalisée. La souris est alors saisie par la base de la queue et est transféré de sa cage au récipient. Une fois la souris pesée, elle est transférée de la même façon à sa cage. D'autres éléments relevant de son comportement sont relevés comme son dynamisme, si elle reste prostrée dans un coin, etc.

Le suivi des souris se fait par une pesée hebdomadaire et un contrôle du comportement. Un changement de ces paramètres peut se faire de manière soudaine ou lente.

# Chapitre 4 Influence de la rigidité du substrat sur l'organisation de la chromatine

La chromatine est une structure du noyau composée de nucléosomes : des acides désoxyribonucléiques entourés autour d'octamères d'histones et de protéines associées. Cette organisation permet de compacter près de 2 mètres d'information génétique dans un noyau de 10 à 20  $\mu\text{m}$  (Dahl, Ribeiro et al. 2008). Si l'ensemble des cellules (à l'exception des cellules germinales) ont le même matériel génétique, les cellules répondent à leur environnement de différentes manières, en régulant l'expression de leurs gènes. Cette régulation passe entre autres par la plasticité de la chromatine. Ainsi des cellules souches pluripotentes auront une grande majorité de leur noyau occupé par de l'euchromatine, tandis que les cellules différenciées voient leur pourcentage d'hétérochromatine augmenter (Meshorer and Misteli 2006, Van Steensel 2011). L'influence de la rigidité du substrat sur l'organisation de la chromatine est une question encore inexplorée à ce jour.

## 4.1 Introduction

Les biomatériaux ont beaucoup évolué au cours de ces 30 dernières années, donnant naissance à des matériaux intelligents mimant l'environnement cellulaire afin d'induire une réponse contrôlée de l'organisme (Holzapfel, Reichert et al. 2013, Ratner, Hoffman et al. 2013). Durant de nombreuses années, les études se sont principalement concentrées au niveau de la chimie de cet environnement avec l'intégration de ligands de type RGD à la surface des biomatériaux pour faciliter l'adhésion cellulaire et donc à terme l'intégration de l'implant (Hersel, Dahmen et al. 2003, Barker 2011, Bellis 2011). En 1997, Pelham et Wang révolutionnent les connaissances que nous avons à l'aide de travaux pionniers montrant que des paramètres mécaniques étaient également capables d'induire une réponse contrôlée de la cellule (Pelham and Wang 1997, Discher, Janmey et al. 2005). De nombreuses études sont alors réalisées sur l'influence de la rigidité et de la topographie de l'environnement cellulaire sur le comportement cellulaire : la mécano-biologie naissait (Iskratsch, Wolfenson et al. 2014). La mécano-biologie est un domaine pluridisciplinaire reposant sur l'étude du comportement cellulaire en réponse aux signaux mécaniques du substrat et notamment la rigidité de ce dernier (Jansen, Donato et al. 2015). Très vite d'autres études ont été réalisées afin de définir comment les cellules étaient capables de sentir ces signaux (mécano-sensation) et de les traduire en signaux chimiques compréhensibles pour la cellule (mécano-transduction). Si de nombreuses études se sont concentrées sur l'influence du substrat sur l'organisation des complexes d'adhérences focales (Pelham and Wang 1997, Engler, Bacakova et al. 2004, Discher, Janmey et al. 2005, Levental, Georges et al. 2007, Wells 2008), l'influence de la rigidité du substrat sur la chromatine reste largement inconnue.

Les cellules sont capables de sonder leur environnement par un mécanisme de mécano-sensation en appliquant une force au niveau de leur environnement (Geiger, Spatz et al. 2009, Jansen, Donato et al. 2015). Cette force générée par le cytosquelette d'actinomyosine va activer des récepteurs transmembranaires, les intégrines qui font le lien entre l'intérieur de la cellule et son environnement. Ces intégrines, en transmettant la force générée par le cytosquelette d'actinomyosine à la matrice extracellulaire, vont sentir en ré-

ponse, une force de retour de l'environnement cellulaire (Hynes 2002, Miranti and Brugge 2002). Cette force de résistance peut être un signal mécanique capable d'induire de nombreuses réponses cellulaires comme l'adhérence, la migration ou encore la différenciation (Lo, Wang et al. 2000, Engler, Sen et al. 2006, Wells 2008). Cette force est ensuite transmise aux complexes d'adhérences focales où elle va être traduite en signal biochimique dans la cellule via un processus de mécano-transduction. Ce processus de mécano-transduction peut également se faire au niveau du noyau, dans ce cas, le signal mécanique est transmis sous la forme d'onde de stress qui se propage le long du cytosquelette d'actine jusqu'au noyau où il influence directement l'activité nucléaire dirigeant la mécano-réponse.

Le cytosquelette est composé de 3 grandes familles de protéines : les filaments d'actines, les filaments intermédiaires et les microtubules. Ce cytosquelette très dynamique est responsable du maintien de la morphologie cellulaire, de la résistance de la cellule aux forces de compression extérieures, de l'organisation des organites à l'intérieur de la cellule ou encore de la migration cellulaire (Bausch and Kroy 2006, Fletcher and Mullins 2010, Block, Schroeder et al. 2015). Le cytosquelette forme également un lien physique entre les contacts focaux et le plus grand organite cellulaire, le noyau. Le noyau est connecté au cytosquelette grâce à un complexe protéique : le complexe LINC, qui lie le cytosquelette au nucléosquelette. Ce nucléosquelette, également appelé lamina nucléaire, est principalement composé de lamines de type-A et de type-B. Ces lamines sont liées à la chromatine et à des facteurs de transcription. Leur déformation est donc capable d'induire des changements de conformation de la chromatine au sein du noyau, ce qui par la suite influencera la régulation de l'expression des gènes. En effet, la chromatine existe en interphase dans le noyau sous deux formes, hétérochromatine et euchromatine (Olins and Olins 2003, Dahl, Ribeiro et al. 2008). L'hétérochromatine est une forme condensée dans laquelle la machinerie transcriptionnelle n'a pas accès à l'ADN ; elle est donc transcriptionnellement inactive. L'euchromatine, quant à elle, est une forme décondensée de la chromatine, transcriptionnellement active.

L'un des premiers objectifs de ce projet a été d'identifier l'influence de la rigidité du substrat et plus particulièrement l'influence d'hydrogels extrêmement mous (fortement hydratés) sur la plasticité de la chromatine. Dans un second temps, nous avons essayé d'influencer le destin cellulaire en jouant artificiellement sur la structure de la chromatine (euchromatine). Afin de maintenir artificiellement la chromatine des cellules sous forme décondensée, un inhibiteur a été utilisé. La plasticité de la chromatine, c'est-à-dire le passage de la forme hétérochromatine à la forme euchromatine, est régulée par divers mécanismes parmi lesquels un mécanisme d'acétylation. Le passage de la forme euchromatine vers la forme hétérochromatine est régulé par des enzymes, les histones désacétylases. La trichostatine A permet d'inhiber l'activité de certaines de ces enzymes (HDAC de classe I et II) en bloquant leur site actif. Dans cette régulation, le rôle du cytosquelette et plus particulièrement des filaments intermédiaires a également fait l'objet d'une étude plus poussée.

## 4.2 Article



Contents lists available at ScienceDirect

Biomaterials

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biomaterials](http://www.elsevier.com/locate/biomaterials)

## Cell guidance into quiescent state through chromatin remodeling induced by elastic modulus of substrate



Morgane Rabineau<sup>a, b, d</sup>, Florence Flick<sup>a, b, d</sup>, Eric Mathieu<sup>a, b, d</sup>, Annie Tu<sup>a, b, d</sup>, Bernard Senger<sup>a, b, d</sup>, Jean-Claude Voegel<sup>a, b, d</sup>, Philippe Lavalle<sup>a, b, d</sup>, Pierre Schaaf<sup>a, b, d</sup>, Jean-Noël Freund<sup>c, d</sup>, Youssef Haikel<sup>a, b, d</sup>, Dominique Vautier<sup>a, b, d, \*</sup>

<sup>a</sup> INSERM UMR 1121, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg, France

<sup>b</sup> Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, 8 rue Sainte-Elisabeth, 67000 Strasbourg, France

<sup>c</sup> INSERM UMR S1113, Université de Strasbourg, 3 Avenue Molière, 67200 Strasbourg, France

<sup>d</sup> Fédération de Médecine Translationnelle, Strasbourg, France

### ARTICLE INFO

Article history:  
Received 29 July 2014  
Accepted 2 October 2014  
Available online 29 October 2014

Keywords:  
Polyelectrolyte multilayer films  
Substrate stiffness  
Biomaterials  
Nucleus  
Chromatin plasticity  
Histone deacetylase inhibition

### ABSTRACT

Substrate stiffness is known to strongly influence the fate of adhering cells. Yet, little is known about the influence of the substrate stiffness on chromatin. Chromatin integrates a multitude of biochemical signals interpreted by activation or gene silencing. Here we investigate for the first time the organization of chromatin of epithelial cells on substrate with various mechanical properties. On stiff substrates (100–200 kPa), where cells preferentially adhere, chromatin is mainly found in its euchromatin form. Decreasing the Young modulus to 50 kPa is correlated with a partial shift from euchromatin to heterochromatin. On very soft substrates ( $\ll 10$  kPa) this is accompanied by cell lysis. On these very soft substrates, histone deacetylase inhibition by adding a drug preserves acetylated histone and thus maintains the euchromatin form, thereby keeping intact the nuclear envelope as well as a residual intermediate filament network around the nucleus. This allows cells to survive in a non-adherent state without undergoing proliferation. When transfer on a stiff substrate these cells retain their capacity to adhere, to spread and to enter a novel mitotic cycle. A similar effect is observed on soft substrates (50 kPa) without need of histone deacetylase inhibition. These new results suggest that on soft substrates cells might enter in a quiescence state. Cell quiescence may thus be triggered by the Young modulus of a substrate, a major result for strategies focusing on the design of scaffold in tissue engineering.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Engineered materials are essential to develop soft tissue scaffolds used in regenerative therapies. However, strategies to enhance survival of cells within these scaffolds remain a significant challenge. Cells of multicellular organisms respond to biochemical and mechanical environmental signals in variable ways, realizing physical events like adhesion, migration, contraction and protrusion with great adaptability. To achieve these dynamic processes, extra- and intracellular forces are transmitted across the cytoskeleton to the nucleus. These forces can activate integrins at focal adhesions linked to actin filaments, themselves connected to

microtubules and to intermediate filaments (IFs). The LINC complex (linker of nucleoskeleton and cytoskeleton), which enables force transmission across the nuclear envelope, connects cytoskeletal filaments to the nucleus where lamins form an extended part of the LINC complex [1–6]. These forces ultimately propagate to chromatin that represents a site of signal integration and interpretation for genes expression [7,8]. Further, recent works suggested that the nucleus itself may act as a cellular mechanosensor bypassing diffusion-based mechano-signaling through the cytoplasm [4,9]. Thereby, Swift et al. revealed that the nuclear lamina functions as a nuclear force sensor [10]. Importantly, mutations in nuclei-associated proteins result in a large number of diseases [11,12].

Two well-defined cytological compartments are considered in the nucleus: the condensed, inactive heterochromatin and the extended, active euchromatin. Heterochromatin is restricted to an irregular rim located at the nuclear periphery and around the nucleolus as well as in patches throughout the nucleoplasm,

\* Corresponding author. INSERM UMR 1121, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg, France.

E-mail address: [Vautier@unistra.fr](mailto:Vautier@unistra.fr) (D. Vautier).

whereas euchromatin fills up the majority of the nucleus. The opposing actions of histone acetyl transferases and histone deacetylases (HDACs) dynamically control the acetylation status of chromatin and hence chromatin compaction [13,14], by respectively loosening (euchromatin) or condensing chromatin structures (heterochromatin). Chromatin organization has a strong influence on the expression of the genome [15] and chromatin remodeling contributes to many cellular properties as for instance cell pluripotency and cell differentiation [16], as well as to the deformation of the nucleus [17–21].

While mechanotransduction processes by which cells sense substrate stiffness was extensively studied on mechanosensitive proteins at focal adhesions and inside the cytoskeleton [22–25], little is known about how chromatin plasticity is influenced in response to changes of substrate elasticity. Our group previously studied the behavior of marsupial kidney epithelial (PtK2) cells deposited on polyelectrolyte multilayers (PEMs) [26,27] made of poly(L-lysine)/hyaluronic acid (PLL/HA)<sub>24</sub> stratum capped with a poly(sodium styrene sulfonate)/poly(allylamine hydrochloride) (PSS/PAH)<sub>n</sub> multilayer film as substrate models mimicking the extracellular matrices elasticity of biological tissues [28–30]. In this model, the rigidity of the film decreases by reducing the number *n* of PSS/PAH layer pairs (Fig. S1). We evidenced that soft substrates with a Young's modulus *E* of about 50 kPa prevented the formation of focal contacts and actin stress fibers and subsequently the activation of DNA replication whereas genes transcription was preserved. In contrast, rigid substrates with Young's modulus of 200 kPa allowed the formation of focal contacts and stress fibers necessary for DNA replication [29].

In the present manuscript, we investigate the impact of substrate elasticity on nuclear components, which led us to demonstrate that the remodeling between euchromatin and heterochromatin, together with the nuclear envelope connected to IF network, are major determinants of the response of epithelial cells to external mechanical signals.

2. Experimental

2.1. Notations

We shall use the short-hand notations *E*<sub>0</sub>, *E*<sub>20</sub> and *E*<sub>50</sub> and *E*<sub>200</sub> for the (PLL/HA)<sub>24</sub>, (PLL/HA)<sub>24</sub>–(PSS/PAH)<sub>n</sub> films with *n* = 0, 1, 2, and 5 respectively (see Fig. S1). *E*<sub>0</sub> and *E*<sub>20</sub> are considered as very soft substrates, *E*<sub>50</sub> is a soft substrate and *E*<sub>200</sub> is considered as stiff substrate. The tiny letter in figures refers timing and conditions of the experiments schematized in Table 1.

2.2. Materials and fabrication of PEM

PLL (MW = 5.7 × 10<sup>4</sup> Da, Sigma, St. Quentin Fallavier, France) and HA (MW = 4.0 × 10<sup>5</sup> Da, Biolberica, Barcelona, Spain) were used for buildup (PLL/HA)<sub>24</sub> films, and PSS (MW = 7.0 × 10<sup>4</sup> Da, Sigma) and PAH (MW = 7.0 × 10<sup>4</sup> Da, Sigma) for (PSS/PAH)<sub>n</sub> capping films (*n* corresponds to the number of layer pairs), which were deposited on top of (PLL/HA)<sub>24</sub> strata. PLL, HA, PSS, and PAH were dissolved at 1 mg/ml in a buffer solution containing 150 mM NaCl and 20 mM of tris(hydroxymethyl)-aminomethane (TRIS) at pH 7.4, and all rinsing steps were performed in the same buffer. (PLL/HA)<sub>24</sub> strata and (PSS/PAH)<sub>n</sub> capping films were prepared using a dipping machine (Dipping Robot DR3, Riegler & Kirstein GmbH, Berlin, Germany), on glass slides (VWR Scientific, Fontenay sous Bois, France). The rigidity of the (PLL/HA)<sub>24</sub>–(PSS/PAH)<sub>n</sub> film increases with the number of deposited PSS/PAH layer pairs (Fig. S1) [26].

2.3. Apoptotic, necrotic, healthy cells assay

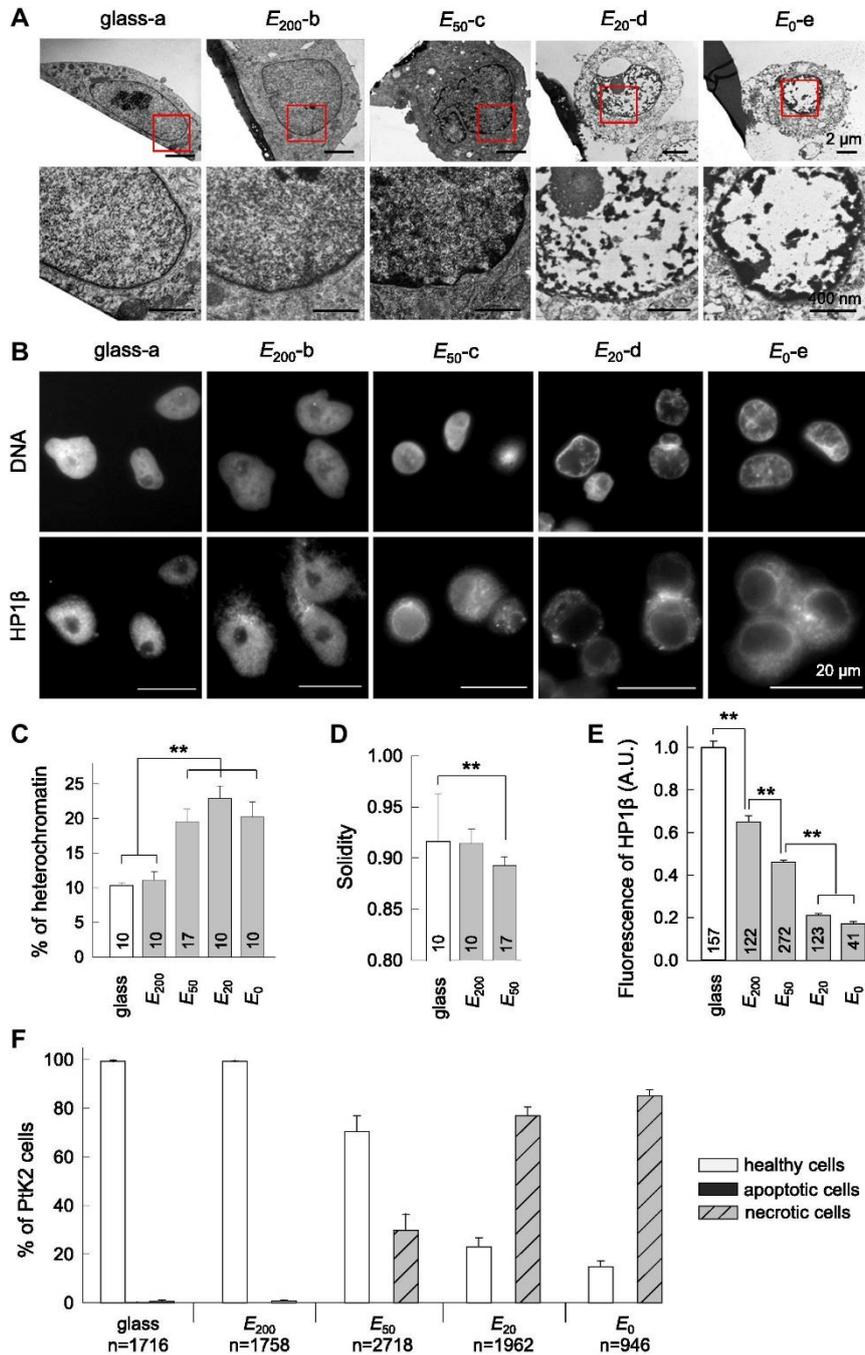
Cells were seeded on surfaces at 1 · 10<sup>5</sup> per cm<sup>2</sup>. Apoptotic, necrotic and healthy cells were carried out using the apoptotic/necrotic/healthy cells detection Kit (PromoKine) according to the manufacturer's instructions. Cells were observed by fluorescence microscopy (see Section 2.5) and analyzed by ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Briefly, using ImageJ, the 3 channels blue, green and red corresponding respectively to the labeled cells with Hoechst 33342 (blue only, DNA), Annexin V-FITC (apoptotic cells) and EthD-III (necrotic cells) were superimposed. Quantification of positive cells in these different signals was done using the ImageJ plugin "Cell Counter".

2.4. Cell culture

PtK2 cells (CCL-56, LGC Standards, United Kingdom) were grown in Eagle's minimum essential medium (EMEM, LGC Standards) supplemented with 100 µg mL<sup>-1</sup> penicillin, 100 µg mL<sup>-1</sup> streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA), and 10% fetal bovine serum (Invitrogen) maintained at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. For histone deacetylase activity (HDAC), transcriptional activity and vimentin inhibitor treatments, cells were cultured respectively with 50 nM trichostatin A (TSA, Sigma), with

Table 1  
Conditions and timing of the experiments.

Notation	Conditions and timing of the experiments	Notation	Conditions and timing of the experiments
glass-a	0 5 └──┬──┘ (h) glass	<i>E</i> <sub>20</sub> + TSA-i	0 24 0 +TSA 5 └──┬──┘ (h) → └──┬──┘ (h) glass <i>E</i> <sub>20</sub>
<i>E</i> <sub>200</sub> -b	0 5 └──┬──┘ (h) <i>E</i> <sub>200</sub>	<i>E</i> <sub>0</sub> + TSA-j	0 24 0 +TSA 5 └──┬──┘ (h) → └──┬──┘ (h) glass <i>E</i> <sub>0</sub>
<i>E</i> <sub>50</sub> -c	0 5 └──┬──┘ (h) <i>E</i> <sub>50</sub>	<i>E</i> <sub>0</sub> + TSA-k	0 +TSA 24 0 +TSA 24 └──┬──┘ (h) → └──┬──┘ (h) glass <i>E</i> <sub>0</sub>
<i>E</i> <sub>20</sub> -d	0 5 └──┬──┘ (h) <i>E</i> <sub>20</sub>	glass + AMA-l	0 +AMA 24 0 +AMA 5 └──┬──┘ (h) → └──┬──┘ (h) glass glass
<i>E</i> <sub>0</sub> -e	0 5 └──┬──┘ (h) <i>E</i> <sub>0</sub>	<i>E</i> <sub>0</sub> + TSA + AMA-m	0 +TSA +AMA 24 0 +TSA +AMA 5 └──┬──┘ (h) → └──┬──┘ (h) glass <i>E</i> <sub>0</sub>
<i>E</i> <sub>50</sub> -f	0 24 └──┬──┘ (h) <i>E</i> <sub>50</sub>	<i>E</i> <sub>0</sub> + TSA + IDPN-n	0 +TSA 24 0 +TSA 5 └──┬──┘ (h) → └──┬──┘ (h) glass <i>E</i> <sub>0</sub>
<i>E</i> <sub>20</sub> + TSA-g	0 +TSA 24 0 +TSA 5 └──┬──┘ (h) → └──┬──┘ (h) glass <i>E</i> <sub>20</sub>	glass + IDPN-o	0 +IDPN 5 └──┬──┘ (h) glass
<i>E</i> <sub>0</sub> + TSA-h	0 +TSA 24 0 +TSA 5 └──┬──┘ (h) → └──┬──┘ (h) glass <i>E</i> <sub>0</sub>		



**Fig. 1.** Ultrastructure of PtK2 cells and HP1 $\beta$  in regard to substrate elasticity. A) Representative images of cells after 5 h of culture on glass, on  $E_{200}$ , on  $E_{50}$ , on  $E_{20}$  and on  $E_0$ . Bottom: enlargement of the area delimited by a square showing nuclear ultrastructure. B) Cells cultured 5 h on glass, on  $E_{200}$ , on  $E_{50}$ , on  $E_{20}$  and on  $E_0$  with anti-HP1 $\beta$  and counterstained with Hoechst 33258 for DNA. C) Percentage of heterochromatin on the nuclear surface of PtK2 cells from A on two pooled independent experiments. The ANOVA–Dunn’s test shows that the percentages of heterochromatin on glass and on  $E_{200}$  are significantly smaller than that on  $E_{50}$ , on  $E_{20}$  and on  $E_0$  ( $p < 0.05$ ). D) Nuclear solidity of PtK2 cells from A. The ANOVA–Dunn’s test shows that the solidity on  $E_{50}$  is significantly smaller than that on glass ( $p < 0.05$ ). E) Fluorescence intensity for nuclear HP1 $\beta$  signal using ImageJ (an arbitrary

100 µg/mL  $\alpha$ -amanitin (AMA, Sigma) and with 165 mM iminodipropionitrile (IDPN, Sigma).

### 2.5. Immunofluorescence microscopy

Cells were seeded on surfaces at  $1 \cdot 10^5$  per  $\text{cm}^2$ . Cells were fixed/permeabilized in 3.7% (w/v) paraformaldehyde (PFA) in  $1 \times$  PBS containing 0.1% Triton X-100 for 15 min and blocked with 10% decomplexed FBS (Invitrogen). Cells were incubated with anti-heterochromatin protein 1  $\beta$  (HP1 $\beta$ ) (dilution 1:50, Abcam) followed by rhodamin-conjugated secondary antibody (dilution 1:500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), or with anti-heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1) (dilution 1:100, Abcam) followed by Fluor 488-conjugated secondary antibody (dilution 1:500, Invitrogen), or with anti-acetyl Histone H3 (H3K14) (dilution 1:25, Millipore) followed by fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated secondary antibody (dilution 1:500, Santa Cruz), or with anti-vimentin V9 (dilution 1:100, Santa Cruz) followed by Fluor 488-conjugated secondary antibody (dilution 1:500, Invitrogen), or with anti-lamin B (dilution 1:50, Spring Biosciences) followed by FITC-conjugated secondary antibody (dilution 1:500, Santa Cruz). DNA was revealed with Hoechst 33258 ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Sigma) and actin staining with tetramethylrhodamine (TRITC)-phalloidin ( $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Sigma). Samples were mounted in VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Fluorescence images were captured using Nikon Eclipse TE200 with  $63 \times$  PL APO (1.4 NA) objective equipped with Nikon Digital Camera (DS-Q11MC with NIS-Elements software) and processed with ImageJ. The cross-sectional area of the nucleus was measured in the median focus plane of the nuclei. Simultaneously, the fluorescence intensity in this plane, corresponding to the protein analyzed, was recorded. This measurement provides a fluorescence intensity per unit area of the nucleus and represent a qualitative indication of the protein level in the nucleus. Decision whether cells have nucleus with extended or condensed chromatin was based on observation of cells labeled with Hoechst 33258 by fluorescence microscopy. No intermediate state between extended or condensed chromatin was observed in our analyses.

### 2.6. Electron microscopy

Cells seeded at  $1 \cdot 10^5$  per  $\text{cm}^2$  and cultured 5 h from the samples, were fixed in 2% PFA-2% glutaraldehyde in 50 mM cacodylate buffer at pH 7.4 for 2 h. Cells were fixed in 1% osmium tetroxide in 125 mM cacodylate for 30 min. Samples were dehydrated in solutions with gradually increasing concentration of ethanol content (50, 70, 95, and 100% three times) for 15 min each. Cells in contact with polyelectrolyte multilayers films after 5 h of culture were included in epoxy resin (48.2% epon 812, 34% anhydride nadic methyl, 16.4% anhydride [2-dodeceny] succinic, and 1.5% 2,4,6-tris dimethylaminoethyl phenol) for 48 h at  $60^\circ\text{C}$ . After resin polymerization, in order to be able to cut them, a heat shock was first performed to remove glass coverslips. To obtain transversal sections of cells, the cutting surface was reoriented with preparing small block using circular saw (Bronwill Scientific, USA) and sticks them on new ones. Ultra-thin cross sections (100 nm) were performed using an automatic ultramicrotome (UltraCut-E Ultramicrotome, Reichert Jung, USA). Sections containing the median plane of the nucleus with the nucleolus were selected for observations. Sections were stained by 5% uranyl acetate for 20 min and stained by 4% lead citrate. The specimen was observed with a transmission electron microscope EM208 (FEI Company, Philips, Netherlands) operating with an accelerating voltage of 70 kV. Images were captured on argentic SO163 Kodak films.

### 2.7. Time-lapse video microscopy

We acquired time-lapse images of cells with three different microscopes. To image cells on  $E_0$  and  $E_0$  + TSA (Fig. 2C), cells were replated at  $1 \cdot 10^4$  per  $\text{cm}^2$  on film-coated coverslips and mounted in a Ludin Chamber (Life Imaging Services, Basel, Switzerland) at  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , on a Leica DMIRE2 microscope equipped with a  $40 \times$  HXC PL APO PH2 (0.75 NA) objective and a Leica DC350FX CCD camera was used with Leica FW4000 software. To prevent evaporation, a layer of mineral oil (Sigma) was added on top of the media prior imaging. Images were acquired every 10 min for 2 h30 by phase contrast. To image cells on glass after transfer of  $E_{50}$  5 h, of  $E_{50}$  24 h, of  $E_0$  + TSA 5 h, of  $E_0$  + TSA 24 h, of  $E_0$  + TSA + AMA 5 h and of glass 24 h (Fig. 4), cells were deposited in  $\mu$ -Dish 35 mm glass bottom (Ibidi, Germany) at  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . After 1 h of culture of cells, we start the time-lapse sequence during 23 h on a Leica DMIRE2 microscope equipped with a  $20 \times$  N PL L PH1 (0.40 NA) objective and a Photometrics CoolSNAP HQ camera was used with Molecular Devices MetaMorph software (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA). Images were acquired every 10 min for 23 h by phase contrast. To image cells on glass after transfer of  $E_0$  + TSA 5 h (Fig. 4), cells were deposited in  $\mu$ -Dish 35 mm glass bottom (Ibidi) at

$37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . After 24 h of culture of cells, we start the time-lapse sequence during 24 h on a Nikon TIE microscope equipped with a  $40 \times$  PL DL PH2 (0.65 NA) objective and an Andor Zyla sCMOS camera was used with Nikon NIS-Elements Ar software. Images were acquired every 10 min for 24 h by phase contrast. Images were processed with Molecular Devices MetaMorph and ImageJ. The number of dividing cells was quantified throughout the whole time of the time-lapse experiments.

### 2.8. Morphological analysis

ImageJ was used to analyze the proportion of heterochromatin on the nuclear surface of electron microscopy images. Between 10 and 20 cell nuclei were analyzed for each data set. To determine the proportion of heterochromatin on the nuclear surface, we used stereological method. After to have delimited the nuclear compartment and having calculated this surface in pixel, the area of the heterochromatin surface was determined by applying an intensity threshold on filtered images by Gaussian blur of a radius 2. For to obtain the percentage of the heterochromatin on the nuclear surface, we have reported the area heterochromatin at the total nuclear surface (Fig. S2). Solidity provides a sense of the irregularity of the object and was defined in equation (1).

$$\text{Solidity} = \text{area/convex area} \quad (1)$$

Statistical comparison of the proportion of heterochromatin on the nuclear surface and solidity were determined by one way ANOVA test with Dunn's method correction for multiple comparisons.

### 2.9. Statistical analysis

Statistical significance between experimental groups for fluorescence intensity of immunolabeling was determined by one way ANOVA test with Dunn's method correction for multiple comparisons. A value of  $p < 0.05$  was considered to be statistically significant. Fisher's exact test was used to compare percentage nuclei with extended chromatin versus nuclei with condensed chromatin. A value of  $p < 0.01$  was considered to be statistically significant.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Soft substrates regulate heterochromatin remodeling

PEM films were used to investigate if the mechanical properties of the substrate might play a role in chromatin plasticity of epithelial Ptk2 cells. To determine whether chromatin remodeling was affected by the film stiffness, observation by electron microscopy was made on cells cultured during 5 h on substrates of different stiffnesses. On glass, cells spread and displayed euchromatin uniformly distributed within the nucleus (Fig. 1A), with a thin layer of heterochromatin at the nuclear periphery. Quantification indicated that the nuclei contained  $10.3\% \pm 0.4$  of heterochromatin (Fig. 1C). When cells cultured on glass were transferred on the stiff substratum  $E_{200}$  for 5 h, although they spread less than on glass, they displayed a similar organization of chromatin in their nuclei, with euchromatin homogeneously localized and a thin layer of peripheral heterochromatin representing  $11.1\% \pm 1.2$  of the chromatin, like in cells cultured on glass (Fig. 1A and C). Fluorescent apoptotic-necrotic-healthy assays showed that  $99.2\% \pm 0.6$  and  $98.1\% \pm 0.4$  of cells were healthy respectively on glass and on  $E_{200}$  (Fig. 1F and Fig. S3). Strikingly, unlike cells on rigid substrates, the cell shape and nuclear organization were strongly impaired by decreasing substrate stiffness. Indeed, cells transferred on  $E_{50}$ , adopted a round shaped morphology and showed a larger mass of perinuclear heterochromatin rising to about  $19.5\% \pm 1.8$  (Fig. 1A and C). About  $29.7\% \pm 6.7$  of cells on  $E_{50}$  were positive in etidium-homodimer III (EthD-III) necrotic signal but negative in annexin V – dependent phosphatidylserine (PS) signal, showing that these cells were in necrotic state (Fig. 1F and Fig. S3). Decreasing further the stiffness on very soft substrates,  $E_{20}$  and  $E_0$ , led the cells to go

value of 1 was attributed to cells on glass) on three pooled independent experiments. The ANOVA–Dunn's test shows that the fluorescence signal of HP1 $\beta$  on glass is significantly different from that on  $E_{200}$ , the fluorescence on  $E_{50}$  is significantly smaller than that on  $E_{200}$ , and the fluorescence of HP1 $\beta$  on  $E_{20}$  and on  $E_0$  are significantly smaller than that on  $E_{50}$  ( $p < 0.05$ ). C–E Numbers at the bottom of bar graphs are counts of cells used in analysis and the error bars represent the s.e.m. F) Cells after 5 h of culture on various surfaces analyzed with the apoptotic/necrotic/healthy cells detection kit (PromoKine),  $n$  at the bottom of bar graphs = numbers of cells used in analysis. Results from two independent experiments (the error bars represent the s.e.m.).

through a lytic process as indicated ultrastructurally by the progressive release of cytoplasmic and nuclear material in the culture medium (Fig. 1A). These dead cells exhibited aggregated dark material at the periphery and also within their nucleus (Fig. 1A), labeled by Hoechst (Fig. 1B) and thus corresponding to condensed heterochromatin, whereas euchromatin was released from the nucleus. The graph (Fig. 1C) shows that the percentage of heterochromatin at the periphery of the nucleus was significantly higher on  $E_{50}$ ,  $E_{20}$  ( $24.8\% \pm 2.2$ ) and  $E_0$  ( $20.2\% \pm 2.2$ ) compared to  $E_{200}$  and glass substrates. On  $E_{20}$  and  $E_0$ , respectively  $77\% \pm 3.7$  and  $85.2\% \pm 2.4$  were positive for EthD-III signal (Fig. 1F and Fig. S3) confirming that these cells died by necrosis. These results suggested that on  $E_{20}$  and  $E_0$  cell rounding, chromatin condensation and release of euchromatin from the nucleus lead to cell death. We emphasized that 5 h post-seeding on  $E_{20}$  a few number of cells ( $32\% \pm 2.2$ ) displayed nucleus with extended chromatin uniformly distributed (Figs. S4A and S6B), but heterochromatin rose to about  $18.2\% \pm 0.6$  (Fig. S4B), confirming that even in the few cells that still survived on  $E_{20}$ , the softness of this substrate induced a change in chromatin towards the condensed form.

Solidity, defined as the ratio of the nuclear area to the nuclear convex hull area, was used to measure concavity of nuclei. Compared to glass, solidity decreased significantly on  $E_{50}$  (Fig. 1D), showing that nuclei were more able to form concavities on soft substrates. Interestingly, Langevin et al. suggested that a change in nuclear concavity may have important influences on gene expression, RNA trafficking and/or cell differentiation [31].

To strengthen these observations, we investigated by immunofluorescence the distribution of HP1 $\beta$  proteins which are structural adapters participating in the assembling of macromolecular complexes in heterochromatin. On glass and on  $E_{200}$  substrates, HP1 $\beta$  was uniformly distributed within the nuclei (Fig. 1B). On  $E_{50}$ , fluorescence of HP1 $\beta$  was still detected in the nuclei but less concentrated than on glass and on  $E_{200}$  (Fig. 1B). Moreover, on  $E_{20}$  and  $E_0$  HP1 $\beta$  decreased and was progressively released from nuclei displaying condensed chromatin (Fig. 1B and E), in accordance with the lytic state of cells on these substrates.

Together, these results demonstrate that cells cultured on soft substrates undergo remodeling of their euchromatin in heterochromatin, eventually associated to cell death on very soft substrates.

### 3.2. Inhibition of HDAC on very soft substrates maintain euchromatin

Because histone acetylation is a strong determinant of chromatin remodeling, the above results prompted to investigate if histone deacetylase activity (HDAC), known to induce chromatin condensation, is involved in the chromatin remodeling triggered by soft substrates. For this purpose, PtK2 cells were either cultured on glass and transferred on  $E_0$  for 5 h as described previously, or they were treated for 24 h on glass with the specific HDAC inhibitor trichostatin A (TSA) and then transferred on  $E_0$  for up to 5 h always in presence of TSA. The nuclear organization was analyzed during different time periods after cell seeding on  $E_0$  by Hoechst fluorescence microscopy. Without TSA, the percentage of cells with extended chromatin decreased with time, becoming close to  $12.6\% \pm 3.2$  after 5 h of culture (Fig. 2A, black line and 2B). This percentage of cells with condensed chromatin correlated with percentage of cells that necrosis on  $E_0$  (Fig. 1F and Fig. S3). Immunofluorescence analyses at the end of the 5 h culture on  $E_0$  showed poor staining with anti-H3K14, revealing a very low level of Lys14 acetylation of histone H3 on the soft substrate (Fig. 2B). In clear contrast, TSA allowed about 60% of the cells to maintain their chromatin extended throughout the time course of the experiment

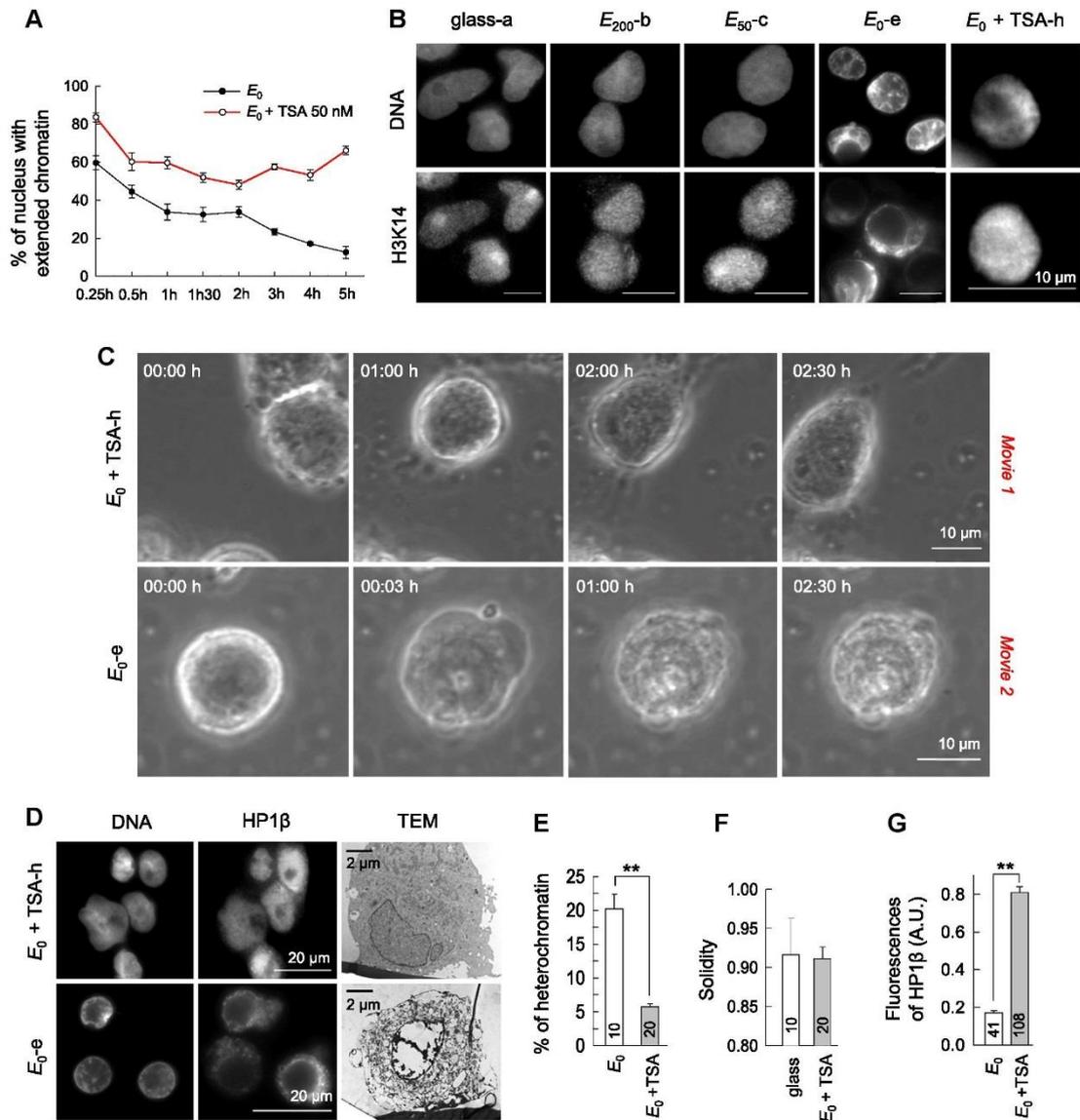
(Fig. 2A red line and 2B), while acetylated forms of histones H3 resulting from TSA-inhibition of HDAC were broadly distributed within those nuclei exhibiting extended chromatin (Fig. 2B). Time-lapse microscopy observations corroborate these data, since 85.2% of the cells exhibited at 2 h30 of culture on  $E_0$  a condensed nucleus and went through a lytic process characterized by the release of cytoplasm in the culture medium (Fig. 2C and Movie 2), whereas on  $E_0$  with TSA 50% of cells maintained a round shaped morphology without release of cytoplasm in the culture medium (Fig. 2C and Movie 1). Moreover, electron microscopy definitively provided evidence that, by contrast to the lytic cells appearing after 5 h on  $E_0$  in the absence of TSA, cells treated with TSA retained an organized nucleus containing euchromatin, embedded in an organized cytoplasm (Fig. 2D).  $62\% \pm 1.6$  of these cells on  $E_0 +$  TSA displayed absence of PS and EthD-III signal revealing that these cells were neither in apoptotic nor in necrotic state (Fig. 3E and Fig. S7). In the presence of TSA, the percentage of heterochromatin reached a level as low as about  $5.7\% \pm 0.4$  (Fig. 2E), which should be compared to the  $20.2\% \pm 2.2$  obtained without TSA. Thus, it is remarkable to observe that the HDAC inhibition by TSA compensated the unfavorable effect of the very soft substrate, since the amount of heterochromatin on  $E_0$  treated with TSA was of the same order than the amount of heterochromatin measured in cells cultured on glass (Fig. 1C). We note that the nuclear solidity of cells on  $E_0 +$  TSA was similar to nuclear solidity of cells on glass (Fig. 2F). Linked to that, HP1 $\beta$  was uniformly distributed in the nuclei exhibiting extended chromatin in cells treated with TSA (Fig. 2B), unlike cells seeded on  $E_0$  without TSA. The quantification of nuclear HP1 $\beta$  by immunofluorescence further confirmed these data (Fig. 2G). Similar results to those on  $E_0$  were obtained for cells treated with TSA transferred on  $E_{20}$  since TSA-preserved cytoplasmic and nuclear organization, reduced the percentage of heterochromatin down to about  $7.2\% \pm 0.1$  after 5 h post-seeding (Fig. S5B), while HP1 $\beta$  was homogeneously distributed in the nuclei showing extended chromatin (Fig. S5 and S5C). Of note, in the above culture protocol, the pretreatment with TSA for 24 h before seeding cells on  $E_0$  could potentially induces profound changes in gene expression, which would place these cells in a state allowing them to overcome the stress induced by the very soft substrate. To investigate if the pretreatment is a prerequisite to allow cells to survive on the very soft substrate, TSA was added only at the time cells were transferred on  $E_{20}$  or  $E_0$  without pretreatment with TSA for 24 h on glass. Importantly, in this experimental setting, we observed after 5 h in culture that 80.1% of the cells maintained their chromatin extended on  $E_{20}$  and 78.6% on  $E_0$  (Fig. S6), which indicated that HDAC inhibition with TSA only at the moment of seeding cells on the very soft substrate was sufficient for maintaining decondensed nucleus and cell survival on the very soft substrate. Thus, TSA has an immediate effect to prevent cell death.

Supplementary video related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.023>.

Therefore, very soft substrates, like  $E_0$ , induce a lytic process in PtK2 cells whereas preventing deacetylation of the chromatin allowed cells to bypass unfavorable physical signal provided by the very soft substrate elasticity.

### 3.3. TSA-preserved euchromatin is transcriptionally competent on very soft substrates

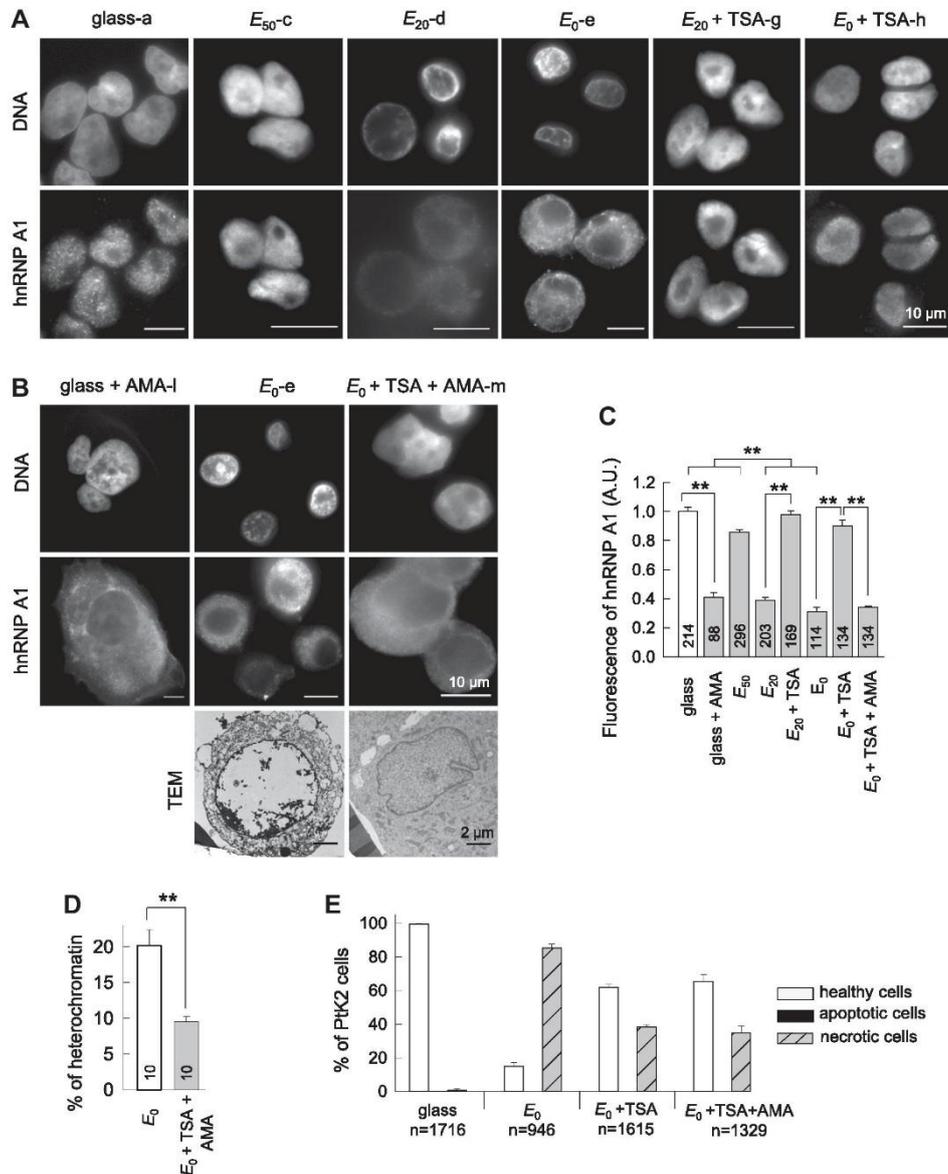
TSA treatment prevents histone deacetylation by HDAC, which is expected to promote sustained gene transcription. To investigate if the TSA-preserved euchromatin is transcription-competent on very soft substrates, we assayed by immunofluorescence the nucleocytoplasmic distribution of the heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1). Indeed, hnRNP A1 involved in RNA



**Fig. 2.** H3K14, chromatin organization and HP1β after HDAC inhibition in regard to substrate elasticity. A) Percentage of cells with decondensed nucleus during different time-periods after cell seeding on  $E_0$  with or without TSA. 600 cells were analyzed per point for each condition. Results are presented as 95% confidence intervals on three pooled independent experiments. B) Cells after 5 h of culture on glass, on  $E_{200}$ , on  $E_{50}$ , on  $E_{20}$  and on  $E_0$ , with anti-H3K14 and counterstained with Hoechst 33258 for DNA on two independent experiments. C) Time-lapse monitoring representative images of surviving cell on  $E_0 + \text{TSA}$ , and lysing cell on  $E_0$  for two independent experiments. Time-lapse images in phase contrast were taken every 10 min. D) Cells after 5 h of culture on  $E_0 + \text{TSA}$  and on  $E_0$  with anti-HP1β and counterstained with Hoechst 33258, and cellular ultrastructure of representative images from two independent experiments. E) Percentage of heterochromatin from D. The ANOVA–Dunn’s test shows that the percentage of heterochromatin on  $E_0$  is significantly different than that on  $E_0 + \text{TSA}$  ( $p < 0.05$ ). F) Nuclear solidity of PtK2 cells from D. The ANOVA–Dunn’s test shows that the solidity on  $E_0 + \text{TSA}$  is not significantly different from that on glass. G) Fluorescence intensity for nuclear HP1β signal using ImageJ (an arbitrary value of 1 was attributed to cells on glass). The ANOVA–Dunn’s test shows that the fluorescence signal of HP1β in the nucleus on  $E_0$  is significantly smaller than that on  $E_0 + \text{TSA}$  ( $p < 0.05$ ). E–G) Numbers at the bottom of bar graphs are counts of cells used in analysis and the error bars represent the s.e.m.

processing [32] is a transcription marker whose nuclear accumulation is inhibited when the activity of RNA polymerase II is compromised. In contrast to cells cultured on glass and on  $E_{50}$ , cells seeded on  $E_{20}$  and  $E_0$  showed a low level of hnRNP A1 protein

within the nuclei exhibiting condensed chromatin (Fig. 3A). However, in cells pretreated with TSA before seeding on  $E_{20}$  or  $E_0$ , hnRNP A1 was retained within the nuclei displaying extended chromatin (Fig. 3A). Analyze of fluorescence intensity corresponding to the



**Fig. 3.** hnRNP A1 after HDAC inhibition and transcription inhibition. A) Cells after 5 h of culture on glass, on  $E_{50}$ , on  $E_{20}$ , on  $E_0$ , on  $E_{20}$  + TSA and on  $E_0$  + TSA, with anti-hnRNP A1 and counterstained with Hoechst 33258 for DNA. B) Cells after 5 h of culture on glass + AMA ( $\alpha$ -amanitin), on  $E_0$  and on  $E_0$  + TSA + AMA, with anti-hnRNP A1 and counterstained with Hoechst 33258, and cellular ultrastructure. C) Fluorescence intensity for nuclear hnRNP A1 signal using ImageJ (an arbitrary value of 1 was attributed to cells on glass). The ANOVA–Dunn’s test shows that the fluorescence of hnRNP A1 on glass and on  $E_{50}$  is significantly different from that on  $E_0$  and on  $E_{20}$ , the fluorescence on  $E_{20}$  is significantly smaller than that on  $E_{20}$  + TSA, and the fluorescence on  $E_0$  is significantly smaller than that on  $E_0$  + TSA. The same test shows that the fluorescence of hnRNP A1 on glass + AMA is significantly smaller than that on glass, and the fluorescence on  $E_0$  and on  $E_0$  + TSA + AMA is significantly different from that on  $E_0$  + TSA ( $p < 0.05$ ). D) Percentage of heterochromatin from ultrastructure data in B. The ANOVA–Dunn’s test shows that the percentage of heterochromatin on  $E_0$  + TSA + AMA is significantly smaller than that on  $E_0$  ( $p < 0.05$ ). C and D) Numbers at the bottom of bar graphs are counts of cells used in analysis and the error bars represent the s.e.m. E) Cells after 5 h of culture on various surfaces analyzed with the apoptotic/necrotic/healthy cells detection kit (PromoKine). n at the bottom of bar graphs = numbers of cells used in analysis. Results from two independent experiments (the error bars represent the s.e.m.).

hnRNP A1 protein confirmed that the level of hnRNP A1 in the nuclei of cells seeded on  $E_{20}$  or  $E_0$  and treated with TSA was similar to cells cultured on glass (Fig. 3C). Thus, these results demonstrate that the extended chromatin, allowing cells survival on soft substrates by HDAC inhibitors, was transcriptionally competent.

3.4. HDAC inhibition allows cells to overcome cell death independently of transcriptional activity

Although transcription competence is retained in the nuclei of cells seeded on very soft substrates by treatment with HDAC

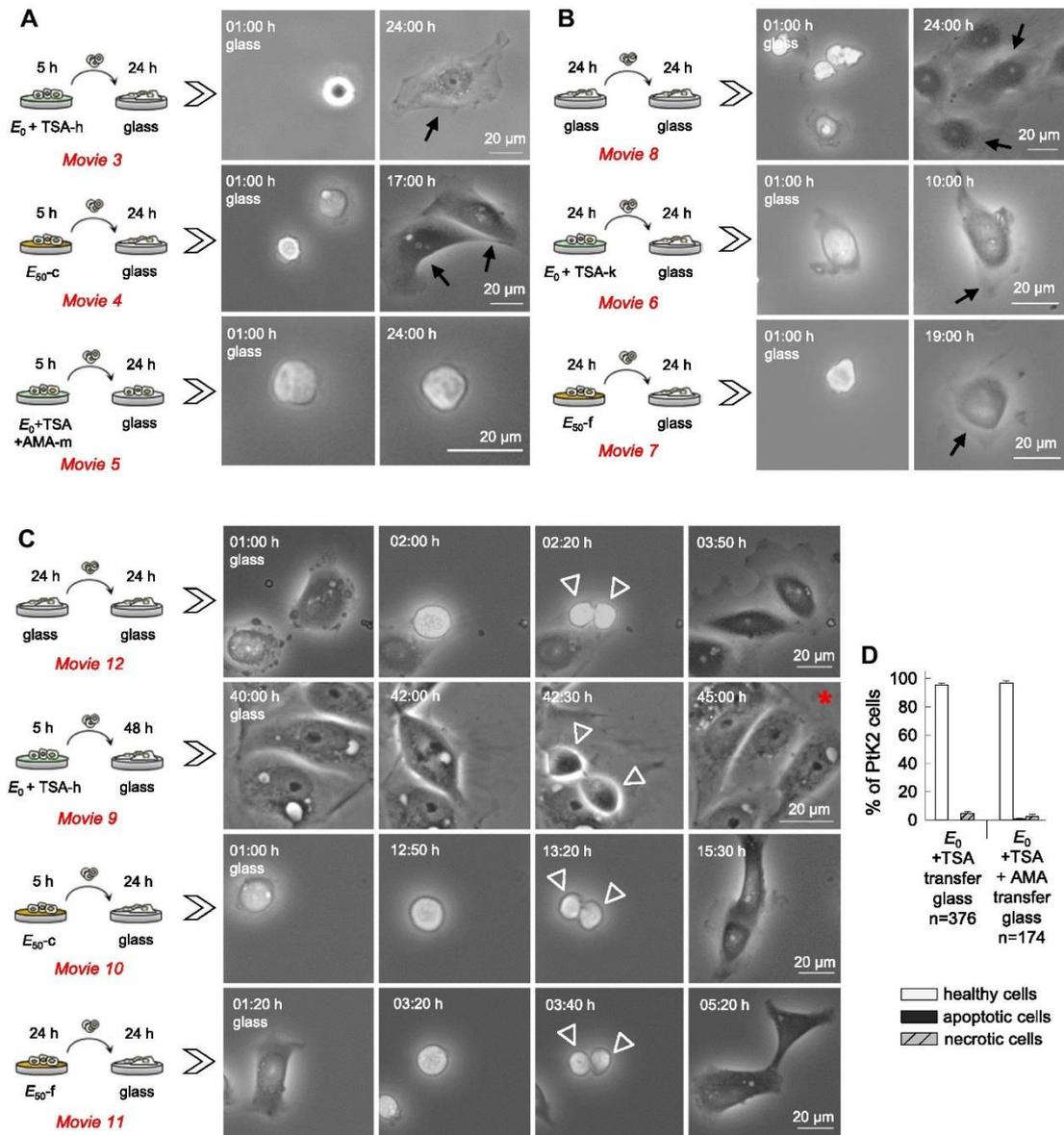


Fig. 4. PtK2 cells spreading and dividing after transfer on glass. A) Cells seeded either on  $E_0$  + TSA, on  $E_{50}$  or on  $E_0$  + TSA + AMA for 5 h and then transferred on glass for 24 h. B) Cells seeded either on glass, on  $E_0$  + TSA or on  $E_{50}$  for 24 h and then transferred on glass for 24 h. A, B) Arrow indicates spreading cells. C) Cells seeded either on  $E_0$  + TSA or on  $E_{50}$  for 5 h and then transferred on glass for 24 h. Arrowhead indicates dividing cells. Asterisk: 48 h after transfer on glass. A–C) Time-lapse images in phase contrast were taken every 10 min for two independent experiments. D) Cells in the condition  $E_0$  + TSA after 24 h transfer on glass and  $E_0$  + TSA + AMA-m after 24 h transfer on glass analyzed with the apoptotic/necrotic/healthy cells detection kit (PromoKine). n at the bottom of bar graphs = numbers of cells used in analysis. Results from two independent experiments (the error bars represent the s.e.m.).

inhibitors, we next investigated if transcription activity is actually required to overcome cell death induced by these substrates. For this purpose, cells were treated with  $\alpha$ -amanitin (AMA), an irreversible inhibitor of transcription through the destruction of RNA polymerase II [33]. In control cells cultured on glass with AMA, the hnRNP A1 protein localized in the cytoplasm instead of the nucleus (Fig. 3B), demonstrating that transcription was inhibited. In cells on  $E_0$  treated with TSA and additionally with AMA, similarly to cells on glass with AMA, the hnRNP A1 protein accumulated in the cytoplasm of cells whose nucleus exhibited extended chromatin, again confirming that AMA efficiently inhibited transcription activity (Fig. 3B and C). These cells adopted round shape morphology, but electron microscopy revealed that they displayed an organized nucleus embedded in a structured cytoplasm (Fig. 3B). Euchromatin filled up the majority of the nucleus, and heterochromatin was restricted to an irregular rim located at the nuclear periphery (Fig. 3B).

Quantitatively, the percentage of heterochromatin in cells seeded on  $E_0$  treated with TSA + AMA (Fig. 3D) was in the same range than in the case of cells on  $E_0$  treated only with TSA (Fig. 2E). Fluorescent apoptotic-necrotic-healthy assays showed that 65.2%  $\pm$  4.2 of cells were healthy on  $E_0$  + TSA + AMA (Fig. 3E and Fig. S7).

Thus, despite transcription inhibition, organized cytoplasm and nucleus with euchromatin provided evidence that cells escaped the lytic process (Fig. 3B). These results strongly suggest that transcription activity is not required for cells treated with HDAC inhibitors to overcome cell death induced by very soft substrates. This conclusion is in line with the immediate effect of TSA when cells are seeded on very soft substrates.

### 3.5. Cells surviving on very soft substrates retain the capacity to spread and divide

We previously demonstrated that after being seeded on soft substrates ( $E_{50}$ ), PtK2 cells retained transcription competence, but focal adhesion kinase, Rac1 activity, and vinculin assembly were inhibited, leading to the inhibition of DNA replication [29] and progression through mitosis [34]. In addition, our current work showed here that even if PtK2 cells withstood cell death by maintaining active euchromatin after 5 h of culture on  $E_0$  with TSA and also on  $E_{50}$ , they failed to spread and exhibited depolymerized actin filaments (Fig. S8A). We thus wondered if cells resisting to death would still preserve the capacity to spread and divide when they are brought back into contact with stiff substrates. To address this issue, cells were seeded on  $E_0$  in the presence of TSA or on  $E_{50}$  for either 5 h or for a longer period of 24 h, and they were then transferred on glass to analyze and compare the day later their ability to spread and to divide. Live-cell imaging revealed that cells having spent 5 h on  $E_0$  in the presence of TSA (Fig. 4A and Movie 3) or on  $E_{50}$  (Fig. 4A and Movie 4) were able to spread respectively for 16.1% and 93.1% (Table 2), as emphasized by the presence of actin

microfilaments (Fig. S8B from  $E_0$  + TSA and  $E_{50}$  respectively). Of note, 95.3%  $\pm$  1.2 of cells seeded on  $E_0$  + TSA 5 h and transferred on glass were healthy (Fig. 4D and Fig. S9). Live-cell imaging data suggested that only 16.1% of these cells were able to spread. The cells 5 h seeded on  $E_0$  + TSA and  $E_{50}$  and then transferred on glass displayed nuclei with extended chromatin (Fig. S8B). This observation prompted us to investigate if round cells, once transferred back on glass surface, used the pool of depolymerized cytoskeletal proteins to re-structuring cytoskeleton filaments or if they neo-synthesized new proteins for cytoskeletal filament assemblies. To answer this question, the experiments of cell transfer were repeated in the presence of AMA to inhibit transcription activity. The results showed that cells cultured 5 h on  $E_0$  in the presence of TSA together with AMA and then transferred on glass for 24 h, were not able to spread. 97%  $\pm$  1.5 of these cells survived without apoptotic and necrotic signals (Fig. 4D and Fig. S9) remaining round (Fig. 4A, Movie 5 and Table 2). Thus, cells neo-synthesized cytoskeletal proteins for re-spreading rather than utilizing depolymerized proteins. Interestingly, live-cell imaging of cells placed back on glass revealed spread morphologies for 13.2% of the cells from 24 h on  $E_0$  + TSA (Fig. 4B, Movie 6 and Table 2) and 85.7% of the cells from 24 h on  $E_{50}$  (Fig. 4B, Movies 7 and 8 as control and Table 2) as evidenced by the presence of actin filaments (Fig. S10B from  $E_0$  + TSA and  $E_{50}$  respectively). These cells displayed nuclei with extended chromatin (Fig. S10B). These results showed that cells retain spreading capacity even after 24 h of culture on unfavorable substrates. Next we investigated if cells previously cultured for 5 h on soft substrates also retained capacity to progress in the cell cycle and divide once transferred back on glass. Live-cell imaging showed dividing cells for 5.5% of the cells coming from  $E_0$  + TSA (Fig. 4C, Movie 9 and Table 2) and 8.5% of cells coming from  $E_{50}$  (Fig. 4C, Movie 10 and Table 2). We noted a delay to progress in mitosis of about 24 h for cells coming from  $E_0$  + TSA compared to the cells coming from  $E_{50}$ . Subsequently, we observed that 4.1% of cells did divide on glass when they were previously cultured on  $E_{50}$  for 24 h (Fig. 4C, Movies 11 and 12 as control and Table 2) showing that cells also retain dividing capacity. In summary, these data demonstrate that cells maintaining euchromatin on very soft substrates by HDAC inhibition enter a survival state that allows them to reorganize an active network of actin fibers, to spread and to further undergo mitosis when they are placed back on a more rigid substrate.

Supplementary video related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.023>.

In conclusion, surviving cells i) in a non-adherent state without detection of apoptotic and necrotic markers, ii) that maintain euchromatin transcriptionally competent on a very soft ( $E_0$ ) substrate by adding histone deacetylase inhibitor (TSA) or maintain euchromatin on a soft substrate ( $E_{50}$ ) with partial shift from euchromatin to heterochromatin and iii) that retain their capacity to adhere, to spread and to enter a novel mitotic cycle once transferred on a stiff substrate have the characteristics of cells in quiescent state.

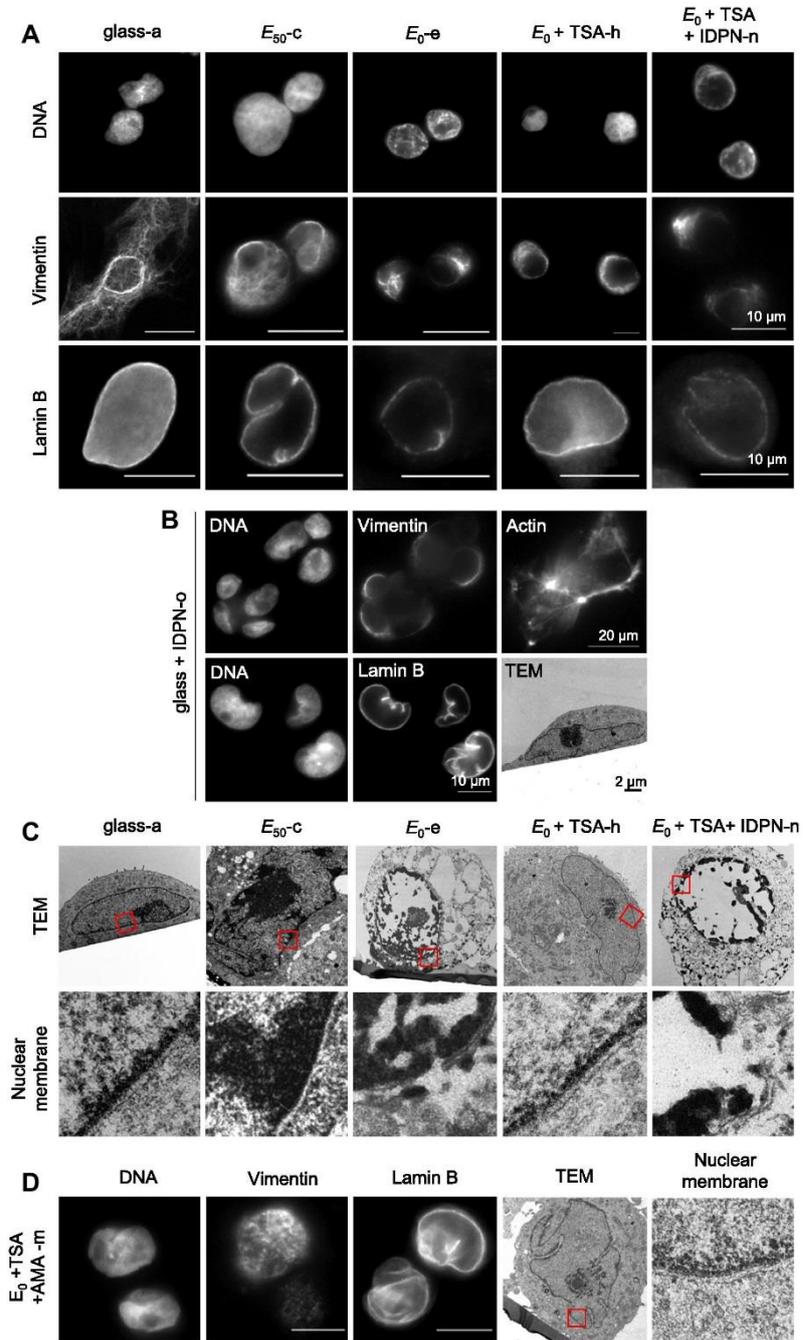
### 3.6. Dependence of chromatin remodeling on cytoskeleton organization

On very soft substrates, HDAC inhibition allowed cells to retain an organized nucleus embedded in a structured cytoplasm (Fig. 2D). This suggests that cytoskeleton elements may provide a structural support to the cytoplasm and to the organization of the nuclear envelope, in particular through lamins that directly interact with chromatin. We rule out a role for actin filaments and microtubules in this, because we have previously demonstrated that these were depolymerized already on the soft substrate  $E_{50}$  [29,34],

**Table 2**  
Percentage of spreading and dividing PtK2 cells 24 h after transfer on glass based on Fig. 4.

Conditions preceding transfer on glass	Spreading	Division
Glass 24 h	94.8% (1182/1247)	12.3% (153/1247)
$E_{50}$ 5 h	93.1% (570/612)	8.5% (52/612)
$E_0$ + TSA 5 h	16.1% (109/676)	5.5% (7/128) <sup>a</sup>
$E_0$ + TSA + AMA 5 h	0% (0/1808)	0% (0/1808)
$E_{50}$ 24 h	85.7% (442/516)	4.1% (21/516)
$E_0$ + TSA 24 h	13.2% (7/53)	0% (0/53)

<sup>a</sup> 48 h after Transfer on glass.



**Fig. 5.** Vimentin network and lamin B organization in regard to substrate elasticity with or without TSA and IDPN. A) Immunolabeled with anti-vimentin counterstained with Hoechst 33258 for DNA and immunostained with anti-lamin B. B) Morphologies of cells cultured for 5 h on glass in presence of IDPN. Immunolabeled with anti-vimentin, labeled with phalloidin, counterstained with Hoechst 33258 and immunolabeled with anti-lamin B, counterstained with Hoechst and electronic microscopy image. C) Ultrastructure of nuclear membrane of PK2 cells. Bottom: enlargement of the area delimited by a square showing nuclear ultrastructure. D) Cells cultured for 5 h on  $E_0$  + TSA + AMA. Immunolabeled with anti-vimentin, counterstained with Hoechst 33258 for DNA, stained with anti-lamin B and electronic microscopy image. A and B) Cells cultured for 5 h on glass, on  $E_{50}$ , on  $E_0$  and on  $E_0$  + TSA for vimentin network inhibition cells were cultured with IDPN until their fixation.

and because actin filaments remained depolymerized on the very soft substrate  $E_0$  even when cells were allowed to escape the lytic process by TSA treatment (Figs. S8A and S10A). Thus, we studied if IFs contribute to the cytoplasm structuration. To address this question, cells were cultured 5 h on substrates of various stiffness and immunostained with anti-vimentin V9 and anti-lamin B antibodies. In cells cultured on glass, the vimentin network homogeneously organized in the cytoplasm and localized in a perinuclear region (Fig. 5A) as it has already been documented in previous papers [35,36], the nuclear periphery was uniformly stained by lamin B and electron microscopy identified the bilayer of nuclear envelope separating the nucleus from the cytoplasm (Fig. 5C). On  $E_{50}$ , the vimentin network was altered and filaments of vimentin were preferentially localized in a limited perinuclear region of cells exhibiting extended chromatin (Fig. 5A). Lamin B was homogeneously localized at the nuclear periphery (Fig. 5A) bordered by the bilayer of nuclear envelope (Fig. 5C). In contrast, on  $E_0$ , filaments of vimentin were no longer detected and lamin B was discontinuously localized at the nuclear periphery (Fig. 5A) presenting gaps in the nuclear envelope typical of a lytic process (Fig. 5C). Remarkably, the TSA treatment of cells cultured on  $E_0$ , which preserved euchromatin in the nucleus, additionally restored the continuous stain of lamin B at the nuclear periphery and the intact bilayer of nuclear envelope (Fig. 5A, C), and maintained a residual vimentin network preferentially organized in a limited perinuclear region (Fig. 5A). This suggests that there is a functional relationship between the vimentin network, the lamin B lining of the nuclear envelope and euchromatin, which is perturbed when cells are seeded on very soft substrates. Indeed, when cells were cultured 5 h on  $E_0$  in the presence of TSA and additionally of 3,3'-iminodipropionitrile (IDPN), a specific inhibitor of vimentin, we observed that the vimentin network was destroyed (Fig. 5A), and consequently that lamin B exhibited a discontinuous pattern at the nuclear periphery (Fig. 5A) with gaps visualized by electron microscopy (Fig. 5C). For  $E_0 + \text{TSA} + \text{IDPN}$  condition, 83.4% of cells displayed nuclei with condensed chromatin (Fig. 5A, 387/464 cells with condensed chromatin) similarly to the condition  $E_0$  (Fig. S6B, 87.4% of cells with condensed chromatin). Moreover, cytoplasmic material and euchromatin were released in the medium, while heterochromatin aggregated at the nuclear periphery (Fig. 5C) indicating that cells went through a lytic process. In control cells cultured on glass with IDPN, vimentin network was destroyed whereas actin filaments and continuous stain of lamin B at the nuclear periphery were preserved. These cells exhibited spread shaped morphologies (Fig. 5B). This result consolidates that on  $E_0 + \text{TSA}$ , residual vimentin network, in contrast to depolymerized actin filament, is element of the cytoskeleton providing a structural support to the cytoplasm, to the nucleus and to the continuous pattern of lamin B at the nuclear periphery. For cells cultured on  $E_0 + \text{TSA} + \text{AMA}$ , vimentin network and lamin B continuously present at the nuclear periphery were maintained (Fig. 5D). This result confirms that on very soft substrates decondensation of the chromatin by TSA, preserving residual vimentin network and continuous pattern of lamin B, was sufficient to maintain cell survival in absence of transcription. Together, these results establish that survival and maintenance of euchromatin on very soft substrates by HDAC inhibition is correlated with preserving the perinuclear vimentin network and preventing the alteration of the lamin B lining and nuclear envelope.

#### 4. Conclusion

This work, has revealed an unexpected relationship between substrate elasticity and chromatin plasticity in epithelial cells. We report that on stiff substrates (100–200 kPa), where cells preferentially adhere, chromatin is mainly found in its euchromatin form.

Decreasing the Young modulus to 50 kPa is correlated with cell rounding and with a partial shift from euchromatin to heterochromatin. These cells are still surviving without detection of apoptotic and necrotic markers. On very soft substrates ( $\ll 10$  kPa), for the majority of cells this is accompanied by cell lysis, resulting in euchromatin and HP1 $\beta$  released from nuclei and ultimately to cell death by necrosis. Highlighting, on these very soft substrates, histone deacetylase inhibition by adding a drug (TSA) preserves acetylated histone and thus maintains the euchromatin form with uniform distribution of HP1 $\beta$  in the nucleus, thereby keeping intact the nuclear envelope as well as a residual intermediate filament network around the nucleus. This allows cells to survive in a non-adherent state without undergoing proliferation and independently of their transcriptional competence. When transfer on a stiff substrate these cells retain their capacity to adhere, to spread and to enter a novel mitotic cycle in a way that depends on their transcriptional competence. A similar effect is observed on soft substrates without need of histone deacetylase inhibition. These new results suggest that on soft substrates cells might enter in a quiescence state.

Together, these results demonstrate that the nucleus represents a level of integration of mechanical inputs. Its response to external signals provided by soft substrates depends on a residual intermediate filament network connected to the nuclear lamina and to the remodeling of chromatin through the histone acetylation; in turn, it dictates, in a transcription-dependent manner, the ability of the cell to reconstitute the actin microfilament network, to spread and ultimately to proliferate when put back on a stiff substrate. These findings might be relevant to maintain cells in the best settings within synthetic scaffolds and in tissue-derived matrices used in tissue regeneration strategies. They represent the rational for detailed molecular studies aimed at developing drugs to preserve important nuclear structures, in particular euchromatin and the nuclear envelope, under unfavorable mechanical environment.

#### Acknowledgments

We are indebted to Pr N. Boehm (Inserm U1119, Strasbourg, France) for fruitful discussions in analysis of electron microscopy images. Time-lapses imaging were performed at Imaging Center of Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (UMR-CNRS 7104/Inserm U964, Illkirch, France) and the PIQ imaging platform of Faculté de Pharmacie (UMR-CNRS 7213, Illkirch, France). We thank M. Boeglin (UMR-CNRS 7104/Inserm U964), Dr D. Dujardin (UMR-CNRS 7213) and R. Vauchelles (UMR-CNRS 7213) for the help with live-cell imaging. We thank for K. Benmlih (Inserm U1121) for manufacturing time-lapse chamber device. M.R., F.F. and A.T. are grateful to Faculté de Chirurgie Dentaire of Strasbourg for financial support. Financial support was received from Alsace Contre le Cancer 2012 and ANR through the project "FORCELL" (ANR-12-BSVE5-0021).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.023>.

#### References

- [1] Crisp M, Liu Q, Roux K, Rattner JB, Shanahan C, Burke B, et al. Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol* 2006;172:41–53.
- [2] Lombardi ML, Jaalouk DE, Shanahan CM, Burke B, Roux KJ, Lammerding J. The interaction between nesprins and sun proteins at the nuclear envelope is critical for force transmission between the nucleus and cytoskeleton. *J Biol Chem* 2011;286:26743–53.

- [3] Iyer KV, Pulford S, Mogilner A, Shivashankar GV. Mechanical activation of cells induces chromatin remodeling preceding MKL nuclear transport. *Biophys J* 2012;103:1416–28.
- [4] Wang N, Tytell JD, Ingber DE. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:75–82.
- [5] Mellad JA, Warren DT, Shanahan CM. Nesprins LINC the nucleus and cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 2011;23:47–54.
- [6] Gruenbaum Y, Margalit A, Goldman RD, Shumaker DK, Wilson KL. The nuclear lamina comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:21–31.
- [7] Schneider R, Grosschedl R. Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev* 2007;1:3027–43.
- [8] Shimi T, Pflieger K, Kojima S, Pack CG, Solovei I, Goldman AE, et al. The A- and B-type nuclear lamin networks microdomains in chromatin organization and transcription. *Genes Dev* 2008;22:3409–21.
- [9] Isermann P, Lammerding J. Nuclear mechanics and mechanotransduction in health and disease. *Curr Biol* 2013;23:1113–21.
- [10] Swift J, Ivanovska IL, Buxboim A, Harada T, Dingal PC, Pinter J, et al. Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science* 2013;341:1240104–15.
- [11] Zhang QP, Bethmann C, Worth NF, Davies JD, Wasner C, Feuer A, et al. Nesprin-1 and -2 involved in the pathogenesis of Emery-Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear integrity. *Hum Mol Genet* 2007;16:2816–33.
- [12] Booth-Gauthier EA, Du V, Ghibaudo M, Rape AD, Dahl KN, Ladoux B. Hutchinson–Gilford progeria syndrome alters nuclear shape and reduces cell motility in three dimensional model substrates. *Integr Biol* 2013;5:569–77.
- [13] Dillon N, Festenstein R. Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends Genet* 2002;18:252–8.
- [14] Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007;128:693–705.
- [15] Badeaux AI, Shi Y. Emerging roles for chromatin as a signal integration and storage platform. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14:211–24.
- [16] Meshorer E, Misteli T. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:540–6.
- [17] Dahl KN, Engler AJ, Pajerowski JD, Discher DE. Power law rheology of isolated nuclei with deformation mapping of nuclear substructures. *Biophys J* 2005;89:2855–64.
- [18] Mazumder A, Roopa T, Basu A, Mahadevan L, Shivashankar GV. Dynamics of chromatin decondensation reveals the structural integrity of a mechanically prestressed nucleus. *Biophys J* 2008;95:3028–35.
- [19] Dalby MJ, Gadegaard N, Herzyk P, Sutherland D, Agheli H, Wilkinson CD, et al. Nanomechanotransduction and interphase nuclear organization influence on genomic control. *J Cell Biochem* 2007;102:1234–44.
- [20] Badique F, Stamoiv DR, Davidson PM, Veuillet M, Reiter G, Freund JN, et al. Directing nuclear deformation on micropillared surfaces by substrate geometry and cytoskeleton organization. *Biomaterials* 2013;34:2991–3001.
- [21] Le Berre M, Aubertin J, Piel M. Fine control of nuclear confinement identifies a threshold deformation leading to lamina rupture and induction of specific genes. *Integr Biol* 2012;4:1406–14.
- [22] Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, Schwartz US, Ishizaki T, Narumiya S, et al. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol* 2001;153:1175–86.
- [23] Vogel V, Scheetz M. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:265–75.
- [24] Roca-Cusachs P, del Rio A, Puklin-Faucher E, Gauthier NC, Biais N, Sheetz MP. Integrin-dependent force transmission to the extracellular matrix by  $\alpha$ -actinin triggers adhesion maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:1361–70.
- [25] Dumbauld DW, Lee TT, Singh A, Scrimgeour J, Gersbach CA, Zamir EA, et al. How vinculin regulates force transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:2352–61.
- [26] Francius G, Hemmerle J, Ball V, Lavalle P, Picart C, Voegel JC, et al. Stiffening of soft polyelectrolyte architectures by multilayer capping evidenced by viscoelastic analysis of AFM indentation measurements. *J Phys Chem C* 2007;111:8299–306.
- [27] Decher G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. *Science* 1997;277:1232–7.
- [28] Mertz D, Vogt C, Hemmerlé J, Mutterer J, Ball V, Voegel JC, et al. Mechano-transductive surfaces for reversible biocatalysis activation. *Nat Mater* 2009;8:731–5.
- [29] Kocgozlu L, Lavalle P, Koenig G, Senger B, Haikel Y, Schaaf P, et al. Selective and uncoupled role of substrate elasticity in the regulation of replication and transcription in epithelial cells. *J Cell Sci* 2010;123:29–39.
- [30] Levental I, Georges PC, Janmey PA. Soft biological materials and their impact on cell function. *Soft Matter* 2007;3:299–306.
- [31] Langevin HM, Storch KN, Snapp RR, Bouffard NA, Badger GJ, Howe AK, et al. Tissue stretch induces nuclear remodeling in connective tissue fibroblasts. *Histochem Cell Biol* 2010;133:405–15.
- [32] Dreyfuss G, Matunis MJ, Piñol-Roma S, Burd CG. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem* 1993;62:289–321.
- [33] Nguyen VT, Giannoni F, Dubois MF, Seo SJ, Vigneron M, Kédinger C, et al. In vivo degradation of RNA polymerase II largest subunit triggered by alpha-amanitin. *Nucleic Acids Res* 1996;24:2924–9.
- [34] Kocgozlu L, Rabineau M, Koenig G, Haikel Y, Schaaf P, Freund JN, et al. The control of chromosome segregation during mitosis in epithelial cells by substrate elasticity. *Biomaterials* 2012;33:798–809.
- [35] Yu KR, Kijikata T, Lin ZX, Sweeney HL, Englander SW, Holtzer H. Truncated desmin in Pk2 cells induces desmin–vimentin–cytokeratin coprecipitation, involution of intermediate networks, and nuclear fragmentation: a model for many degenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:2497–501.
- [36] Yoon KH, Yoon M, Moir RD, Khoun S, Flitney FW, Goldman RD. Insights into the dynamic properties of keratine intermediate filaments in living epithelial cells. *J Cell Biol* 2001;153:503–16.

## 4.3 Résumé

L'influence de la rigidité du substrat sur l'organisation de la chromatine a été abordée sur des cellules épithéliales rénales de potoroos (ou rats-kangourous) PtK2. Les substrats utilisés couvrent des rigidités allant du GPa (surface de verre), à 200 kPa (film  $E_{200}$ ), 50 kPa ( $E_{50}$ ), 20 kPa ( $E_{20}$ ) et 0 kPa ( $E_0$ ). Des tests de viabilité ont montré qu'une diminution de la rigidité du substrat induit une augmentation du taux de nécrose des cellules épithéliales. Des expériences de microscopie électronique ont permis de montrer une augmentation de la proportion d'hétérochromatine sur des substrats mous (< ou égale à 50 kPa). Sur substrats rigides, les noyaux de PtK2 contiennent 11% d'hétérochromatine. Sur substrats mous, ce pourcentage augmente à 20%. Ces résultats montrent que les substrats faiblement rigides remodelent la chromatine dans sa forme hétérochromatine. Les substrats considérés comme très faiblement rigides ( $E_{20}$  et  $E_0$ ) entraînent une mort des cellules par nécrose.

L'état d'acétylation des histones est un facteur déterminant dans l'organisation de la chromatine. Les histones désacétylases (HDAC) sont les enzymes qui condensent l'hétérochromatine sous sa forme hétérochromatine. Il est possible de modifier l'organisation de la chromatine par l'utilisation d'une drogue, la trichostatine A qui inhibe spécifiquement les HDAC de classe I et II. Comme attendu, une diminution de 20% à 5% de l'hétérochromatine est observée sur substrats très mous ( $E_0$ ) en présence de TSA. Des expériences d'immunomarquage de hnRNP1 ont montré que ces cellules maintenues artificiellement sous forme eu-chromatine sont toujours actives en transcription même sur des substrats très faiblement rigides ( $E_0$ ). Des expériences de vidéo-microscopie ont également montré que ces cellules, après avoir survécu pendant 5 heures et 24 heures sur des substrats très faiblement rigides, parviennent à nouveau à s'étaler et à proliférer lorsqu'elles sont transférées sur substrats très rigides. Ces caractéristiques suggèrent que ces cellules entrent en quiescence sur des substrats qui leurs sont défavorables.

Des investigations supplémentaires ont également été réalisées sur le rôle du cytosquelette et plus particulièrement du cytosquelette de filaments intermédiaires, des travaux préliminaires ayant montré que sur des substrats très faiblement rigides les cytosquelettes d'actine et de microtubules étaient dépolymérisés (Kocgozlu, Lavalley et al. 2009, Kocgozlu, Rabineau et al. 2012). Ces travaux ont montré que le maintien artificiel de la chromatine sous forme ouverte par la TSA permet la préservation d'un réseau de vimentine périnucléaire et du réseau de lamines B.

## 4.4 Perspectives

La thérapie cellulaire est un domaine en pleine émergence dans le développement de la médecine régénérative et de l'ingénierie tissulaire. Les hydrogels, par leur capacité à mimer les propriétés biochimiques et physiques de l'ECM, sont des matériaux de choix pour confiner puis libérer des cellules saines dans l'environnement 3D du site lésé. Ces cellules pourront alors exercer des effets thérapeutiques de réparation des tissus et des organes endommagés. Cependant les stratégies visant à améliorer la survie des cellules dans ces matériaux réservoirs constituent des défis majeurs encore non résolus. Les cellules doivent notamment surmonter la faible rigidité des hydrogels (due à leur importante hydratation) qui réduit fortement leur viabilité. Néanmoins, en jouant sur le degré de réticulation des hydrogels, il est possible de faire varier le module d'élasticité. Dans ce premier projet de ce travail de thèse, **l'influence de l'élasticité des hydrogels sur la structuration de la chromatine** de cellules épithéliales a été étudiée. Ces travaux ont mon-

tré que sur des substrats rigides, les cellules organisent leur chromatine principalement sous forme d'euchromatine (gènes activés). Sur des hydrogels de faibles rigidités, la chromatine se remodèle partiellement en hétérochromatine (gènes inactivés). Sur des hydrogels extrêmement mous, les cellules meurent par nécrose.

L'idée originale de ce projet de recherche réside dans le fait de jouer sur l'état de l'organisation de la chromatine afin de voir s'il était possible d'influer sur le comportement de survie des cellules lorsque celles-ci sont au contact d'hydrogels extrêmement mous. La trichostatine A, une drogue qui inhibe les histones désacétylases, a été utilisée pour maintenir la chromatine sous forme euchromatine. Les résultats obtenus ont permis de montrer que **les cellules dont la chromatine est structurée en euchromatine rentrent dans un état de quiescence leur permettant de survivre sur des hydrogels qui leur étaient auparavant létaux**. D'une manière spectaculaire, ces cellules transférées sur des surfaces rigides entrent dans un nouveau cycle cellulaire. Sur la base de ce travail, plusieurs perspectives s'offrent aux chercheurs.

Une idée intéressante serait de concevoir des hydrogels à module d'élasticité variable capables de contrôler la plasticité de la chromatine et par conséquent guider le destin de cellules d'intérêt pour l'ingénierie tissulaire. Le comportement de plusieurs types de cellules souches pourrait être testé en fonction de leur niveau de différenciation. C'est le cas des cellules souches pluripotentes issues de la gelée de Wharton et des cellules embryonnaires totipotentes de souris. Ainsi la faculté du module élastique à réguler certaines fonctions cellulaires comme 1) la survie et la synthèse de matrice extracellulaire ; 2) le maintien dans un état natif ; 3) le maintien en quiescence et 4) la prolifération et le potentiel de différenciation sera évaluée. Un aspect crucial sera de montrer si le module élastique a le pouvoir de remodeler durablement la chromatine des cellules conservant ainsi une « mémoire mécanique » de leur environnement ? Le devenir d'une cellule fusionnée avec un « noyau mécaniquement reprogrammé » pourrait renseigner cette hypothèse. Des expériences de mobilité de la chromatine par recouvrement de fluorescence après photo-blanchiment (FRAP en anglais) apporteront également des informations pertinentes sur ces phénomènes épigénétiques.

# Chapitre 5 Organisation de la chromatine de cellules du cancer du côlon sur des matrices de faibles élasticités

Le cancer est une véritable problématique de santé publique dans de nombreux pays du monde. Parmi ces cancers, le cancer colorectal est particulièrement agressif. Près de 90% des décès liés au cancer ne sont pas liés à la tumeur primaire mais aux métastases. Pour former des métastases, des cellules quittent la tumeur primaire, traversent des environnements de rigidité différente, se retrouvent dans les circulations sanguine et lymphatique avant de coloniser de nouveaux organes par un mécanisme d'organotropisme. Au cours de ce processus de dissémination, de nombreuses cellules ne parviennent pas à survivre à ces variations importantes de rigidité et meurent. Cependant certaines cellules, les cellules initiatrices de tumeurs parviennent à survivre. L'objectif de ce second sujet de thèse a été de concevoir un environnement extracellulaire mimant les variations mécaniques que les cellules cancéreuses sont susceptibles de rencontrer au cours du processus de dissémination métastatique. Des cellules cancéreuses colorectales (SW480) sont cultivées successivement sur des matériaux mous (films multicouches de polyélectrolytes de 20 kPa =  $E_{20}$ ) puis sur des substrats rigides (lamelles de verre). Les cellules cancéreuses survivantes sont à nouveauensemencées sur  $E_{20}$ . Cette culture alternée  $E_{20}$ -Verre est répétée plusieurs fois. Les travaux effectués au cours de ce projet se focalisent sur les mécanismes et modifications génétiques éventuelles qui permettent aux cellules cancéreuses de faire face à ces changements drastiques de propriétés mécaniques.

## 5.1 Introduction

Le cancer est responsable du décès de millions de personnes par an, ainsi en 2012, plus de 8 millions de décès étaient dénombrés dans le monde (Stewart and Wild 2016). Près de 90% de ces décès sont liés à la dissémination de cellules cancéreuses dans l'organisme et la formation de métastases associée à cette dissémination. Ces métastases altèrent le fonctionnement d'organes vitaux comme le foie, les poumons, le cœur, les reins, le pancréas ou encore le cerveau compromettant la survie des patients. Certains cancers forment plus fréquemment des métastases que d'autres, c'est par exemple le cas des cancers de la poitrine ou du côlon. Plusieurs travaux (Zhdanov 2009, Ashley 2013) suggèrent que ces métastases sont formées par une petite fraction de cellules cancéreuses appelées cellules souches cancéreuses ou cellules initiatrices de tumeurs (CIT). Ces cellules sont caractérisées par leurs propriétés à s'échapper de la tumeur primaire, d'envahir le stroma puis d'utiliser de nombreuses voies de dissémination (circulation sanguine et lymphatique ou même au niveau de la gaine des nerfs (Li, Sun et al. 2013)) pour finalement créer des métastases dans des sites distants de la tumeur primaire (Joyce and Pollard 2009). S'il a longtemps été admis que les CIT sont présentes au cours des étapes finales de la cancérogénèse, plusieurs études ont montré que ces cellules pouvaient être présentes dès les stades précoces de la cancérogénèse suivant le type de cancer (Klein 2008, Nguyen, Bos et al. 2009).

Les propriétés invasives des cellules initiatrices de tumeurs sont liées à la capacité des cellules tumorales à hydrolyser des molécules de la lame basale, à adopter un comportement migratoire important et surtout à survivre aux changements mécaniques de leurs microenvironnements au cours de la dissémination métastatique (Bosman, de Bruine et al. 2003, Joyce and Pollard 2009). Sur les dizaines de milliers de cellules qui entrent dans circulation chaque jour, seules 0,01% des cellules parviennent à résister à ces changements drastiques pour former par la suite des métastases. Ces changements drastiques sont à la fois chimiques et mécaniques. Une tumeur est 10 fois plus rigide que son environnement d'origine. Les cellules qui parviennent à rompre la lame basale quittent cet environnement rigide pour le stroma qui est beaucoup plus mou puis circulent dans le sang et la lymphe qui se comportent comme des liquides viscoélastiques. Elles doivent ensuite s'établir dans un nouvel organe qui est certes plus rigide mais qui peut avoir des propriétés mécaniques et biochimiques différentes des tissus dont elles sont issues. Afin de survivre à ce processus de dissémination, les cellules modifient leurs propriétés en modifiant l'expression de certains gènes et en acquérant des mutations au niveau de leur génome (Bosman, de Bruine et al. 2003).

Cette modification du génome peut se traduire par un remodelage important de la chromatine (Zink, Fischer et al. 2004, Cherkezyan, Stypula-Cyrus et al. 2014). Dans le noyau, la chromatine existe sous deux formes : une forme décondensée active en transcription, l'euchromatine, et une forme condensée inactive en transcription, l'hétérochromatine. Le passage d'une forme à l'autre est modulé, entre autres, par le degré d'acétylation des histones (les histones entrent dans la composition du nucléosome, l'unité fondamentale de la chromatine). Ces acétylations et désacétylations sont contrôlées par des enzymes, les histones acétyl-transférases (HAT) et les histones désacétylases (HDAC) qui, respectivement, décondensent et condensent la chromatine (Kouzarides 2007). Pour les cellules saines, l'euchromatine remplit la majorité de l'intérieur nucléaire alors que l'hétérochromatine est localisée au niveau de la périphérie nucléaire et autour du nucléole. Dans le cadre des cellules cancéreuses, une perte de la localisation périphérique de l'hétérochromatine et la formation d'agrégats intranucléaires de chromatine condensée sont observées dès les premiers stades de la cancérogénèse (Cherkezyan, Stypula-Cyrus et al. 2014). Cette organisation de la chromatine a un effet important sur l'expression des gènes (Badeaux and Shi 2013) ; il est en effet acquis que le remodelage de la chromatine intervient dans de nombreux comportements cellulaires comme le maintien de la pluripotence ou la différenciation cellulaire (Meshorer and Misteli 2006). Dans le cadre de la cancérogénèse, des changements de la chromatine sont capables d'induire l'activation d'oncogènes et l'extinction de gènes suppresseurs de tumeurs permettant la progression néoplastique des cellules (Lao and Grady 2011)

La compréhension des mécanismes par lesquelles les cellules cancéreuses acquièrent leurs propriétés invasives et deviennent des CIT représente un enjeu capital dans l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques anticancéreuses. Si l'adaptation des cellules à la chimie de leur environnement a été le sujet de nombreuses études (Markowitz and Bertagnolli 2009, Rathinam and Alahari 2010, O'Dwyer, Ralton et al. 2011), les mécanismes d'adaptation des cellules à leurs environnements mécaniques restent encore peu connus. De nombreux travaux montrent que les cellules sont sensibles aux propriétés physiques de leurs substrats (Pelham and Wang 1997, Discher, Janmey et al. 2005) et que ces dernières sont capables de réguler des réponses cellulaires complexes comme l'adhérence, la migration, la différenciation et l'apoptose (Pelham and Wang 1997, Wang, Dembo et al. 2000, Engler, Bacakova et al. 2004, Georges and Janmey 2005, Engler, Sen et al. 2006, Levental, Georges et al. 2007, Wells 2008).

Afin d'étudier l'effet des propriétés physiques et mécaniques sur le comportement cellulaire au laboratoire, différents substrats ont été développés. Ces substrats sont des films multicouches de polyélectrolytes à

base de poly-L-lysine et d'acide hyaluronique. Ces films sont rigidifiés par l'ajout d'un nombre croissant de bicouches de polyélectrolytes synthétiques poly-(sodium 4-styrene sulfonate) et poly-(allylamine hydrochloride). De précédents travaux réalisés au laboratoire ont montré l'importance de la rigidité du substrat dans les activités nucléaires. Sur des substrats mous (50 kPa), l'absence de contacts focaux et de fibres de stress empêche la réplication mais pas la transcription (Kocgozlu, Lavallo et al. 2009). Ces faibles substrats génèrent également des instabilités chromosomiques caractérisées par des ponts chromosomiques et la perte de chromosomes menant dans la plupart des cas à la mort cellulaire. Les travaux effectués par Rabineau *et al.* ont également montré que les cellules cancéreuses étaient plus « résistantes » et parvenaient à continuer leur progression dans le cycle cellulaire malgré ces anomalies (Rabineau, Kocgozlu et al. 2013). Cette « résistance » est le point de départ de cette étude.

## 5.2 Article *en préparation*

## Soft matrix guides survival of colon cancer cells through chromatin structure remodeling.

Florence Flick<sup>†,§,⊥</sup>, Morgane Rabineau<sup>†,§,⊥</sup>, Eric Mathieu<sup>†,§,⊥</sup>, Isabelle Duluc<sup>⊥,¶</sup>, Bernard Sengert<sup>†,§,⊥</sup>, Philippe Lavallo<sup>†,§,⊥</sup>, Pierre Schaaf<sup>†,§,⊥</sup>, Jean-Noël Freund<sup>⊥,¶</sup>, Youssef Haikel<sup>†,§,⊥</sup> and Dominique Vautier<sup>†,§,⊥,\*</sup>.

<sup>†</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1121 “Biomaterials and Bioengineering”, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, France.

<sup>§</sup>Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, 8 rue Sainte Elisabeth, 67000 Strasbourg, France.

<sup>⊥</sup>Fédération de médecine translationnelle de Strasbourg.

<sup>¶</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1113 “Voies de signalisation du développement et du stress cellulaire dans les cancers digestifs et urologiques”, 3 avenue Molière, 67200 Strasbourg, France.

**KEYWORDS:** *Mechanobiology / Biomaterials / Polyelectrolyte multilayers / Substrate stiffness / Chromatin plasticity / TSA / Cancer / Metastatic dissemination.*

### INTRODUCTION

The colorectal cancer (CRC) results from disequilibrium between proliferation, differentiation and apoptosis in the intestinal epithelium that is permanently renewing. The gravity of CRC is essentially due to the capacity of tumor cells to escape from the primary tumor to form metastasis, notably in the liver. Recent studies suggest that metastases are due to a small fraction of cancer cells having acquired invading properties. During dissemination and their journey to the metastasis site, these invasive cells need to resist to drastic chemical and physical changes in their environment. For example, tumor cells have to survive in a relatively soft environment like blood or liquid lymph and to adhere again on a stiff target organ. Until now, most of the studies aiming to understand how cancer cells acquire invading properties focused on the impact of chemical changes of the environment such as cytokines, growth factors, matrikines<sup>1-3</sup> on tumor cells behavior. However, increasing attention was given to the impact of changing the physical properties of the environment on cancer cells. It has been evidenced that tissue stiffness guides tumor progression and can promote the malignant behavior<sup>4-8</sup>. Recent works on biomechanics of tumor revealed the attenuation of mechanosensitivity of human colon carcinoma cells that adopted a metastasis-like phenotype when cultured on soft hydrogel substrates<sup>9-11</sup>.

The open, active euchromatin fills up the majority of the nucleus whereas the condensed, inactive heterochromatin is restricted to an irregular rim located at the nuclear periphery and around the nucleolus as well as in patches throughout the nucleoplasm<sup>12</sup>. Histone acetyl transferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs) dynamically control the acetylation status of chromatin and hence the chromatin compaction<sup>13,14</sup>, by respectively loosening (euchromatin) or condensing (heterochromatin) chromatin structures.

Chromatin organization has a strong influence on gene-expression patterns<sup>15</sup> and chromatin remodeling contributes to many cellular properties as for instance cell pluripotency and cell differentiation<sup>16</sup>, as well as the process of malignant transformation. Specifically, changes in chromatin compaction induce the alterations in tumor suppressor genes or activation of pro-oncogenes needed for neoplastic progression<sup>17</sup>.

Our group previously developed a hydrogel based on polyelectrolyte multilayers, made of poly(L-lysine) and hyaluronic acid, (PLL/HA)<sub>24</sub>, capped with a poly(sodium styrene sulfonate)/poly(allylamine hydrochloride), (PSS/PAH)<sub>n</sub>, multilayer film, as matrix model mimicking the variable rigidity of the extracellular matrix<sup>18-20</sup>, on which epithelial PtK2 cells were grown. In this model, the rigidity of the hydrogel increases with the number *n* of PSS/PAH layer pairs<sup>21</sup>. We showed that on stiff substrates, chromatin is in its euchromatin form, whereas a soft substrate partially induced its remodeling in the heterochromatin form. On a very soft substrate, cells died by necrosis. We tried to direct the fate of PtK2 cells by modifying the organization of the chromatin. We used trichostatin A (TSA) that inhibits histone deacetylase, to maintain chromatin in its euchromatin state. We find that, on the very soft substrate, PtK2 cells treated by TSA maintain their chromatin in euchromatin, allowing cells to survive in a quiescence state without undergoing proliferation. Importantly, when transferred on a stiff substrate these cells retained their capacity to spread and to enter a novel mitotic cycle<sup>22</sup>.

Chromatin structure in cancer cells undergoes intense chromatin remodeling<sup>23</sup>. Indeed, this epigenetic reprogramming of the cancer cells is thought to be essential to gain tumorigenicity<sup>24</sup>. However, the precise conformation of cancer cell chromatin during metastasis dissemination remains largely unknown. To our knowledge, no studies have been addressed experimentally to know whether a change in the chromatin structure is induced by a soft matrix and whether relationships exist with cancer cell tumorigenicity. This question constitutes the main objective of this work. In this present work, we investigate if chromatin organization of SW480 colon cancer cells is affected when these cells are alternatively grown on soft and rigid polyelectrolyte multilayer substrates, simulating the process of metastasis dissemination, in which tumor cells face changing physical environments.

## MATERIALS AND METHODS

**Notations.** We shall use the short-hand notations  $E_{20}$  for the (PLL/HA)<sub>24</sub>-(PSS/PAH)<sub>1</sub> films.  $E_{20}$  is considered as a very soft substrate. The short-hand notations 1<sup>st</sup>  $E_{20}$ , 1<sup>st</sup>  $E_{20}$ -G, 2<sup>nd</sup>  $E_{20}$ , 2<sup>nd</sup>  $E_{20}$ -G, 3<sup>rd</sup>  $E_{20}$  and 3<sup>rd</sup>  $E_{20}$ -G are recapitulated in **Table 1**. A second notation TL was added when experiments were proceeded in video-microscopy (**Table 2**). The notation TSA was added when inhibition of histone deacetylase was performed.

**Chemical and cells.** Chemicals were used as received. Poly(L-lysine) (Product No: P2636) was obtained from Sigma Aldrich. Hyaluronic acid was purchased from LifeCore Synthetic polyelectrolytes for (PLL/HA) stiffening, Poly-(sodium4-styrene sulfonate) (PSS, Product No: 243051) and Poly-(allylamine hydrochloride) (PAH, Product No: 283215), were obtained from Sigma Aldrich.

SW480 cells (human colon carcinoma cells) were purchased from ATCC, maintained in polystyrene flasks at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in atmosphere with 95% humidity. The culture medium used was Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI1640) high glucose from Gibco Life Technology (Product No: 61870), and the supplement used was fetal bovine serum (10% v/v), hydrocortisone (2% v/v), GE418 (2,5% v/v) and insulin (0,125% v/v).

Fluorimetric Cell Viability Kit was purchased from Promokine and performed on SW480 cells.

**Construction of the (PLL/HA) film multilayer.** The multilayer buildup was performed on 12-mm diameter glass coverslips (VWR Scientific, Fontenay-sous-Bois, France) preliminarily cleaned with 10 mM SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) at 70°C during 15 min then extensively rinsed with milli-Q water, cleaned in 100

mM HCl (hydrochloric acid) preheated to 70°C during 15 min and finally extensively rinsed with milli-Q water, dried and autoclaved for 24 h.

The multilayer film buildup was performed with a dipping robot (dipping robot DR2, Riegler and Kirstein, GmbH, Berlin, Germany) equipped with two automated arms. On each arm is inserted a rack that can hold 6 glass coverslips. These racks are moved sequentially into the various solutions of polyelectrolytes (polycation PLL and polyanion HA solutions) prepared in 150 mM NaCl at a concentration of 1 mg/mL. The first layer was poly-(L-lysine). After the dipping step the film was washed in rinsing buffer for 5 min (150 mM NaCl buffer). The hyaluronic acid was deposited in the same way. The buildup process was continued until 24 PLL/HA pairs were deposited.

**Stiffening of (PLL/HA)<sub>24</sub> multilayer with (PSS/PAH)<sub>1</sub>.** For the capping, films built as described above were transferred into a 24-wells plate. The solutions of polyelectrolytes (polycation PSS and polyanion PAH) were prepared in 150 mM NaCl at a concentration of 1 mg/mL. A volume of 1 mL of PSS was deposited for 4 min on each film. Films were rinsed twice before a volume of 1 mL of PAH was deposited on each film also for 4 min. Films were rinsed twice with 150 mM then conserved at 4°C.

**Cell culture.** Cells were sub-cultured upon reaching 80% confluence (approximately 7 days), SW480 cells were first rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) and were detached with 5 mL trypsin (Product No: L0940-100 Dutscher, Brumath, France) then left in 1 mL during 5 min, resuspended in 10 mL supplemented RPMI1640 culture medium. The first seeding on  $E_{20}$  was realized at a concentration of  $1.10^5$  cells/cm<sup>2</sup>.

**Time-lapse video microscopy.** Cells were seeded on the different surfaces and cultured for 24 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> before the time-lapse experiment was carried out. Cell nuclei were labeled using a solution of Hoechst 33342 (1 mg/mL) diluted in 1:100 for 30 min. Film coated coverslips were mounted in a Ludin Chamber (Life Imaging Service, Basel, Switzerland). A layer of mineral oil (Sigma Aldrich) was added on top of the culture medium prior to imaging to prevent evaporation during the experiment. Images were acquired every 15 min for 24 h in phase contrast and fluorescence. Time-lapse sequences were performed using a Nikon TIE microscope equipped with a 40× PL DL PH2 (0.65 NA) objective. An Andor Zyla sCMOS camera was used together with Nikon NIS-Element AR software for image acquisition.

**Cells tracking.** NIS-Elements AR Analysis (Nikon) was used to track SW480 cells and evaluate their motility. Images treatment was done for the H42 channel. Contrast was adjusted on the whole sequence then a threshold was applied to select only cell nucleus. Only alive cell for the whole experiments were followed.

**Electron microscopy.** Cells were seeded on the different surfaces and cultured for 24 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> before the samples were fixed in 2% PFA - 2% glutaraldehyde in 50 mM cacodylate buffer at pH 7.4 for 2 h. Cells were fixed in 1% osmium tetroxide in 125 mM cacodylate for 30 min. Samples were dehydrated in successive solutions with gradually increasing concentration of ethanol (50, 70, 95 and 100%) three times for 15 min in each solutions. Cells in contact with polyelectrolyte multilayer or glass for 24 h were included in epoxy resin (48.2% epon 812, 34% anhydride nadic methyl, 16.4% anhydride [2-dodeceny] succinic, and 1.5% 2,4,6-tris dimethylaminoethyl phenol) for 48 h at 60°C. After resin polymerization, in order to be able to cut them, a heat shock was first performed to remove glass coverslips. Ultra-thin cross sections (100 nm) were performed using an automatic ultramicrotome (Ultracut-E Ultramicrotome, Reichert Jung, USA). Sections containing the median plane of the nucleus with the nucleolus were selected for observations. Sections were stained with 5% uranyl acetate for 20 min, then with 4% lead citrate for 10 min. The specimens were observed with a transmission electron microscope EM208 (FEI Compagny, Philips, Netherlands) operating with an accelerating voltage of 70 kV. Images were captured on argentic SO163 Kodak films.

**Cell culture.** Cells were sub-cultured upon reaching 80% confluence (approximately 7 days), PtK2 cells were first rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) and were detached with 5 mL EDTA-trypsin (Product N°: L0940-100, Dominique Dutscher) then leave in 1mL during 5min, resuspended in 10 ml DMEM + (supplemented culture medium). We realized centrifugation during 5min at 1000 rpm then we have eliminated the

supernatant, and we added 10ml of serum free medium. For all experiments cells were adhered in serum free medium, seeded at an approximate density of  $10^5$  cells/cm<sup>2</sup> on wells of three different conditions: EDC, EDC-MAL-RGD, and Glass Slides) and allowed to adhere for 4h. After adhesion, surfaces were washed twice in PBS to remove unattached or weakly attached cells, and the remaining cells were fixed and permeabilized in 4% paraformaldehyde (Product N°: 1571, Euromedex) and 0.1% Triton X-100 in PBS respectively for 15 min, the samples were washed with PBS, and blocked with 10% FBS (Invitrogen) in PBS overnight in 10%.

**Morphological analysis.** ImageJ was used to analyze the proportion of heterochromatin on the nuclear surface of electron microscopy images. Between 10 and 20 cells nuclei were analyzed for each conditions. To determine the proportion of heterochromatin on the nuclear surface, we used a stereological method. After delimitation of the nuclear compartment and computation of its area in pixels, the area of heterochromatin was determined by applying an intensity threshold on filtered images by Gaussian blur of a radius 2. The percentage of heterochromatin on the nuclear surface was the ratio of the heterochromatin area to the total nuclear area (**SI - Figure I**).

**Apoptotic, necrotic, healthy cells assay.** Cells were seeded on surfaces at  $1.10^5$  per cm<sup>2</sup>. Apoptotic, necrotic and healthy cells were carried out using the apoptotic / necrotic / healthy cells detection Kit according to the manufacturer's instructions. Cells were observed by fluorescence microscopy

## RESULTS AND DISCUSSION

### Substrate stiffness as a function of EDC concentration.

We studied the ability of SW480 cells to survive after alternative growth on soft and rigid polyelectrolyte multilayer substrates. SW480 cells were seeded and cultured during 24 h on the soft substrate (20 kPa termed  $E_{20}$  and **SI - Figure II**). Fluorescent apoptotic-necrotic-healthy assay showed that  $95.3 \pm 1.2$  % of the cells on  $E_{20}$  were positive in ethidium homodimer III (EthD-III) necrotic signal (**Figure 1 A.**). SW480 cells surviving on  $E_{20}$  adopted a round shaped morphology (**Figure 1 B.**). SW480 cells surviving on  $E_{20}$  and transferred on a stiff substrate (glass: 1<sup>st</sup>  $E_{20}$ -G) were able to adhere and proliferate to reach confluence after one or two weeks of culture showing rounded or spread shaped morphologies (**SI - Figure III**). These SW480 cells amplified on glass were a second time seeded on  $E_{20}$ . Interestingly, apoptotic-necrotic-healthy assay showed that  $87.1 \pm 2.1$  % of the SW480 cells were positive for EthD-III (**Figure 1 A.**), revealing an increase of the cell survival to  $12.9 \pm 2.1$  % after a second 24 h of culture on  $E_{20}$  (2<sup>nd</sup>  $E_{20}$ ). These cells display rounded or spread shaped morphologies (**Figure 1 B.**). The SW480 cells surviving to the 2<sup>nd</sup>  $E_{20}$  were transferred on glass for amplification and then cultured for 24 h on  $E_{20}$  (3<sup>rd</sup>  $E_{20}$ ). The percentage of surviving cells after the third seeding on  $E_{20}$  increases to  $45.7 \pm 5.5$  % (**Figure 1 A.**). The SW480 cells surviving on 3<sup>rd</sup>  $E_{20}$  were transferred on glass for amplification and then cultured for 24 h on  $E_{20}$  (4<sup>th</sup>  $E_{20}$ ). The percentage of surviving cells after the fourth seeding on  $E_{20}$  increases to  $84.7 \pm 2.1$  % (**Figure 1 A.**). After the third and fourth seeding on  $E_{20}$  SW480 cells showed rounded and spread shape morphologies (**Figure 1 B.**). We noted that proliferation of SW480 cells after the second and third transfer on glass was much faster than that observed after the first transfer on glass (*data not shown*). Is there a mutation responsible for this survival behavior as could be suggested by previous results? Indeed, our team revealed that SW480 cells displayed an increasing frequency in chromosomal segregation abnormalities when cultured on synthetic matrices with decreasing stiffness. Although decreasing stiffness correlates with increasing cell lethality, a small proportion of SW480 cancer cells survive, even when bearing abnormal chromosome segregation, achieve mitosis and undergo a new cycle of replication<sup>24</sup>. These surviving SW480 cells could generate new chromosomal rearrangements accentuating the pathogenicity of cells at the origin of metastases. However, SW480 cells from  $E_{20}$  or from the sequence 4<sup>th</sup>  $E_{20}$  seeded on  $E_{20}$ , without previous transfer and proliferation on glass were unable to sur-

vive (SI - Figure III). This result show that to observe survival on  $E_{20}$ , seeding on  $E_{20}$  should always be preceded by SW480 culture on glass. These results suggested strongly that the increased survival observed after the successive seeding of SW480 cells on soft substrates, alternated by an amplification of cells on glass (Figure 1) is probably due to a progressive adaptation process rather than a mutation. Indeed, mutations events should lead to a higher percentage of surviving cells from the second transfer on  $E_{20}$ .

#### Motility of SW480 cells on soft substrates.

To investigate if the increase of survival of SW480 cells after alternative growth on soft and rigid substrates is accompanied by changes in cell motility, SW480 cells were monitored by video-microscopy. SW480 cells were cultured for 24 hours on  $E_{20}$ , then followed for 24 h by video-microscopy. This observation showed that cells massively died during the first 4 h through a lytic process as indicated by the progressive release of cytoplasmic and nuclear material in the culture medium (Figure 2, movie 1). The few SW480 cells that survived have a migration speed of about  $0.94 \pm 0.04 \cdot 10^{-3} \mu\text{m/s}$  (Figure 3). The surviving cells on  $E_{20}$  were amplified on glass and cultured for 24 h a second time on  $E_{20}$ . Live cell imaging revealed that cells having spent 24 h to 48 h on  $E_{20}$  ( $2^{\text{nd}} E_{20}^{\text{TL}}$ ) adopted rounded or spread morphologies (Figure 4, movie 2). Very interestingly, among the round cells, some cells were able to spread and reversibly become round and spread again without entering a novel mitotic cycle (Figure 4, movie 2). The transition from the round to the spread morphology and reciprocally was accompanied by the development of numerous and large extending and retracting protrusion (Figure 4, movie 2). Some SW480 cells progress in mitosis (Figure 4, movie 3). SW480 cells seeded on  $2^{\text{nd}} E_{20}^{\text{TL}}$  showed migration speed of  $1.03 \pm 0.017 \cdot 10^{-3} \mu\text{m/s}$  increasing 1.04 time compared to the migration speed on  $E_{20}$  (Figure 3). The SW480 cells surviving on  $2^{\text{nd}} E_{20}$  were transferred on glass for amplification and cultured for 24 h on  $E_{20}$  ( $3^{\text{rd}} E_{20}^{\text{TL}}$ ) and monitored 24 h with video-microscopy. Similarly to the previous condition, on the  $3^{\text{rd}} E_{20}^{\text{TL}}$  SW480 cells displayed round or spread shaped morphologies (Figure 5, movie 4). Some of these cells spread, became rounded and spread again without entering in a novel mitotic cycle (Figure 5, movie 4). Some SW480 cells progress in mitosis (Figure 5, movie 5). Migration speed of these cells was  $1.48 \pm 0.27 \cdot 10^{-3} \mu\text{m/s}$  increasing 1.5 time compared to the migration speed on the  $2^{\text{nd}} E_{20}^{\text{TL}}$  (Figure 3). These results indicate that increased survival observed on  $2^{\text{nd}} E_{20}^{\text{TL}}$  and  $3^{\text{rd}} E_{20}^{\text{TL}}$  is accompanied for these cells by an increase of their migration speed suggesting that these cells during the in vitro process of metastasis dissemination undergo an epithelial-mesenchymal transition. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is critical for carcinogenesis, tumor invasion, metastasis, chemo-resistance and acquisition of stem cell properties.<sup>25</sup>

#### Chromatin structure during the in vitro process of metastasis.

To investigate if the increase of survival and the increase of migration speed of SW480 cells after alternated growth on soft and rigid substrates are accompanied by changes in chromatin structure, SW480 cells were observed by electron microscopy. On glass, SW480 cells displayed euchromatin uniformly distributed within the nucleus (Figure 6 A.), with a thin layer of heterochromatin at the nuclear periphery. Quantification indicated that the nuclei contained  $15.06 \pm 2.2\%$  of heterochromatin (Figure 6 B.). SW480 cells on  $E_{20}$  showed alterations of chromatin organization (Figure 6 A.), such as increasing heterochromatin content rising to about  $19.82 \pm 2.3\%$  (Figure 6 B.) with aggregates and loss of its characteristic peripheral positioning, a well-known manifestation of CRC<sup>17,22,23,26</sup>. When cells cultured on  $E_{20}$  were transferred on glass for amplification and next transferred for 24 h on  $E_{20}$ , they displayed a similar organization of chromatin in their nuclei (Figure 6 A.), with heterochromatin representing  $20.44 \pm 2.88\%$  (Figure 6 B.) of the chromatin content with clump size and loss of its characteristic peripheral positioning. The SW480 cells surviving on  $2^{\text{nd}} E_{20}$  were transferred on glass for amplification and then cultured for 24 h on  $E_{20}$  ( $3^{\text{rd}} E_{20}$ ). In clear contrast, the percentage of heterochromatin reached a level as low as about  $7.3 \pm 0.78\%$  (Figure 6 B.), which should be

compared to the  $15.06 \pm 2.2\%$ ,  $19.8 \pm 2.3\%$  and  $20.44 \pm 2.88\%$  obtained on glass, on  $E_{20}$  and on the 2<sup>nd</sup>  $E_{20}$ , respectively. From the first to the second seeding on  $E_{20}$ , the increase in SW480 cells survival and migration speed is accompanied by an important percentage of heterochromatin inside the nucleus. From the second to the third seeding on  $E_{20}$  the percentage of cell survival and the migration speed continued to increase, whereas a spectacular chromatin remodeling was observed with an increase of the euchromatin percentage. A loose chromatin conformation in terms of ultrastructure might be linked to cellular potency<sup>27,28</sup>. The large-scale remodeling in chromatin organization may alter the diffusion of macromolecules inside the nucleoplasm for which euchromatin exposes a large surface to nuclear proteins than heterochromatin and consequently increased the chromatin's accessibility to transcriptionally active compartment underlying epigenetic reprogramming.<sup>29</sup>

#### Inhibition of HDAC on soft matrix.

Compared to the 1<sup>st</sup> seeding on  $E_{20}$ , we observed that SW480 cell cultured on 2<sup>nd</sup>  $E_{20}$  increase their survival, migration speed and percentage of heterochromatin inside the nucleus. Recently, Cherkezyan *et al.* showed that increase in heterochromatin content of colon cancer cells represent the initial steps of tumorigenesis.<sup>23</sup> To try to establish whether increase of SW480 cells survival and migration speed observed on 2<sup>nd</sup>  $E_{20}$  are linked to their high percentage of nuclear heterochromatin the following experiment was performed.

The SW480 cells surviving on the 1<sup>st</sup> seeding on  $E_{20}$ , transferred and amplified on glass during one or two week were 24h pre-incubated with trichostatin (TSA) before transferring on 2<sup>nd</sup>  $E_{20}$  for 24h of culture. TSA is a classical histone deacetylase inhibitor that preserves acetylated histone maintaining chromatin its euchromatin form. In this condition, the **Figure 7** shows that on 2<sup>nd</sup>  $E_{20}^{TSA}$  the percentage of heterochromatin of the SW480 cells reached a level as low as about  $5.33 \pm 0.96\%$ , which should be compared to the  $20.44 \pm 2.88\%$  obtained on 2<sup>nd</sup>  $E_{20}$  without TSA. We note that the percentage of surviving cells on 2<sup>nd</sup>  $E_{20}^{TSA}$  (*data not shown*) was similar to the percentage of surviving cells on 2<sup>nd</sup>  $E_{20}$  (*data not shown*). However, it is remarkable to observe that the speed migration was significantly higher on 2<sup>nd</sup>  $E_{20}^{TSA}$  ( $1.5 \pm 0.038 \cdot 10^{-3} \mu\text{m/s}$ ) compared to that on 2<sup>nd</sup>  $E_{20}$  ( $1.04 \pm 0.017 \cdot 10^{-3} \mu\text{m/s}$ ) (**Figure 8**). Live-cell imaging showed that on 2<sup>nd</sup>  $E_{20}^{TSA}$  SW480 cells displayed rounded or spread morphologies with the formation of numerous and large extending and retracting protrusions (**Figure 9, Movie 6**) similar to those observed on 2<sup>nd</sup>  $E_{20}$  without TSA. To strengthen these observations, we investigated by the same type of experience the migration speed of SW480 cells on 3<sup>rd</sup>  $E_{20}^{TSA}$  (**Figure 9, Movie 7**). Interestingly, we observed that the migration speed was significantly higher on 3<sup>rd</sup>  $E_{20}^{TSA}$  ( $2.43 \pm 0.051 \cdot 10^{-3} \mu\text{m/s}$ ) compared to that on 2<sup>nd</sup>  $E_{20}^{TSA}$  ( $1.5 \pm 0.038 \cdot 10^{-3} \mu\text{m/s}$ ) (**Figure 8**).

Together, these results demonstrate that whereas high percentage of nuclear heterochromatin on 2<sup>nd</sup>  $E_{20}$  is accompanied by increase of SW480 cells survival and migration speed, high percentage of nuclear euchromatin on 2<sup>nd</sup>  $E_{20}^{TSA}$ , 3<sup>rd</sup>  $E_{20}^{TSA}$  and 3<sup>rd</sup>  $E_{20}$  without TSA is associated by a higher increase of migration speed. Because migration speed can be considered as an indicator of tumor cell aggressiveness, our results suggested that from the 1<sup>st</sup> to 2<sup>nd</sup>  $E_{20}$  seeding, SW480 cells respond to an early in vitro process of metastasis dissemination heterochromatin-dependent. Spectacularly, from the 3<sup>rd</sup>  $E_{20}$  seeding, SW480 cells respond to a late process of metastasis dissemination euchromatin-dependent.

## REFERENCES

- 1 Rathinam, R. & Alahari, S. K. Important role of integrins in the cancer biology. *Cancer and Metastasis Reviews* **29**, 223-237 (2010).

- 2 Markowitz, S. D. & Bertagnolli, M. M. Molecular Origins of Cancer: Molecular Basis of Colorectal Cancer. *The New England journal of medicine* **361**, 2449-2460 (2009).
- 3 O'Dwyer, D., Ralton, L. D., O'Shea, A. & Murray, G. I. The Proteomics of Colorectal Cancer: Identification of a Protein Signature Associated with Prognosis. *PLoS ONE* **6**, e27718 (2011).
- 4 Paszek, M. J. *et al.* Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* **8**, 241-254 (2005).
- 5 Levental, K. R. *et al.* Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. *Cell* **139**, 891-906 (2009).
- 6 Pathak, A. & Kumar, S. Biophysical regulation of tumor cell invasion: moving beyond matrix stiffness. *Integrative Biology* **3**, 267-278 (2011).
- 7 Kumar, S. & Weaver, V. M. Mechanics, malignancy, and metastasis: The force journey of a tumor cell. *Cancer metastasis reviews* **28**, 113-127 (2009).
- 8 Liu, J. *et al.* Soft fibrin gels promote selection and growth of tumorigenic cells. *Nat Mater* **11**, 734-741 (2012).
- 9 Tang, X. *et al.* Attenuation of Cell Mechanosensitivity in Colon Cancer Cells during *In Vitro* Metastasis. *PLoS ONE* **7**, e50443 (2012).
- 10 Tang, X. *et al.* Mechanical Force Affects Expression of an *In Vitro* Metastasis-Like Phenotype in HCT-8 Cells. *Biophysical Journal* **99**, 2460-2469 (2010).
- 11 Tang, X. *et al.* A mechanically-induced colon cancer cell population shows increased metastatic potential. *Molecular Cancer* **13**, 131-131 (2014).
- 12 Reddy, K. L., Zullo, J. M., Bertolino, E. & Singh, H. Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature* **452**, 243-247 (2008).
- 13 Dillon, N. & Festenstein, R. Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends in Genetics* **18**, 252-258 (2002).
- 14 Kouzarides, T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* **128**, 693-705 (2007).
- 15 Badeaux, A. I. & Shi, Y. Emerging roles for chromatin as a signal integration and storage platform. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 211-224 (2013).
- 16 Meshorer, E. & Misteli, T. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 540-546 (2006).
- 17 Lao, V. V. & Grady, W. M. Epigenetics and colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **8**, 686-700 (2011).
- 18 Kocgozlu, L. *et al.* Selective and uncoupled role of substrate elasticity in the regulation of replication and transcription in epithelial cells. *Journal of Cell Science* **123**, 29-39 (2009).
- 19 Mertz, D. *et al.* Mechanotransductive surfaces for reversible biocatalysis activation. *Nat Mater* **8**, 731-735 (2009).
- 20 Francius, G. *et al.* Stiffening of soft polyelectrolyte architectures by multilayer capping evidenced by viscoelastic analysis of AFM indentation measurements. *The Journal of Physical Chemistry C* **111**, 8299-8306 (2007).
- 21 Rabineau, M. *et al.* Cell guidance into quiescent state through chromatin remodeling induced by elastic modulus of substrate. *Biomaterials* **37**, 144-155 (2015).
- 22 Zink, D., Fischer, A. H. & Nickerson, J. A. Nuclear structure in cancer cells. *Nat Rev Cancer* **4**, 677-687 (2004).
- 23 Cherkezyan, L. *et al.* Nanoscale changes in chromatin organization represent the initial steps of tumorigenesis: a transmission electron microscopy study. *BMC Cancer* **14**, 1-10 (2014).
- 24 Rabineau, M. *et al.* Contribution of Soft Substrates to Malignancy and Tumor Suppression during Colon Cancer Cell Division. *PLoS ONE* **8**, e78468 (2013).
- 25 Xue, C., Plieth, D., Venkov, C., Xu, C. & Neilson, E. G. The Gatekeeper Effect of Epithelial-Mesenchymal Transition Regulates the Frequency of Breast Cancer Metastasis. *Cancer Research* **63**, 3386-3394 (2003).
- 26 Stypula-Cyrus, Y. *et al.* HDAC Up-Regulation in Early Colon Field Carcinogenesis Is Involved in Cell Tumorigenicity through Regulation of Chromatin Structure. *PLoS ONE* **8**, e64600 (2013).

- 27 Bošković, A. *et al.* Higher chromatin mobility supports totipotency and precedes pluripotency in vivo. *Genes & Development* **28**, 1042-1047 (2014).
- 28 Ishiuchi, T. *et al.* Early embryonic-like cells are induced by downregulating replication-dependent chromatin assembly. *Nat Struct Mol Biol* **22**, 662-671 (2015).
- 29 Bancaud, A. *et al.* Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin. *The EMBO Journal* **28**, (2009).

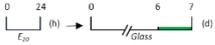
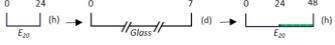
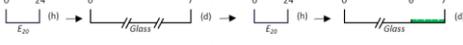
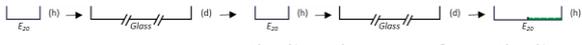
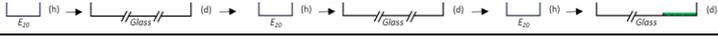
**Table 1**

Notations and sequences of the different conditions.

Notation	Sequence	Condition
1 <sup>st</sup> $E_{20}$	$E_{20}$	First passage on $E_{20}$
1 <sup>st</sup> $E_{20} - G$	$E_{20} - \text{Glass}$	First passage glass ending
2 <sup>nd</sup> $E_{20}$	$E_{20} - \text{Glass} - E_{20}$	Second passage on $E_{20}$ after a first alternated passages on $E_{20}$ and glass
2 <sup>nd</sup> $E_{20} - G$	$[E_{20} - \text{Glass}]_2$	Second passage glass ending on $E_{20}$ after a first alternated passages on $E_{20}$ and glass
3 <sup>rd</sup> $E_{20}$	$[E_{20} - \text{Glass}]_2 - E_{20}$	Third passage on $E_{20}$ after 2 alternated passages on $E_{20}$ and glass
3 <sup>rd</sup> $E_{20} - G$	$[E_{20} - \text{Glass}]_3$	Third passage glass ending on $E_{20}$ after 2 alternated passages on $E_{20}$ and glass
4 <sup>th</sup> $E_{20}$	$[E_{20} - \text{Glass}]_3 - E_{20}$	Fourth passage on $E_{20}$ after 3 alternated passages on $E_{20}$ and glass
4 <sup>th</sup> $E_{20} - G$	$[E_{20} - \text{Glass}]_4$	Fourth passage glass ending on $E_{20}$ after 3 alternated passages on $E_{20}$ and glass

**Table 2**

Conditions and timing of the video-microscopy experiments. (h): hours; (d): days. Highlighted in green, the timing for which the video-microscopy was proceeded.

Notation	Sequence	Condition
G	Glass	
1 <sup>st</sup> $E_{20}^{\text{TL}}$	$E_{20}$	
1 <sup>st</sup> $E_{20} - G^{\text{TL}}$	$E_{20} - \text{Glass}$	
2 <sup>nd</sup> $E_{20}^{\text{TL}}$	$E_{20} - \text{Glass} - E_{20}$	
2 <sup>nd</sup> $E_{20} - G^{\text{TL}}$	$[E_{20} - \text{Glass}]_2$	
3 <sup>rd</sup> $E_{20}^{\text{TL}}$	$[E_{20} - \text{Glass}]_2 - E_{20}$	
3 <sup>rd</sup> $E_{20} - G^{\text{TL}}$	$[E_{20} - \text{Glass}]_3$	

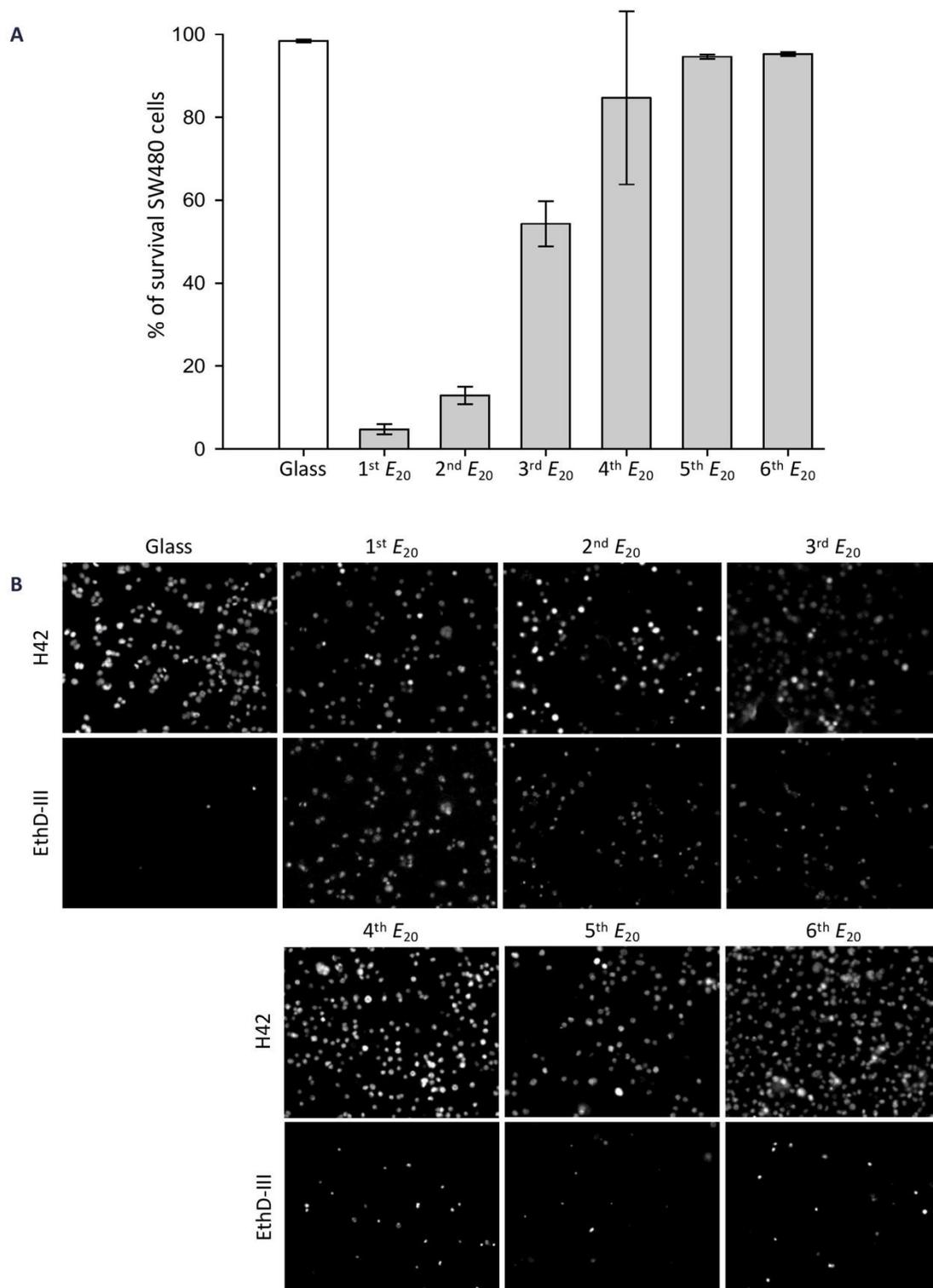


Figure 1 | Apoptotic, necrotic and healthy cells to respect 1<sup>st</sup>  $E_{20}$ , 2<sup>nd</sup>  $E_{20}$ , 3<sup>rd</sup>  $E_{20}$ , 4<sup>th</sup>  $E_{20}$ , 5<sup>th</sup>  $E_{20}$  and 6<sup>th</sup>  $E_{20}$ . A) Cells after 24 h of culture on successive seeding on  $E_{20}$  analyzed with the apoptotic/necrotic healthy cells detection kit (PromoKine) using ImageJ. B) For each condition, same cells population with Hoechst 33342 et EthD-III. Results from three independent experiments (the errors bars represent the s.e.m.).

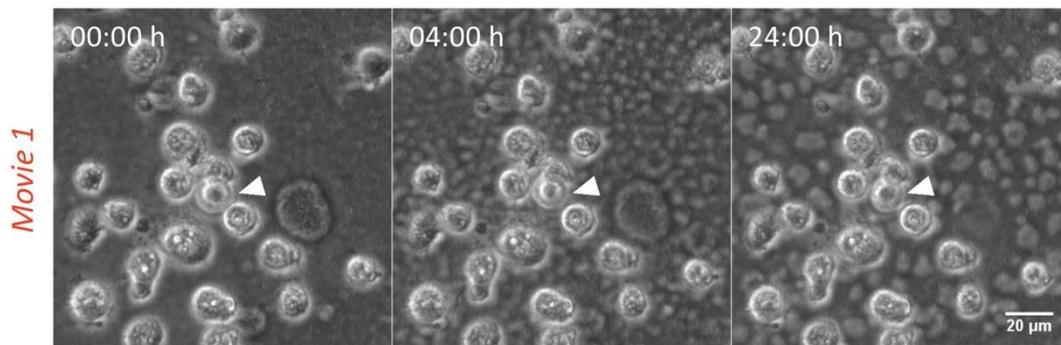


Figure 2 | Time-lapse monitoring representative images of cells dying massively on 1<sup>st</sup>  $E_{20}^{TL}$  for two independent experiments. Images in phase contrast were taken every 15 min during 24 h of culture. Surviving cell (arrow).

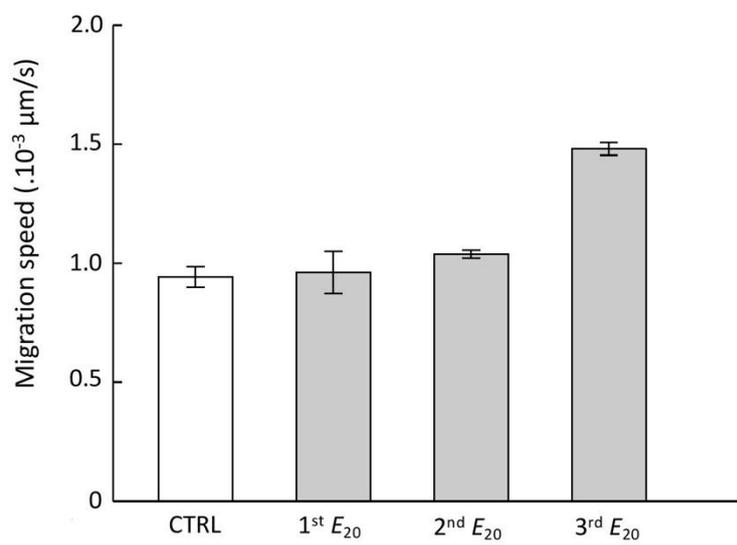


Figure 3 | Migration speed from time-lapse experiments with respect to 1<sup>st</sup>  $E_{20}$ , 2<sup>nd</sup>  $E_{20}$  and 3<sup>rd</sup>  $E_{20}$  analyzed by NIS-Elements AR Analysis.

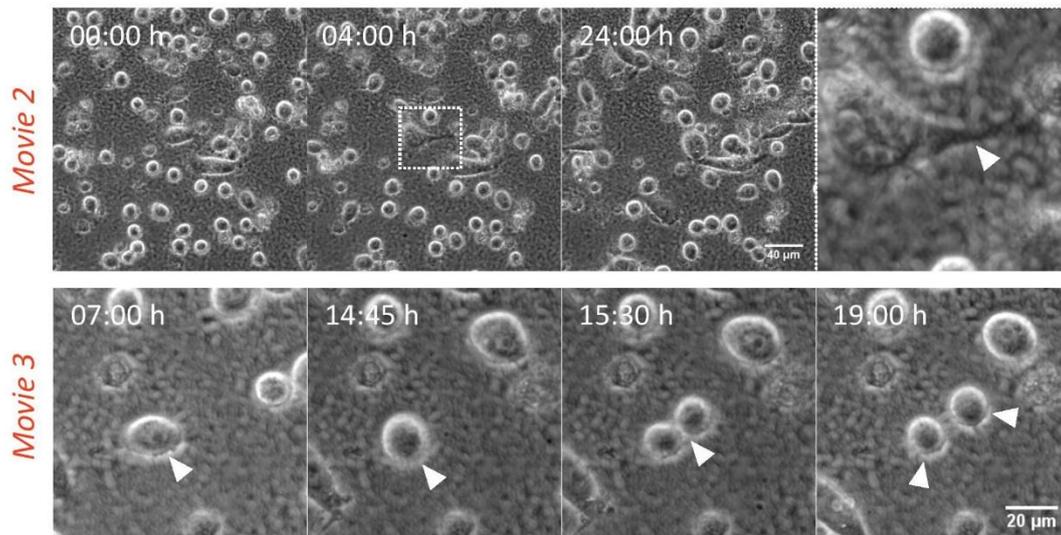


Figure 4 |Time-lapse monitoring representative images of cells dying massively on 2<sup>nd</sup>  $E_{20}^{TL}$  for two independent experiments. Images in phase contrast were taken every 15 min during 24 h of culture. Movie 2: Surviving cells, inset enlargement of 04:00 h showing cell with protrusion (arrow). Movie 3: dividing cell (arrow).

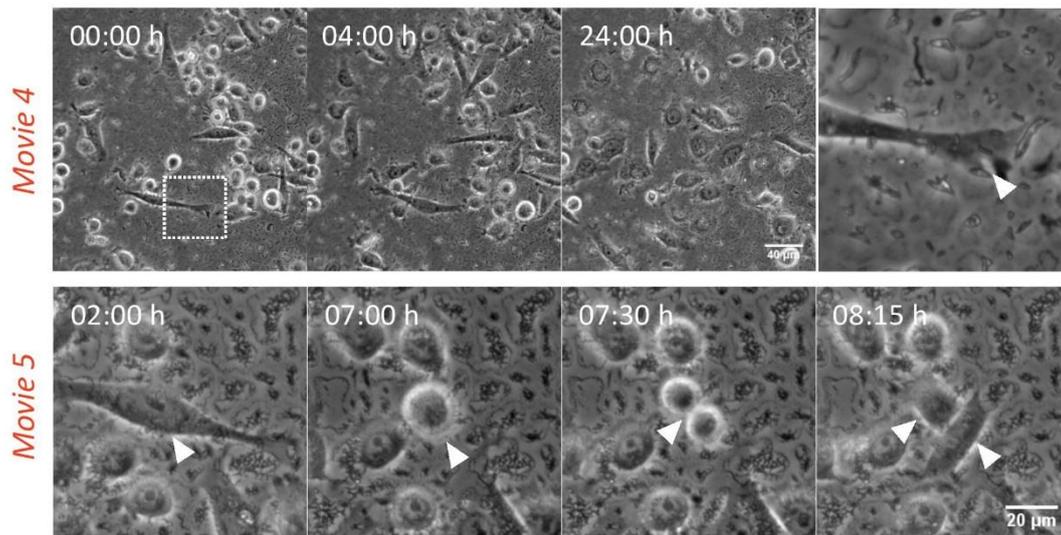
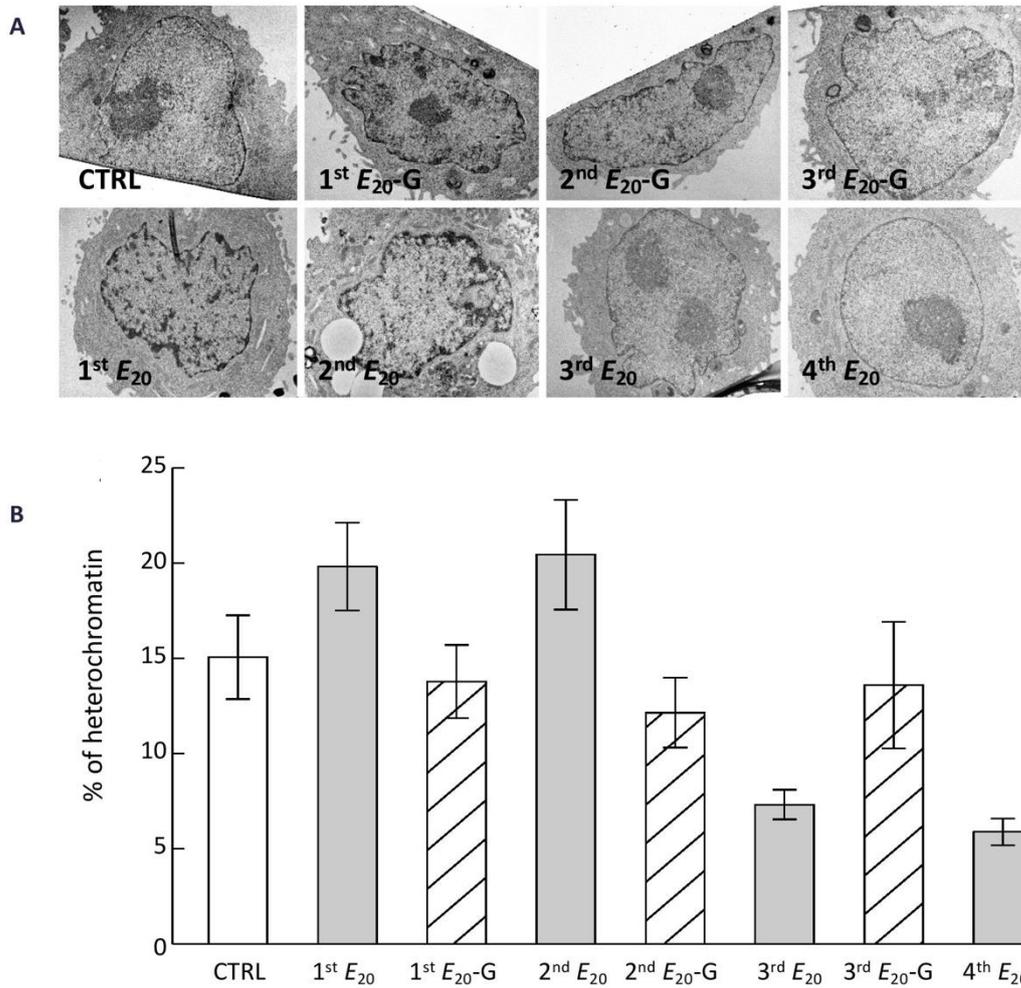
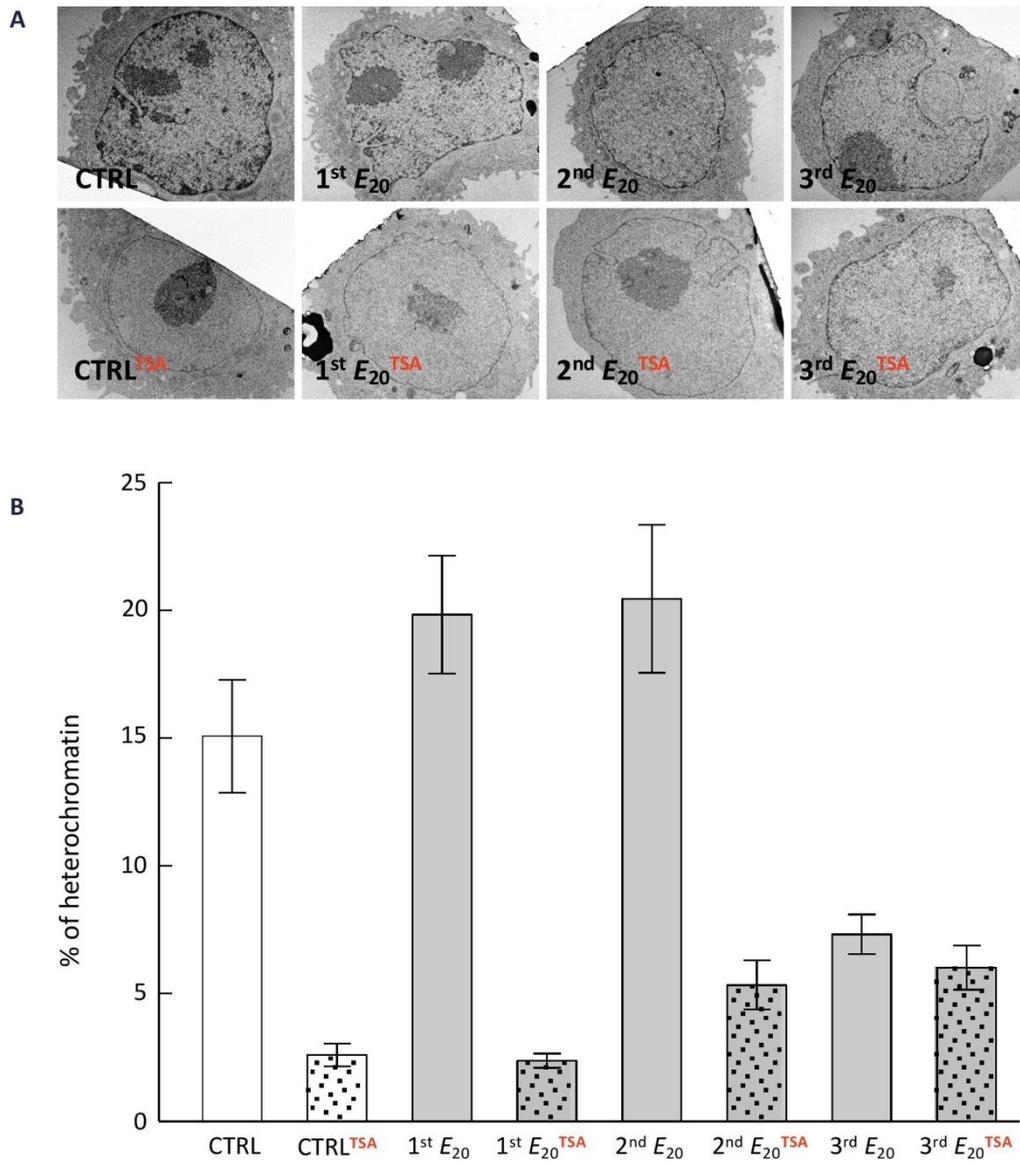


Figure 5 |Time-lapse monitoring representative images of cells dying massively on 3<sup>rd</sup>  $E_{20}^{TL}$  for two independent experiments. Images in phase contrast were taken every 15 min during 24 h of culture. Movie 4: Surviving cells, inset enlargement of 00:00 h showing cell with protrusion (arrow). Movie 5: dividing cell (arrow).



**Figure 6 | Ultrastructure of SW480 cells in regard to 1<sup>st</sup> E<sub>20</sub>, 1<sup>st</sup> E<sub>20</sub>-G, 2<sup>nd</sup> E<sub>20</sub>, 2<sup>nd</sup> E<sub>20</sub>-G, 3<sup>rd</sup> E<sub>20</sub>, 3<sup>rd</sup> E<sub>20</sub>-G and 4<sup>th</sup> E<sub>20</sub>. A) Representative image after 24 h of culture. Top line: on glass, on 1<sup>st</sup> E<sub>20</sub>-G, on 2<sup>nd</sup> E<sub>20</sub>-G and 3<sup>rd</sup> E<sub>20</sub>-G. Bottom line: 1<sup>st</sup> E<sub>20</sub>, 2<sup>nd</sup> E<sub>20</sub>, 3<sup>rd</sup> E<sub>20</sub> and 4<sup>th</sup> E<sub>20</sub>. B) Percentage of heterochromatin on the nuclear surface of SW480 cells from A on two pooled independent experiments (the errors bars represent the s.e.m.).**



**Figure 7 | Ultrastructure of SW480 cells in regard to 1<sup>st</sup> E<sub>20</sub>, 1<sup>st</sup> E<sub>20</sub><sup>TSA</sup>, 2<sup>nd</sup> E<sub>20</sub>, 2<sup>nd</sup> E<sub>20</sub><sup>TSA</sup>, 3<sup>rd</sup> E<sub>20</sub>, and 3<sup>rd</sup> E<sub>20</sub><sup>TSA</sup>. A) Representative image after 24 h of culture. Top line: on glass, on 1<sup>st</sup> E<sub>20</sub>, on 2<sup>nd</sup> E<sub>20</sub> and 3<sup>rd</sup> E<sub>20</sub>. Bottom line: glass<sup>TSA</sup>, 1<sup>st</sup> E<sub>20</sub><sup>TSA</sup>, 2<sup>nd</sup> E<sub>20</sub><sup>TSA</sup>, and 3<sup>rd</sup> E<sub>20</sub><sup>TSA</sup>. B) Percentage of heterochromatin on the nuclear surface of SW480 cells from A on two pooled independent experiments (the error bars represent the s.e.m.).**

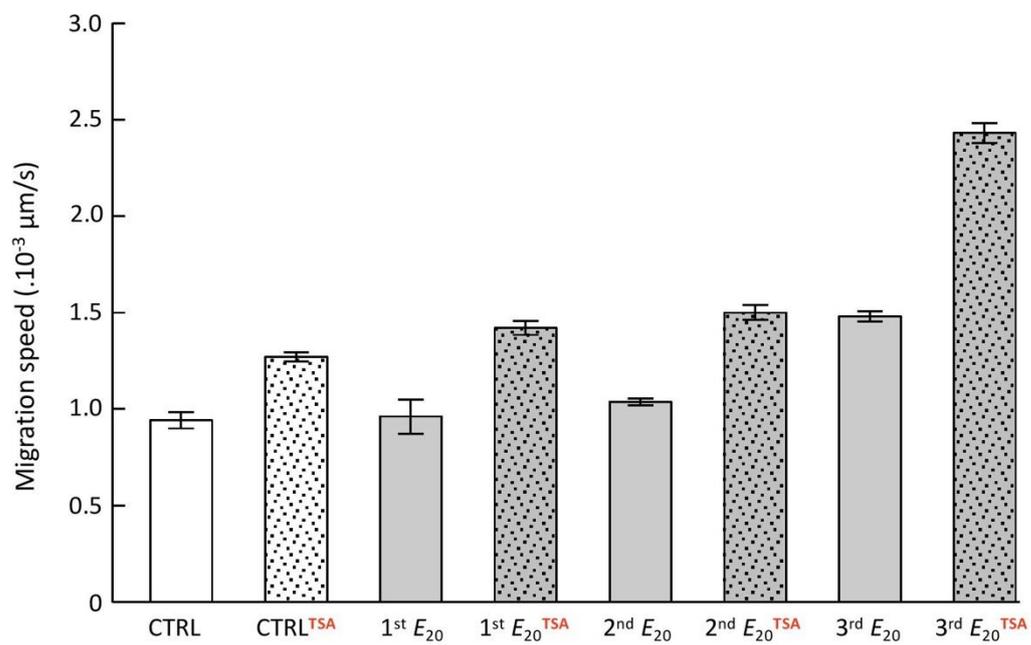


Figure 8 | Migration speed from time-lapse experiments with respect to glass (CTRL), glass<sup>TSA</sup> (CTRL<sup>TSA</sup>), 1<sup>st</sup> E<sub>20</sub>, 1<sup>st</sup> E<sub>20</sub><sup>TSA</sup>, 2<sup>nd</sup> E<sub>20</sub>, 2<sup>nd</sup> E<sub>20</sub><sup>TSA</sup>, 3<sup>rd</sup> E<sub>20</sub> and 3<sup>rd</sup> E<sub>20</sub><sup>TSA</sup> analyzed by NIS-Elements AR Analysis.

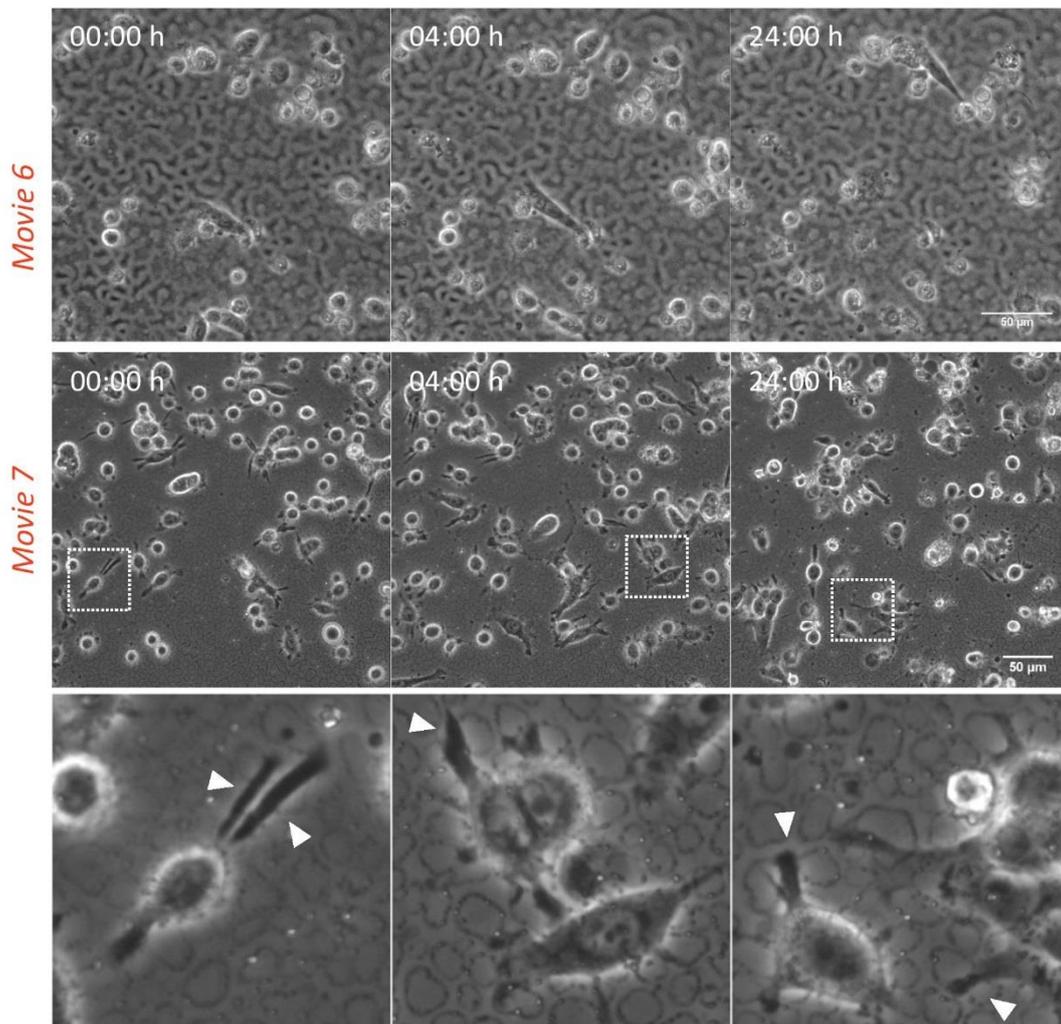
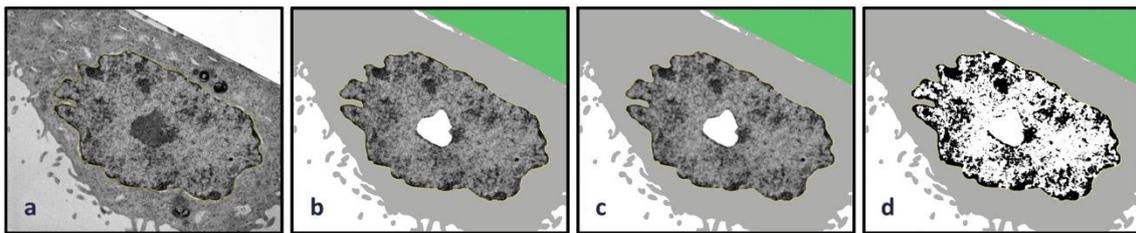
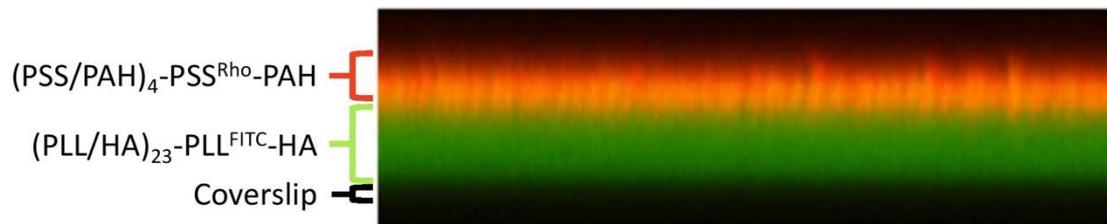


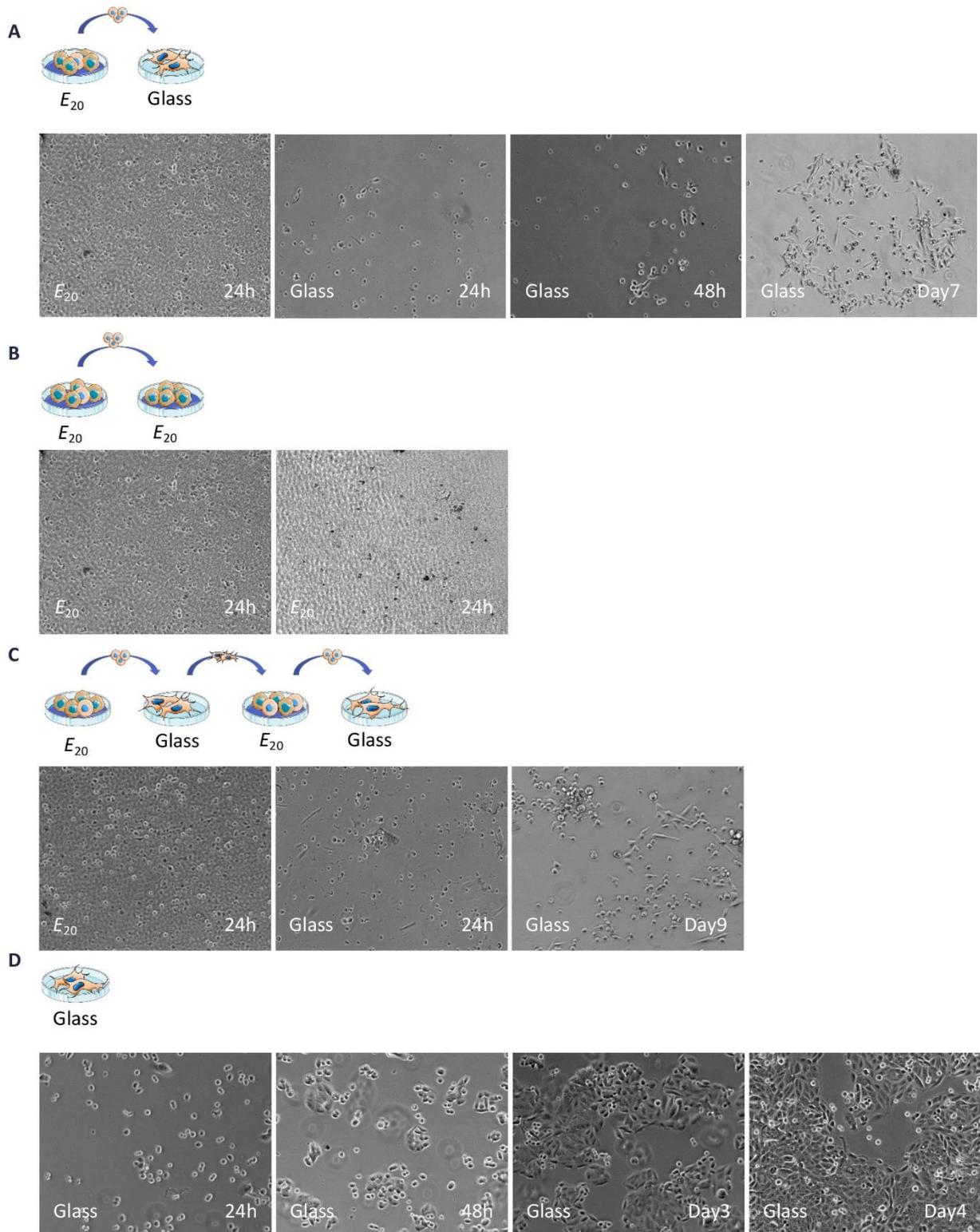
Figure 9 |Time-lapse monitoring representative images of cells dying massively on 2<sup>nd</sup> E<sub>20</sub><sup>TSA</sup> (Movie 6) and 3<sup>rd</sup> E<sub>20</sub><sup>TSA</sup> (Movie 7) two independent experiments. Images in phase contrast were taken every 15 min during 24 h of culture. Movie 7: inset enlargement of 00:00 h, 04:00 h and 24:00 h showing cell with protrusion (arrow).



SI - Figure I |Cartoon showing the treatment of ultrastructure image by ImageJ for quantified percentage of heterochromatin in black on the nuclear surface. a) nucleus contouring, b) deletion of nucleolus, c) application of a Gaussian blur of radius 2 and d) application of a threshold.



SI - Figure II | Vertical image section of a  $(PLL/HA)_{23}-PLL^{FITC}-HA-(PSS/PAH)_4-PSS^{Rho}-PAH$  multilayered film observed by CLSM.



SI - Figure III | SW480 cell morphology with respect A) 1<sup>st</sup>  $E_{20}$ -G, B) 2<sup>nd</sup>  $E_{20}$  -  $E_{20}$ , C) 2<sup>nd</sup>  $E_{20}$  - G and D) Glass. Representative images in phase contrast monitored by Nikon Ds-Fi2 for three independent experiments.

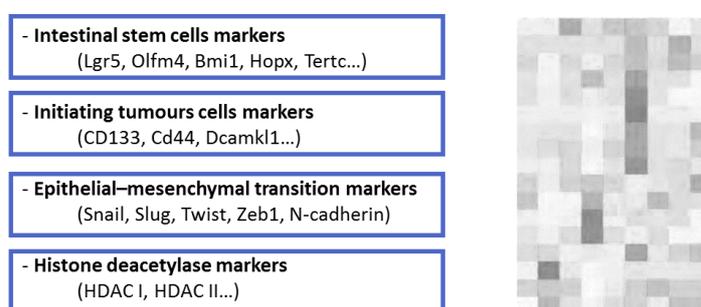
## 5.3 Résumé

Afin de mimer les changements drastiques d'environnements mécaniques au cours du processus de dissémination métastatique, les cellules du cancer du côlon SW480 ont été cultivées alternativement sur des substrats mous (20 kPa,  $E_{20}$ ) et des substrats rigides (GPa, verre). L'effet du nombre de passages successifs sur la survie des cellules cancéreuses a été étudié à l'aide d'un test de viabilité qui permet un marquage bleu des noyaux cellulaires, vert des cellules en apoptose et rouge des cellules en nécrose. Ces observations, réalisées sur  $E_{20}$ , ont montré qu'après un premier ensemencement sur  $E_{20}$ , seules 4% des cellules parviennent à survivre après 24 h de culture cellulaire. Ce taux de survie augmente avec le nombre de passages : 12% après un second passage, 58% après un troisième, 86% après un quatrième jusqu'à atteindre un plafond à 95-96% de cellules survivantes. Les cellules cancéreuses tumorales manifestent des comportements migratoires fortement altérés, des expériences de vidéo-microscopies ont donc été réalisées. Ces études ont permis de montrer que la vitesse de migration des cellules cancéreuses augmente avec le nombre de passages sur  $E_{20}$ . Cette importante motilité suggère une transition épithélio-mésenchymateuse. Cette transition est caractérisée par une dé-différentiation des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses. Des investigations ont alors été menées pour analyser l'organisation de la chromatine au cours de ces passages successifs. Les cellules SW480 contiennent environ 15% d'hétérochromatine au sein de leur noyau. Ce pourcentage augmente sur substrats mous. En effet, après 24 h sur  $E_{20}$ , les cellules ont près de 24% d'hétérochromatine. Ce passage augmente encore pour  $E_{20}$ -Verre, avant de diminuer progressivement jusqu'à atteindre 16% pour  $(E_{20}\text{-Verre})_2\text{-}E_{20}$ . Ces résultats suggèrent une relation entre l'augmentation de la survie, la forte motilité cellulaire et le remodelage de la chromatine des cellules tumorales. L'identification des éventuelles modifications du génome, par des expériences d'analyses transcriptomiques, responsables de ces changements phénotypiques sont en cours d'analyse. La pathogénicité des cellules survivantes aux substrats de très faibles rigidités est actuellement comparée à celle de cellules cultivées sur substrats rigides au cours d'expériences de xénotransplantation dans des souris *nude*. Les cellules sont injectées dans la veine de la queue afin de mimer le processus de dissémination métastatique hématogène. La vitesse d'apparition ainsi que la taille des tumeurs seront comparées pour les deux types de cellules injectées.

Les cellules tumorales ensemencées une seconde fois sur  $E_{20}$  contiennent 20% d'hétérochromatine et ont une vitesse de migration importante. Pour déterminer si ce fort pourcentage d'hétérochromatine est un indicateur de tumorigénicité, comme discuté dans la littérature (Zink, Fischer et al. 2004, Cherkezyan, Stypula-Cyrus et al. 2014), l'organisation de la chromatine a été artificiellement modifiée par l'utilisation d'une drogue, la trichostatine A (TSA). La TSA est un inhibiteur des histones désacétylases (HDAC) qui induit un maintien de la chromatine sous forme euchromatine. La TSA fait l'objet de nombreuses études comme potentiel agent anti-cancéreux (Mukhopadhyay, Weisberg et al. , Marks, Rifkind et al. 2001, Vigushin, Ali et al. 2001, Drummond, Noble et al. 2004, Shaoping 2004, Hrabeta, Stiborova et al. 2014). Cependant l'utilisation de cette drogue pour limiter la formation de métastases en inhibant la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) porte à discussion depuis quelques années. En effet, si certaines études montrent l'effet inhibiteur de la TSA sur la TEM (Chen, Xiao et al. 2013, Wang, Xu et al. 2015), d'autres travaux montrent qu'au contraire la TSA est capable d'induire une transition épithélio-mésenchymateuse (Kong, Ahmad et al. 2012, Giudice, Pinto et al. 2013, Ji, Lee et al. 2015). Nos résultats montrent qu'en présence de TSA, le pourcentage d'hétérochromatine des cellules tumorales SW480 diminue à 7% tandis qu'elles deviennent plus motiles. Ce résultat pourrait suggérer qu'au cours du processus de dissémination métastatique, l'euchromatine serait un facteur accentuant la survie des cellules tumorales et également leur pathogénicité.

## 5.4 Perspectives

Ces premiers résultats ouvrent la voie à de nombreuses autres questions. Parmi les premières, quels sont les changements génétiques associés à ces passages successifs dans des environnements mécaniques défavorables ? Quels sont les effets de ces changements drastiques d'environnements mécaniques sur l'expression des gènes impliqué dans la tumorigénèse, la transition épithélio-mésenchymateuse (qui permet la dissémination métastatique) ou encore l'acétylation des histones ? Pour répondre à ces différentes questions, des transcriptomes ont été réalisés pour les conditions (Verre)<sub>9</sub> et (E<sub>20</sub>-Verre)<sub>4</sub>. Ces transcriptomes sont en cours d'analyse. Ce travail d'analyse se concentre principalement sur des marqueurs de cellules souches intestinales, de cellules initiateurs de tumeurs (CIT), de transition épithélio-mésenchymateuse (TME) ou encore des histones désacétylases (**Figure 5-1**).



**Figure 5-1 | Marqueurs étudiés dans l'analyse transcriptomique** en cours. L'analyse du transcriptome s'intéresse plus particulièrement à des marqueurs de cellules souches intestinales, de CIT, de TME ou encore des histones désacétylases.

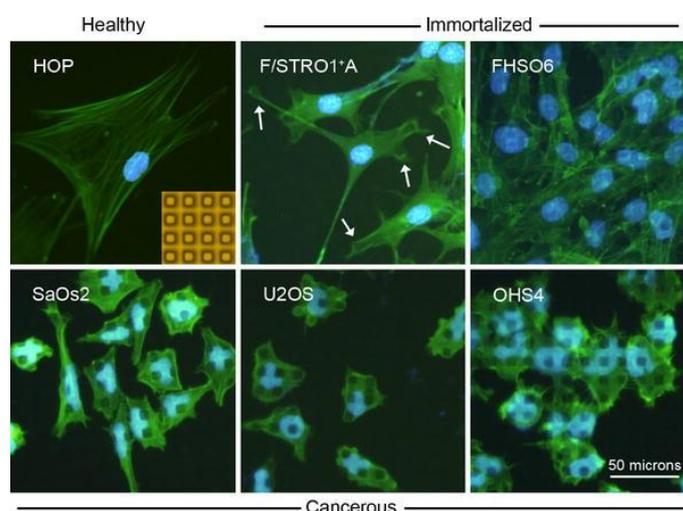
Des analyses complémentaires sont en cours pour évaluer l'agressivité de ces cellules résistantes aux substrats de faibles rigidités. Des cellules contrôles, (Verre)<sub>9</sub>, et des cellules résistantes aux substrats de faibles rigidités, (E<sub>20</sub>-Verre)<sub>4</sub>, ont été injectées dans la veine caudale de souris *nude* afin de reproduire le phénomène de dissémination métastatique hématogène (Saxena and Christofori 2013). Les résultats de ces expériences *in vivo* sont en cours d'analyse. Des études du potentiel invasif impliquant l'utilisation de chambres de Boyden sont également prévues (Albini, Iwamoto et al. 1987). Les chambres de Boyden permettent de quantifier rapidement le potentiel invasif de cellules cancéreuses. L'hypothèse, à la vue des résultats de migration cellulaire, est que le potentiel invasif de ces cellules augmente en fonction du nombre de passages sur des substrats de faibles rigidités. Des expériences encore plus intéressantes pourraient être effectuées avec des Quantum dots pour caractériser ce potentiel invasif. La question sera de montrer si les deux populations de cellules se développent de manière indépendante ou au contraire si l'une des populations domine l'autre en lui imposant son phénotype prédominant. Les cellules sélectionnées au cours des passages sur des substrats de faibles rigidités seront marquées par des quantum dots avant d'être mis en co-culture avec des cellules tumorales d'origine (Pellegrino, Parak et al. 2003).

Autre question d'intérêt, est ce que la survie sur les substrats de faibles rigidités est associée à une résistance aux molécules utilisés en thérapie anticancéreuse comme l'oxaliplatine, l'irinotecan, le 5-fluorouracil, etc. Une évaluation de la survie cellulaire en présence de ces drogues par HRP ou Life/Dead permettrait de répondre à la question.

Il serait également intéressant de se concentrer de plus près aux voies de signalisation intracellulaires impliquées dans ce phénomène de survie mis en place par les cellules aux contacts d'environnements mécaniques défavorables. Cela permettrait entre autres d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Si le transcriptome permettra d'avoir une première idée des gènes exprimés ou non, une analyse par immuno-

marquage de la localisation nucléo-cytoplasmique des deux cofacteurs de transcription YAP et TAZ, déterminera s'ils jouent un rôle dans les mécanismes de survie des cellules cancéreuses sur des matrices de faibles rigidités. YAP et TAZ sont impliqués dans la prolifération cellulaire et dans les voies de signalisation impliquées dans la mécano-transduction, et sont de potentiels oncogènes (Guo and Teng 2015, Moroishi, Hansen et al. 2015). Une analyse, toujours par immunocytochimie, du ratio vimentine/cytokératine, indicateur important de la TME, permettrait d'observer directement l'effet des passages successifs sur des substrats de faibles rigidités sur l'initiation de la transition épithélio-mésenchymateuse (Polioudaki, Agelaki et al. 2015).

Le noyau est également source de nombreuses questions. Est-ce que ce remodelage de la chromatine est également capable de jouer un rôle purement mécanique au cours de l'intravasation et l'extravasation des cellules au cours du processus de dissémination métastatique ? En effet, pour traverser la paroi endothéliale, les cellules doivent se déformer. Une équipe mulhousienne a montré que les noyaux de cellules cancéreuses sont très déformables (**Figure 5-2**) (Davidson, Fromigué et al. 2010, Badique, Stamov et al. 2013). Est-ce que la plasticité de la chromatine est impliquée dans ce potentiel de déformabilité ? Pour répondre à cette question, des expériences d'AFM peuvent être réalisées sur les noyaux à différentes étapes du modèle mécanique de dissémination métastatique afin d'évaluer leur élasticité (Liu, Wen et al. 2014). L'hypothèse étant alors que les noyaux se rigidifient lorsque la proportion d'hétérochromatine augmente et diminuent en rigidité lorsque la proportion d'euchromatine augmente.



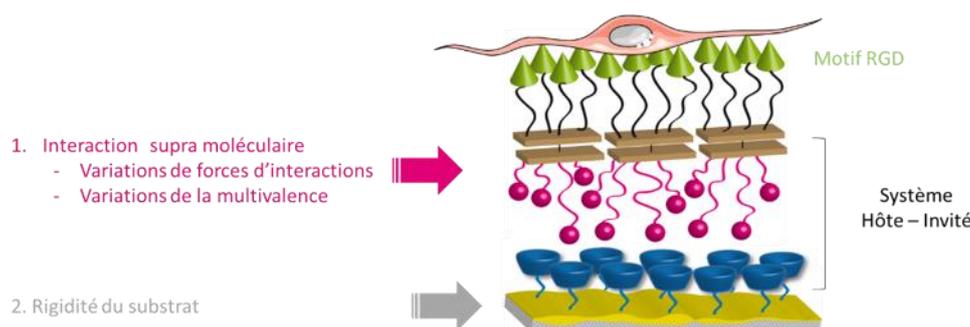
**Figure 5-2 | Les noyaux de cellules cancéreuses sont fortement déformables.** Davidson *et al.* ont démontré que sur des substrats à topographie variable (espacement et taille des piliers), les noyaux cellulaires d'ostéosarcome arrivait à se déformer de manière importante contrairement aux cellules saines qui restent à la surface des piliers. Adaptée de (Davidson, Fromigué et al. 2010)

A plus long terme, il est possible d'envisager d'appliquer ce modèle mécanique de dissémination métastatique *in vitro* sur d'autres cancers à fort potentiel métastatique comme le cancer de la poitrine ou le mélanome. En effet, il est possible d'imaginer à ce jour que les mécanismes de résistance aux substrats faiblement rigides découlent de mutations au sein de mêmes voies de signalisation mécano-sensitives. Des analyses transcriptomiques de ces autres modèles de cellules cancéreuses permettraient de répondre à cette question et hypothétiquement, d'identifier une cible thérapeutique commune à plusieurs cancers à fort potentiel métastatique. D'un point de vue plus personnel aussi, je serais très curieuse de savoir ce qu'il se passerait si des cellules issues d'ostéosarcome (évoluant donc dans un milieu très rigide) passaient à travers ce modèle mécanique de dissémination métastatique *in vitro*.

Enfin, une comparaison des profils transcriptomiques de cellules ayant réalisé une dissémination métastatique *in vivo* et des cellules l'ayant réalisé au sein de notre modèle paraît extrêmement intéressante.

# Chapitre 6 Influence de la force d'interaction substrat-ligand sur l'adhérence cellulaire

Au cours du processus de mécano-sensation, les cellules exercent une force sur le substrat. Cette force développée par le cytosquelette d'actinomyosine est faiblement caractérisée dans la littérature. Ce troisième projet de recherche se concentre sur l'étude des forces exercées par les cellules pour sonder la rigidité de l'environnement. Ce projet repose sur une nouvelle approche d'évaluation des forces impliquant un système hôte-invité. Sur des substrats à rigidité variable, des ligands d'adhésion de type RGD sont fixés de manière non covalente (**Figure 6-1**). En jouant sur les covalences de divers systèmes hôtes-invités et les effets de ces derniers sur l'adhérence et l'étalement cellulaire, il est possible de déterminer les forces exercées par les cellules. La compréhension des liens et synergies entre la rigidité du substrat, les forces de liaison (au sein des interactions hôte/invité) et l'attachement cellulaire ouvrent la voie au développement de nouveaux matériaux permettant de contrôler le comportement cellulaire utilisé en ingénierie tissulaire.



**Figure 6-1|Influence des forces d'interaction substrat-ligand sur l'adhérence cellulaire.** Afin d'évaluer l'influence de la force d'interaction substrat-ligand sur l'adhérence cellulaire, un système hôte-invité est utilisé. La rigidité du substrat et les interactions supramoléculaires au sein du système hôte-invité (forces d'interaction et multivalence) sont modulées au cours de cette étude.

## 6.1 Introduction

L'élaboration de biomatériaux bioactifs, c'est-à-dire capable d'induire une réponse cellulaire contrôlée au niveau de leur surface, requière une connaissance précise de la réponse des cellules aux propriétés biochimiques de leurs microenvironnements. Ces réponses cellulaires aux propriétés de l'environnement font l'objet de nombreuses études depuis la découverte en 1992 des intégrines (Hynes 2004). L'environnement cellulaire et la perception que les scientifiques en ont, est passé d'un simple support physique à un composant essentiel des organismes capable d'induire des réponses cellulaires. En 1997, un nouveau rebondissement scientifique impacte l'élaboration de ces biomatériaux. Pelham et Wang montrent à travers un des travaux pionniers de la mécano-biologie que non seulement les cellules répondent à la rigidité de leur environnement mais aussi que ces signaux mécaniques sont aussi importants que les signaux biochimiques qu'elles perçoivent (Pelham and Wang 1997). Cette communication mécanique induite par la rigidité du substrat influence fortement l'attachement, la migration et la différenciation cellulaire qui sont des réponses clés en ingénierie tissulaire.

Les cellules s'attachent à la matrice extracellulaire (ECM) en reconnaissant des séquences spécifiques comme le motif RGD des glycoprotéines comme la fibronectine, etc. Afin de s'attacher au substrat, les cellules génèrent au travers de leur cytosquelette d'actinomyosine des forces de traction. Les cellules vont donc, à travers leurs intégrines, tirer sur les motifs RGD des glycoprotéines auxquelles elles adhèrent.

L'objectif de ce troisième projet est d'étudier l'influence de la force d'interaction d'un ou plusieurs ligands RGD présentés de manière covalente ou non covalente sur un substrat de rigidité variable sur l'attachement cellulaire. Le substrat à rigidité modulable est constitué de films multicouches de polyélectrolytes à base de poly-L-lysine et d'acide hyaluronique réticulés par la réaction EDC/NHS. L'attachement covalent du ligand RGD au film multicouche de polyélectrolytes est réalisé par une réaction entre un maléïmide inséré dans le film et un résidu cystéine couplé au ligand RGD. L'attachement non covalent du ligand au film est assuré par une réaction hôte-invité entre une poly-cyclodextrine-SH et un adamantane-RGD. Les techniques de microbalance à cristal de quartz et de microscopie confocale ont été utilisées pour contrôler le dépôt des ligands RGD présentés de manière covalente ou non covalente à la surface des films. Le comportement cellulaire est étudié par immunocytochimie et vidéo-microscopie.

## 6.2 Article *en préparation*

## Influence of the substrate-ligand interaction strength on epithelial cell adhesion.

Rachida Yataghane<sup>†,‡,§</sup>, Florence Flick<sup>†,‡,§</sup>, Annie Tu<sup>†,‡,§</sup>, Bernard Senger<sup>†,‡,§</sup>, Philippe Laval<sup>†,‡,§</sup>, Pierre Schaaf<sup>†,‡,§</sup>, Youssef Haikel<sup>†,‡,§</sup> & Dominique Vautier<sup>\*,†,‡,§</sup>.

<sup>†</sup>Unité 1121 "Biomaterials and Bioengineering", Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, France.

<sup>‡</sup>Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, 8 rue Sainte Elisabeth, 67000 Strasbourg, France.

<sup>§</sup>Fédération de Médecine Translationnelle, Strasbourg, France.

*KEYWORDS: Mechanobiology / Biomaterials / Polyelectrolyte multilayers / Substrate stiffness /*

---

**ABSTRACT:** Design of the molecularly dynamic extracellular matrix represents an interesting strategy for scaffold in tissue engineering. To achieve this goal, we prepare new substrates encompassing RGD cell adhesion ligands grafted to the adhesion substrate through multivalent non-covalent host-guest interactions. By varying the number of host-guest interaction (multivalency) we modulate the interaction strength of these ligands with the adhesion substrate. The stiffness of the underlying substrate is also tuned. We use these model systems to investigate how the bond strength of a non-covalent host-guest interaction depends on the stiffness of the substrate, a central issue in understanding cell fate of adhering cells. These model systems are compared to system where the RGD ligands are attached covalently on the substrate. These systems provide a new family of tunable and well controlled dynamic substrates for tissue culture and tissue engineering.

---

### INTRODUCTION

Tissue engineering represents a new field of engineering science that relies both on biology and materials science. Living materials are designed by incorporating cells in synthetic matrices or depositing the cells on synthetic substrates to repair tissues or organs. The relevant design of such materials requires a precise knowledge of the response and fate of the cells consecutive to their interaction with the surrounding material.

Not only chemical but also mechanical properties of the surrounding material appear to play a central role in regulating cellular functions including proliferation, migration, apoptosis and differentiation. It was found that cells display a spreading preference for stiffer substrates, a phenomenon referred to as durotaxis.<sup>1</sup> Engler *et al.* found that smooth muscle cell adhesion depends both on the matrix rigidity and adhesion ligand surface density with limited spreading on soft gels, whatever the ligand density.<sup>2</sup> Janmey and co-workers came to the conclusion that the stiffness of the surface to which cells adhere has a profound effect on cell structure and protein expression. Fibroblasts and endothelial cells develop a spread morphology and actin stress fibers only when grown on surfaces with an elastic modulus greater than 2000 Pa, with a greater effect seen when bound to fibronectin compared to collagen. In contrast, neutrophils appear to be in-

sensitive to stiffness changes over a very wide range.<sup>3-4</sup> In 2006, Discher and co-workers found that native mesenchymal stem cells (MSCs) specify lineage and commit to phenotypes with extreme sensitivity to tissue elasticity. Soft matrices that mimic brain are neurogenic, stiffer matrices that mimic muscle are myogenic, and comparatively rigid matrices that mimic collagenous bone prove osteogenic.<sup>5</sup>

It is currently believed that the downstream signaling in response to the matrix stiffness should be started at the molecular level by integrin receptors present on the surface of adherent cells.<sup>6</sup> Integrins are cell-surface receptors that mediate adhesion to the extracellular matrix (ECM) proteins. The discovery of adhesion domains in fibronectin and other ECM glycoproteins containing the RGD motif constituted by arginine, glycine and aspartic acid (Arg-Gly-Asp) has enabled the design of synthetic materials that can promote cell adhesion.<sup>7</sup> Studies from Griffith and co-workers have shown the influence of the multimeric structure of the ECM for cell adhesion.<sup>8</sup> This is supported by *in vitro* studies using the synthetic RGD adhesion peptide that mimics the ECM.<sup>9</sup>

Until now, studies have concentrated on materials interacting with cells through non-specific interactions or through ligand-receptor interactions where the ligands were covalently fixed to the matrix. Our goal in this work is to design a new family of model substrates of variable rigidity grafted by adhesion ligands through multivalent non-covalent host-guest interactions.<sup>10</sup> By varying the number of host-guest interactions (multivalency) and their chemical nature we will modulate the interaction strength of these ligands to the adhesion substrate. In the present work, adhesion ligands will be attached onto a substrate via host-guest binding through multivalent guest molecules interacting with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ CD) covered surface.  $\beta$ CD is an oligosaccharide consisting of seven glucose units connected in a ring shape.<sup>11</sup> The hydrophobic environment of the cavity enables the encapsulation of a variety of hydrophobic organic molecules in aqueous solution. A variety of multivalent guest molecules (adamantly, AD) were immobilized on this  $\beta$ CD-substrate host-platform.<sup>12-15</sup> This model system will also allow comparing cell adhesion on systems where the multivalent ligand-containing scaffold is attached through covalently bonds to the substrate to those where they are non-covalently anchored. The alternate deposition of positively charged poly(L-lysine) and negatively charged (hyaluronic acid) polyelectrolytes onto solid substrates leads to the formation of nanostructured films, so-called "polyelectrolyte multilayers" (PEM) for instance (PLL/HA)<sub>24</sub>.<sup>16</sup> One way to stiffen the soft (PLL/HA)<sub>24</sub> film consists in its cross-linking using carbodiimide chemistry (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide and N-hydroxysulfosuccinimide).<sup>17-18</sup> Its stiffness can be increased largely by varying the cross-linker concentration<sup>19</sup>. Finally this system provides a new family of tunable and well controlled substrates for tissue culture and tissue engineering<sup>20-21</sup>.

## MATERIALS AND METHODS

**Notations.** We shall use the short-hand notations EDC<sub>0</sub> for the (PLL/HA)<sub>24</sub> films. EDC<sub>0</sub> is considered as a very soft substrate. The short-hand notations glass, EDC<sub>0</sub>, EDC<sub>0</sub>mal, EDC<sub>20</sub>, EDC<sub>20</sub>mal, EDC<sub>60</sub> and EDC<sub>60</sub>mal are recapitulated in Table 1. A second notation RGD stands for the condition in which the RGD is displayed covalently at the surface of the film. The notation CD, AdRGD, CDAdRGD stand respectively for the host cyclodextrines, the guest Adamantane-PEG-RGD and the whole system "host-guest".

Chemicals were used as received. Poly(L-lysine) (MW = 52 kDa) was obtained from Alamanda Polymers. Hyaluronic acid (MW = 357 kDa) was purchased from LifeCore Biomedical. Reactive for crosslinking chemical reaction EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, Product n°: RL-1022.0025) and NHS (N-hydroxysuccinimide, Product N°: 130672) were respectively obtained from Iris Biotech GmbH and Sigma Aldrich. Mal-(PEG)<sub>2</sub>-NHS ((3-(2-(2-(3 Maleimidopropanamido) ethoxy) ethoxy) propanoic acid succinimidyl ester)) (Product N°: PEG1560.0100) was purchased from Iris Biotech GmbH. RGD raft (Raft 4RGD-SH (MW = 4143.52), Raft 1RGD-SH (MW = 1044.22g/mol) and Adamantane-PEG-RGD (MW = 1109,30 g/mol)) were

synthesized by DCM in Grenoble, France whereas the poly-cyclodextrins were synthesized by ICS in Strasbourg, France.

PtK2 cells (male potoro kidney epithelial cells) were purchased from ATCC (CCL-56™), maintained in polystyrene flasks at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in atmosphere with 95% humidity. The culture medium used was Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) high glucose from Mediatech Inc, and the supplement used was fetal bovine serum (10% v/v).

Fluorimetric Cell Viability Kit was purchased from Promokine and performed on PtK2 cells. Primary antibodies anti- $\alpha$ v integrin (Product N°: sc-9969) and monoclonal mouse anti-vinculin (Product N°: V2122-63) were obtained from Santa Cruz Biotechnology and Us biological (Salem, MA, USA). Secondary antibody polyclonal goat anti-mouse (Product N°: A110001) was purchased from Life Technologies. Phalloidin-TRITC (Product No: P1951) and Hoechst 33258 (Product N°: 861405) are coming from Sigma Aldrich. Mounting medium Vectashield® was purchased from Vector Laboratories.

**Construction of the (PLL/HA) film multilayer.** Multilayers buildup were performed on 12 mm diameter glass coverslips (VWR Scientific, Fontenay-sous-Bois, France) preliminarily cleaned with 10 mM SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) at 70°C during 15 minutes then extensively rinsed with mili-Q water, cleaned 100 mM HCl (hydrochloric acid) preheated to 70°C during 15 minutes, and finally extensively rinsed again with mili-Q water, dried and autoclaved for 24 hours.

The multilayers film buildup was prepared with a dipping robot (dipping robot DR2, Reigler and Kirstein, GmbH, Berlin, Germany) equipped with two automated arms. On each arm is inserted a rack that can hold 6 glass coverslips. These racks are moved sequentially into the various solutions of polyelectrolytes (polycation PLL and polyanion HA solutions) prepared in 0.15 M NaCl at a concentration of 1 mg/ml. The first layer was poly-(L-lysine) and after each dipping step the film was washed in rinsing buffer for 5 min (0.15 M NaCl buffer). The hyaluronic acids (HA) was deposited in the same way. The buildup process was continued until 24 pairs were deposited.

**Chemical Cross-linking reaction EDC/NHS.** For chemical cross-linking reaction, multilayers films built as described above were transferred into a 24-wells plate. The cross-linking reaction is based on chemical reaction detailed in Richert *et al.*<sup>17</sup> EDC and NHS were dissolved in a solution containing 0.15 M NaCl. So that EDC final concentration was fixed at 20 or 60 mg/ml while NHS concentration was kept constant at 11 mg/ml. The films were incubated at 4°C, and the cross linking was allowed to proceed overnight. They were finally rinsed three times with a 0.15 M NaCl solution.

**Functionalization with Mal-(PEG)<sub>2</sub>-NHS.** The cross-linked films were rinsed three times with a 0.15 M NaCl solution. They were functionalized with Mal-(PEG)<sub>2</sub>-NHS which was dissolved in a solution containing 0.15 M NaCl at 0.1 mg/mL final concentration. To obtain two different conditions, 1 mL of this solution was deposited on half of the films for 3 h at 4°C whereas the other half of the films were rinsed and incubated overnight with 1 mL of 0.15 M NaCl aqueous solution at 4°C.

**Functionalization with raft RGD.** In this work, two kinds of functionalization were used, covalent and non-covalent RGD functionalization. Covalent: Raft 4RGD-SH and raft 1RGD-SH were dissolved at 0,1 mg/mL (100  $\mu$ L/film) in a solution containing 0.15 M NaCl for one night. Non-covalent: Poly-Cyclodextrins was dissolved at 0,1 mg/mL for 1 hour at ambient temperature (100  $\mu$ L/film) in a solution containing 0.15 M NaCl. Adamantane-PEG-RGD was dissolved in the same solution.

**Quartz crystal microbalance.** The film buildup process of the multilayers and the different functionalization steps were followed and examined *in situ* by a Crystal Quartz Microbalance (QCM) (model Q-Sense, Q-Sense AB, Gothenburg, Sweden). The quartz crystal is excited at its fundamental frequency (about 5 MHz) as well as at the third, fifth, and seventh overtones (denoted by  $\nu = 3, 5$  and  $7$ , corresponding respectively to 15, 25, and 35 MHz). The molecule adsorption induces a change of the resonance frequency  $f_\nu$  of

the quartz crystal. During each adsorption step, the change in the resonance frequency ( $\Delta f_v$ ) were recorded. The crystal used for these experiments is coated with a 100 nm thick SiO<sub>2</sub> film (QSX 303 crystal, Q-Sense AB, Gothenburg, Sweden). In first approximation, the normalized frequency shift,  $-\Delta f_v/v$ , is proportional to the mass adsorbed on the crystal.

**Film characterization.** CLSM observations were performed with Zeiss LSM 510 microscope using x40/1.4 oil immersion objective. FITC-fluorescence detected after excitation at 488nm with cut-off dichroic mirror 488nm and emission band-pass filter 505-530nm.

**Cell culture.** Cells were sub-cultured upon reaching 80% confluence (approximately 7 days), PtK2 cells were first rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) and were detached with 5 mL EDTA-trypsin (Product N°: L0940-100, Dominique Dutscher) then leave in 1mL during 5min, resuspended in 10 ml DMEM + (supplemented culture medium). We realized centrifugation during 5min at 1000 rpm then we have eliminated the supernatant, and we added 10ml of serum free medium. For all experiments cells were adhered in serum free medium, seeded at an approximate density of 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> on wells of three different conditions: EDC, EDC-MAL-RGD, and Glass Slides) and allowed to adhere for 4h. After adhesion, surfaces were washed twice in PBS to remove unattached or weakly attached cells, and the remaining cells were fixed and permeabilized in 4% paraformaldehyde (Product N°: 1571, Euromedex) and 0.1% Triton X-100 in PBS respectively for 15 min, the samples were washed with PBS, and blocked with 10% FBS (Invitrogen) in PBS overnight in 10%.

**Immunofluorescence experiments.** Cells were incubated with the primary antibodies using monoclonal mouse anti- $\alpha v$  integrin and monoclonal mouse anti-vinculin diluted in 1:20 and 1:50 respectively in PBS for 90 min in darkness at room temperature, then were washed three times with PBS and incubated for 30 min with the secondary antibodies using polyclonal goat anti-mouse diluted in 1:500, rinsed again three times with PBS. Actin was labelled with phalloidin-TRITC (1 mg/mL) diluted in 1/100<sup>6</sup> for 15 min, and cells nuclei were stained with Hoechst 33258 (20 mg/mL) diluted in 1:100 for 5 min. Samples were washed thoroughly in PBS and mounted onto glass slides in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, California), then viewed under Nikon Ellipse TE200 fluorescence microscopy with 63 $\times$  PL APO (Achromatic aberration correction) (1.4 NA) objective equipped with Nikon Digital Camera (DS-Q11MC with NIS-Elements software) Images fluorescence images were analyzed using ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

**Apoptotic, necrotic, healthy cells assay.** Cells were seeded on surfaces at 1.105 per cm<sup>2</sup>. Apoptotic, necrotic and healthy cells were carried out using the apoptotic / necrotic / healthy cells detection Kit according to the manufacturer's instructions. Cells were observed by fluorescence microscopy

## RESULTS AND DISCUSSION

**Substrate stiffness as a function of EDC concentration.** PEM films were used to investigate how the substrate–ligand interaction strength, synergistically with the mechanical properties of the substrate, might play a role on cell adhesion. The films were composed of (PLL/HA)<sub>24</sub> (**Fig. 1**) cross-linked using carbodiimide chemistry (EDC/NHS) (**Fig. 1**). As the concentration of EDC increases, the film becomes stiffer, as we showed by AFM indentation experiments. For the concentration 0, 20 and 60 mg/mL, elastic moduli were 20  $\pm$  3, 240  $\pm$  45 and 760  $\pm$  400 kPa respectively (**Fig. 2**). Henceforth, we shall use the short-hand notations EDC<sub>0</sub>, EDC<sub>20</sub> and EDC<sub>60</sub> for the (PLL/HA)<sub>24</sub> film cross-linked with 0, 20 and 60 mg/mL respectively. Of note, Mal-(PEG)<sub>2</sub>-NHS used to covalently link RGD to the PEM functionalization not affected the PEM stiffness (**Fig. 2**).

**Observations of films after photobleaching.** First, qualitative observations were performed to study the binding of RGD to the maleimide. To determining if raft 4RGD appeared mobile in the films, a raft 4RGD<sup>FITC</sup> was synthesized. A circle was bleached at t = 0 and the evolution of the fluorescence intensity in

4

this zone was monitored during 10 min. **Figure 3** shows film sections observed with confocal microscopy. It appears that no recovery after 10 min and thus no diffusion of raft 4RGD<sup>FITC</sup> were observed in the presence of maleimide, whereas the recovery was nearly completed in the absence of maleimide. Thus diffusion of raft 4RGD<sup>FITC</sup> into the film was observed. This result suggested that raft 4RGD were covalently linked to the PEM by disulfide bonds via the maleimide functions.

#### Cell adhesion and cytoskeletal organization on PEM functionalized with covalent RGD.

**RGD ligands addressed by a raft 4RGD.** **Figure 4** shows film architecture and the raft 4RGD structure. Life/Dead assay was performed. It showed that the PEM stiffness had an effect on cell viability (**Fig. 5A** and **5B**) whereas RGD presence affect only cells spreading (**Fig. 5C**). Immunofluorescence experiments using antibodies specific for integrin, and phalloidin staining for F-actin and vinculin, were performed on cells cultured for 4h without serum on the stiffened substrates. On EDC<sub>0</sub> and EDC<sub>0</sub> raft 4RGD, cell went by necrosis through a lytic process, as indicated by the release of cytoplasm in the culture medium in 100% of the cases (data not shown). On EDC<sub>20</sub> and EDC<sub>60</sub> cells survived displaying a round shaped morphology. Neither  $\alpha$ -integrin spots (**Fig. 6**), F-actin stress fibers nor vinculin adhesion spots were detected in cells cultured on EDC<sub>20</sub> and EDC<sub>60</sub> (**Fig. 7**). These results clearly indicate that cell survival require a substrate whose elastic moduli exceeds 20 kPa (condition EDC<sub>20</sub>). On EDC<sub>20</sub> raft 4RGD and EDC<sub>60</sub> raft 4RGD, cells spread and all displayed peripheral  $\alpha$ -integrin spots (**Fig. 6**) with some  $\alpha$ -integrin clusters (**Fig. 6**) and vinculin sites localized at the tip of actin microfilaments (**Fig. 7**), similarly to the well-known pattern described in cells grown on glass (**Fig. 7A** and **8A data not shown**). On EDC<sub>20</sub> raft 4RGD, the length of vinculin adhesion site is similar to those on EDC<sub>60</sub> raft 4RGD (**Fig 7B** and **8B data not shown**). Progressive increase in nuclear area was observed when cells were seeded onto substrates for which stiffness progressively increased (**Fig. 9A**, EDC<sub>0</sub>, EDC<sub>20</sub> and EDC<sub>60</sub> compared to glass.) and in the presence of raft 4RGD (**Fig. 9A**, EDC<sub>0</sub> raft 4RGD and EDC<sub>20</sub> raft 4RGD compared to EDC<sub>60</sub> raft 4RGD). However, circularity, defined as the ratio of major-axis / minor-axis (the form factors 1.0 representing a perfect circle and 0 a straight) was similar for all the conditions (**Fig. 9B**). Nuclear morphometry is clearly a useful diagnostic tool in several settings.<sup>22</sup> These results suggest that cell spreading,  $\alpha$ -integrin engagement, actin-fiber organization and vinculin assembly need rigid substrates with 4RGD covalently presented.

**RGD ligands addressed by a raft 1RGD.** To determine whether a decrease of the number of RGD covalently presented on rigid substrates influence cell adhesion, experiments were performed using raft 1RGD. On EDC<sub>60</sub> raft 1RGD, the cells phenotype was similar to those observed on cell on EDC<sub>60</sub> 4RGD. Cell spread and  $\alpha$ -integrin was uniformly localized in the cytoplasm (**Fig. 10 data not shown**). Vinculin spots were preferentially localized at the actin microfilaments and cell protrusive extremities (**Fig. 11 data not shown**). Interestingly, on EDC<sub>20</sub> raft 1RGD some cells displayed spread morphology with  $\alpha$ -integrin engagement (data not shown), focal contacts and actin filaments similar to those on EDC<sub>20</sub> 4RGD. By contrast, neither  $\alpha$ -integrin spots, F-actin stress fibers (**Fig. 12 data not shown**) nor vinculin adhesion spots were detected in some round shape cells cultured on EDC<sub>20</sub> raft 1RGD (**Fig. 13 data not shown**) Of note, the length of vinculin adhesion site decreased slightly on EDC<sub>60</sub> raft 1RGD compared to EDC<sub>60</sub> raft 4RGD (**Fig. 7B** and **11B data not shown**). Our results suggest that 1RGD presented covalently on EDC<sub>20</sub> is no sufficient to allow cell spreading.

**Cell adhesion and cytoskeletal organization on PEM functionalized with non-covalent RGD.** Guest molecules, 1adamantane-1RGD, were immobilized on  $\beta$  cyclodextrins-PEM host-platform (**Fig. 14**). On EDC<sub>20</sub>malCD<sup>ADRGD</sup> cell went through a lytic process, as indicated by the release of cytoplasm in the culture medium in 100% of the cases (**Fig. 15A** and **15B**). On glass, on EDC<sub>20</sub>malCD and on EDC<sub>20</sub>mal<sup>ADRGD</sup> cells

spread (Fig. 15 A). We considered the following hypothesis to explain the massive mortality on EDC<sub>20</sub>malCD<sup>ADRGD</sup>. To adhere, cells exert traction forces against the substrate. These traction forces could be higher than host-guest interaction force leading to detachment of ADRGD molecules (Fig. 16). To test this hypothesis, possible experience is to increase multivalent guest molecules (adamantane, AD) immobilized on  $\beta$ CD-substrate host-platform, using for instance Raft4AD-1RGD molecules (Fig. 17). If cell spreading is observed on EDC<sub>60</sub>malCD<sup>4ADRGD</sup> it would be very interesting to compare this condition to the condition EDC<sub>60</sub> raft 1RGD by video microscopy to obtain more precise data on speed migration and migration trajectories of the cells. These biological processes will determine what mode of RGD covalent or non-covalent substrate presentation respond best to a molecular dynamic extracellular matrix.

## CONCLUSION

In this work, synergistic relationships between substrate elasticity and covalent or non-covalent (host-guest interactions) RGD ligands presentation on cell adhesion were investigated. We report that cell survival in a non-adherent state require a substrate whose elastic moduli exceeds 240 kPa (condition EDC<sub>20</sub>). For 4RGD ligands grafted to EDC<sub>20</sub> and EDC<sub>60</sub> substrates through covalent interactions (conditions EDC<sub>20</sub> raft 4RGD and EDC<sub>60</sub> raft 4RGD), cells adhere with integrin engagement, vinculin FA assembly and stress fiber formation. Decreasing the RGD ligands to 1RGD on EDC<sub>20</sub> (condition EDC<sub>20</sub> raft 1RGD) is accompanied with cell rounding whereas on EDC<sub>60</sub> raft 1RGD, cells retain their capacity to spread. This result shows that 1RGD presented covalently on EDC<sub>20</sub> (condition EDC<sub>20</sub> raft 1RGD) is not sufficient to allow cell spreading. An interesting question would be to study whether this substrate guides the cells into a quiescence state. We wonder if these cells resisting to death would still preserve the capacity to spread and divide when they are brought back into contact with EDC<sub>60</sub> raft 1RGD substrate. The EDC<sub>20</sub> with 1RGD presented non-covalently (condition EDC<sub>20</sub> mal CD<sup>ADRGD</sup>) is a non-permissive system because the majority of cells death by necrosis. To direct the cells into quiescence or spreading state, we could increase the number of host-guest interactions (multivalency) increasing the interaction strength of RGD ligands on EDC<sub>60</sub> substrate. If similar phenotypes of spreading are observed for non-covalent and covalent RGD ligands presentation on EDC<sub>60</sub>, it would be interesting to investigate if these two different modes of RGD presentation are comparable dynamic substrate for instance in cells speed migration and migration trajectories.

Chromatin organization has a strong influence on the expression of the genome<sup>23</sup> and chromatin remodeling contributes to many cellular properties as for instance quiescence, pluripotency and cell differentiation,<sup>24-25</sup> as well as to the deformation of the nucleus.<sup>26-30</sup> Two well-defined cytological compartments are considered in the nucleus: the condensed, inactive heterochromatin and the extended, active euchromatin. To our knowledge, no studies have been addressed experimentally to know whether synergistic relationships between substrate elasticity and covalent or non-covalent RGD ligands presentation induced change in chromatin structure of adhesive cells. An important open question is also covalent or non-covalent RGD ligands presentation is sensed in the same way or not if the cell displayed nucleus in euchromatin or in heterochromatin organization?

## ACKNOWLEDGMENT

We are indebted to Pr Liliane Guérente and his team of the Departement de chimie moléculaire in Grenoble for the synthesis of the different raft RGD and Dr Loïc Jerry from the Institut Charles Sadron in Strasbourg for the polycyclodextrine synthesis. F.F. and R.Y. are grateful to Faculté de Chirurgie Dentaire of Strasbourg for financial support.

## ABBREVIATIONS

ECM, Extracellular matrix; PEM, Polyelectrolyte multilayer; PLL, Poly(L-lysine); HA, Hyaluronic acid; EDC, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide; NHS, N-hydroxysuccinimide; AD, Adamantane; RGD, arginylglycylaspartic acid; Mal, maléimide; PBS, phosphate buffered saline; FBS, Fetal Bovine Serum.

## REFERENCES

- Lo, C. M.; Wang, H. B.; Dembo, M.; Wang, Y. L., Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical Journal* **2000**, *79* (1), 144-152.
- Engler, A.; Bacakova, L.; Newman, C.; Hategan, A.; Griffin, M.; Discher, D., Substrate Compliance versus Ligand Density in Cell on Gel Responses. *Biophysical Journal* **2004**, *86* (1), 617-628.
- Yeung, T.; Georges, P. C.; Flanagan, L. A.; Marg, B.; Ortiz, M.; Funaki, M.; Zahir, N.; Ming, W.; Weaver, V.; Janmey, P. A., Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell motility and the cytoskeleton* **2005**, *60* (1), 24-34.
- Discher, D. E.; Janmey, P.; Wang, Y.-l., Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate. *Science* **2005**, *310* (5751), 1139.
- Engler, A. J.; Sen, S.; Sweeney, H. L.; Discher, D. E., Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* **2006**, *126* (4), 677-689.
- Hynes, R. O., Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **2002**, *110* (6), 673-687.
- Ruoslahti, E., RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **1996**, *12* (1), 697-715.
- Maheshwari, G.; Brown, G.; Lauffenburger, D. A.; Wells, A.; Griffith, L. G., Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *Journal of Cell Science* **2000**, *113* (10), 1677.
- Hersel, U.; Dahmen, C.; Kessler, H., RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* **2003**, *24* (24), 4385-4415.
- Dubacheva, G. V.; Galibert, M.; Coche-Guerente, L.; Dumy, P.; Boturyn, D.; Labbe, P., Redox strategy for reversible attachment of biomolecules using bifunctional linkers. *Chemical Communications* **2011**, *47* (12), 3565-3567.
- Rekharsky, M. V.; Inoue, Y., Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins. *Chemical Reviews* **1998**, *98* (5), 1875-1918.
- Figueiras, A.; Carvalho, R. A.; Ribeiro, L.; Torres-Labandeira, J. J.; Veiga, F. J. B., Solid-state characterization and dissolution profiles of the inclusion complexes of omeprazole with native and chemically modified  $\beta$ -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2007**, *67* (2), 531-539.
- Guorong, Z.; Xiaolei, W.; Xingwang, S.; Tianling, S.,  $\beta$ -Cyclodextrin-ferrocene inclusion complex modified carbon paste electrode for amperometric determination of ascorbic acid. *Talanta* **2000**, *51* (5), 1019-1025.
- Williams Iii, R. O.; Mahaguna, V.; Sriwongjanya, M., Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **1998**, *46* (3), 355-360.
- Habus, I.; Zhao, Q.; Agrawal, S., Synthesis, Hybridization Properties, Nuclease Stability, and Cellular Uptake of the Oligonucleotide-Amino- $\beta$ -cyclodextrins and Adamantane Conjugates. *Bioconjugate Chemistry* **1995**, *6* (4), 327-331.
- Kocgozlu, L.; Lavallo, P.; Koenig, G.; Senger, B.; Haikel, Y.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C.; Tenenbaum, H.; Vautier, D., Selective and uncoupled role of substrate elasticity in the regulation of replication and transcription in epithelial cells. *Journal of Cell Science* **2009**, *123* (1), 29.
- Richert, L.; Boulmedais, F.; Lavallo, P.; Mutterer, J.; Ferreux, E.; Decher, G.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C.; Picart, C., Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross-linking. *Biomacromolecules* **2004**, *5* (2), 284-294.

18. Francius, G.; Hemmerlé, J.; Ball, V.; Lavalley, P.; Picart, C.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P.; Senger, B., Stiffening of Soft Polyelectrolyte Architectures by Multilayer Capping Evidenced by Viscoelastic Analysis of AFM Indentation Measurements. *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111* (23), 8299-8306.
19. Boudou, T.; Crouzier, T.; Ren, K.; Blin, G.; Picart, C., Multiple Functionalities of Polyelectrolyte Multilayer Films: New Biomedical Applications. *Advanced Materials* **2010**, *22* (4), 441-467.
20. Richert, L.; Lavalley, P.; Vautier, D.; Senger, B.; Stoltz, J. F.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Picart, C., Cell Interactions with Polyelectrolyte Multilayer Films. *Biomacromolecules* **2002**, *3* (6), 1170-1178.
21. Boudou, T.; Crouzier, T.; Nicolas, C.; Ren, K.; Picart, C., Polyelectrolyte Multilayer Nanofilms Used as Thin Materials for Cell Mechano-Sensitivity Studies. *Macromolecular Bioscience* **2011**, *11* (1), 77-89.
22. Rangamani, P.; Lipshtat, A.; Azeloglu, E. U.; Calizo, R. C.; Hu, M.; Ghassemi, S.; Hone, J.; Scarlata, S.; Neves, S. R.; Iyengar, R., Decoding Information in Cell Shape. *Cell* **2013**, *154* (6), 10.1016/j.cell.2013.08.026.
23. Badeaux, A. I.; Shi, Y., Emerging roles for chromatin as a signal integration and storage platform. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2013**, *14* (4), 211-224.
24. Meshorer, E.; Misteli, T., Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2006**, *7* (7), 540-546.
25. Rabineau, M.; Flick, F.; Mathieu, E.; Tu, A.; Senger, B.; Voegel, J.-C.; Lavalley, P.; Schaaf, P.; Freund, J.-N.; Haikel, Y.; Vautier, D., Cell guidance into quiescent state through chromatin remodeling induced by elastic modulus of substrate. *Biomaterials* **2015**, *37*, 144-155.
26. Dahl, K. N.; Engler, A. J.; Pajerowski, J. D.; Discher, D. E., Power-Law Rheology of Isolated Nuclei with Deformation Mapping of Nuclear Substructures. *Biophysical Journal* **2005**, *89* (4), 2855-2864.
27. Mazumder, A.; Roopa, T.; Basu, A.; Mahadevan, L.; Shivashankar, G. V., Dynamics of Chromatin Decondensation Reveals the Structural Integrity of a Mechanically Prestressed Nucleus. *Biophysical Journal* **2008**, *95* (6), 3028-3035.
28. Dalby, M. J.; Gadegaard, N.; Herzyk, P.; Sutherland, D.; Agheli, H.; Wilkinson, C. D. W.; Curtis, A. S. G., Nanomechanotransduction and Interphase Nuclear Organization influence on genomic control. *Journal of Cellular Biochemistry* **2007**, *102* (5), 1234-1244.
29. Badique, F.; Stamov, D. R.; Davidson, P. M.; Veuillet, M.; Reiter, G.; Freund, J.-N.; Franz, C. M.; Anselme, K., Directing nuclear deformation on micropillared surfaces by substrate geometry and cytoskeleton organization. *Biomaterials* **2013**, *34* (12), 2991-3001.
30. Le Berre, M.; Aubertin, J.; Piel, M., Fine control of nuclear confinement identifies a threshold deformation leading to lamina rupture and induction of specific genes. *Integrative Biology* **2012**, *4* (11), 1406-1414.

**Table 1**

Notations and sequences of the different conditions. PEM : Polyelectrolytes multilayers.

Notation	Condition
EDC <sub>0</sub>	PEM displaying an apparent Young Modulus of 0 kPa
EDC <sub>0</sub> mal <sup>RGD</sup>	PEM displaying an apparent Young Modulus of 0 kPa with covalent RGD
EDC <sub>20</sub>	PEM crosslinked by 20mg/mL of EDC
EDC <sub>20</sub> mal <sup>RGD</sup>	PEM crosslinked by 20mg/mL of EDC with covalent RGD
EDC <sub>20</sub> malCD	PEM crosslinked by 20mg/mL of EDC with covalent polycyclodextrins
EDC <sub>20</sub> mal <sup>AdRGD</sup>	PEM crosslinked by 20mg/mL of EDC with non covalent Ad-PEG-RGD
EDC <sub>20</sub> malCD <sup>AdRGD</sup>	PEM crosslinked by 20mg/mL of EDC with covalent polycyclodextrins and non covalent Ad-PEG-RGD
EDC <sub>60</sub>	PEM crosslinked by 60mg/mL of EDC
EDC <sub>60</sub> mal <sup>RGD</sup>	PEM crosslinked by 60mg/mL of EDC with covalent RGD

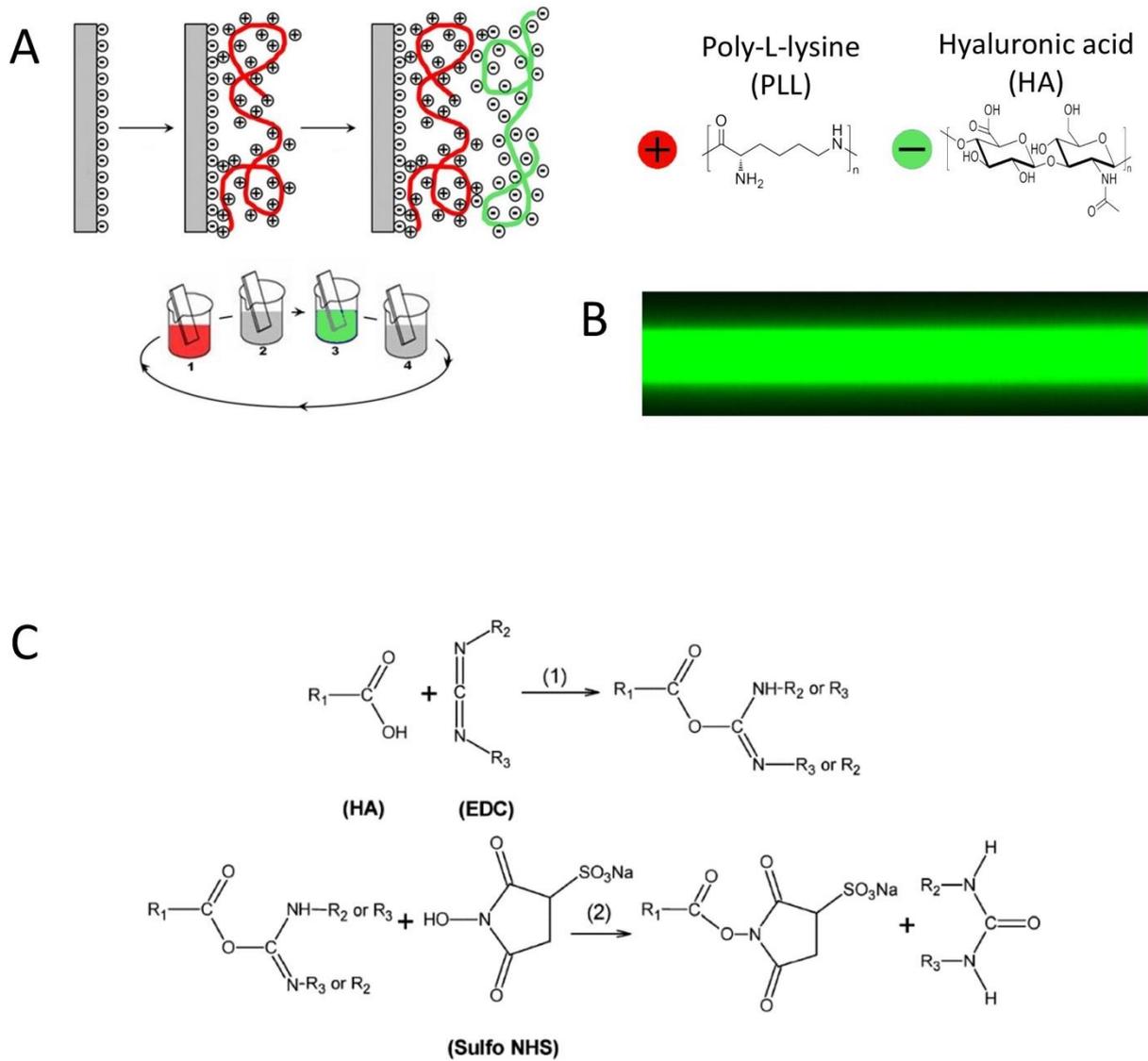
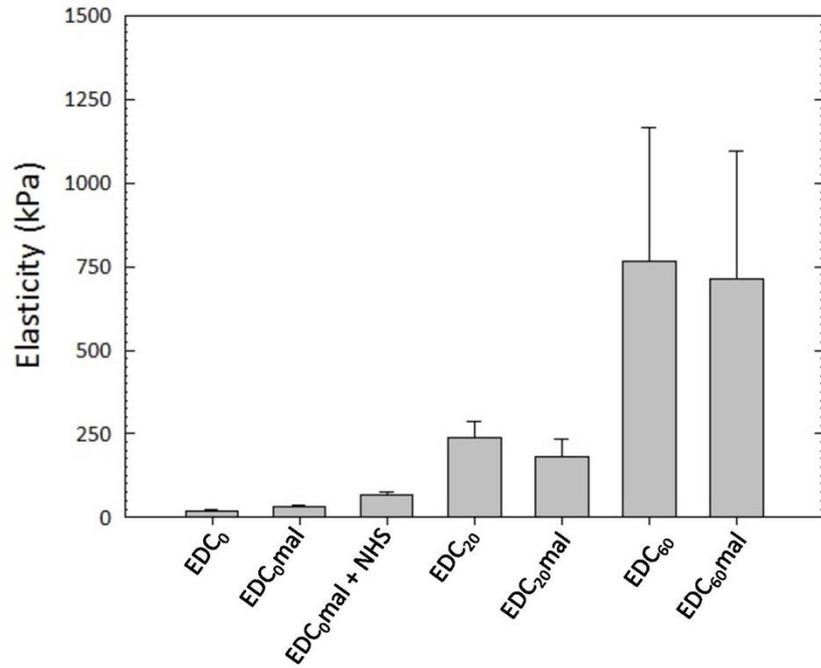


Figure 1 | A) Polyelectrolytes multilayered films. Buildup process by dip coating. B) Vertical section image of a (PLL/HA)<sub>23</sub>-PLL<sup>FITC</sup> multilayered film observed by CLSM. C) Crosslinking reaction by EDC/NHS.



	Average Young modulus in kPa (n=1024, r=10μm/s)	Median
EDC <sub>0</sub>	18.3 ± 3	18.45
EDC <sub>0</sub> mal	31.79 ± 2.2	31.72
EDC <sub>0</sub> mal + NHS	67 ± 7.5	68.37
EDC <sub>20</sub>	240 ± 45	246.39
EDC <sub>20</sub> mal	183 ± 53	179
EDC <sub>60</sub>	765 ± 399	759.8
EDC <sub>60</sub> mal	715 ± 381	717.9

Figure 2 | Young modulus cells in regard to EDC<sub>0</sub>, EDC<sub>0</sub>mal, EDC<sub>20</sub>, EDC<sub>20</sub>mal, EDC<sub>60</sub> and EDC<sub>60</sub>mal.

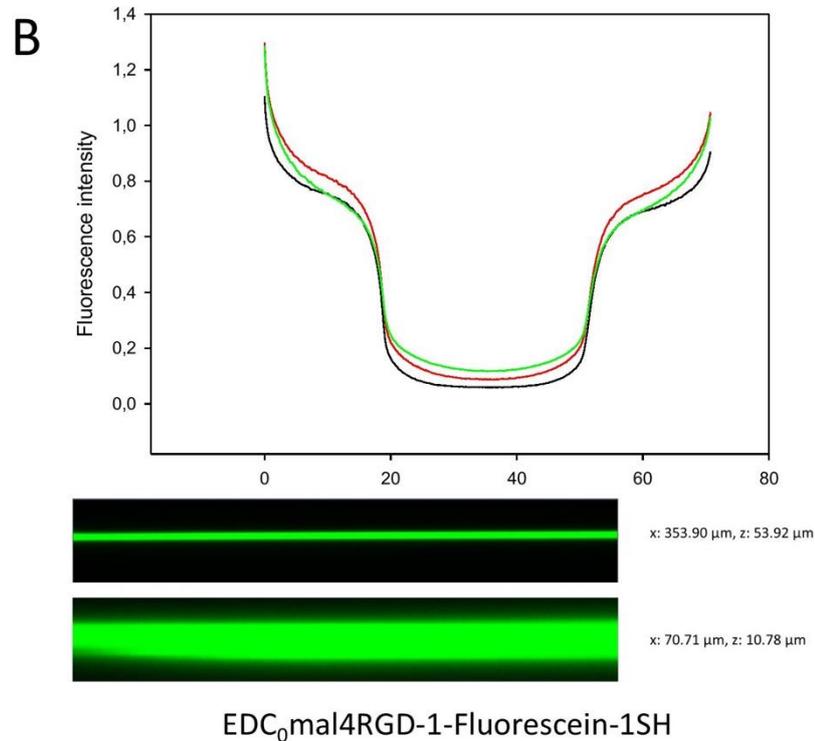
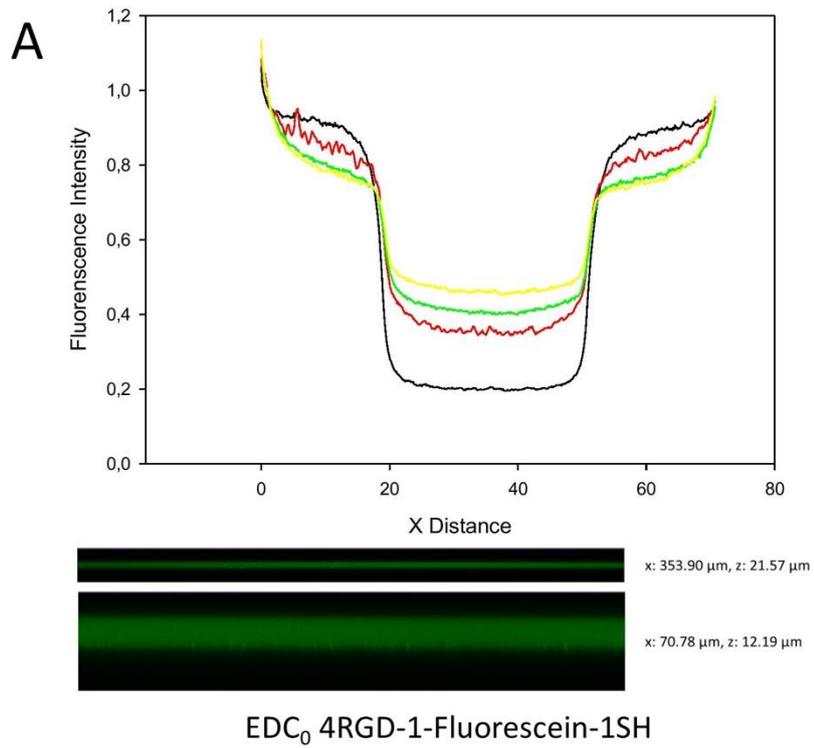


Figure 3 | Vertical image section observed by CLSM and fluorescence recovery after photo-bleaching for respectively A) EDC<sub>0</sub>4RGD-1-Fluorescein-1SH and B) EDC<sub>0</sub>mal4RGD-1-Fluorescein-1SH multilayered film

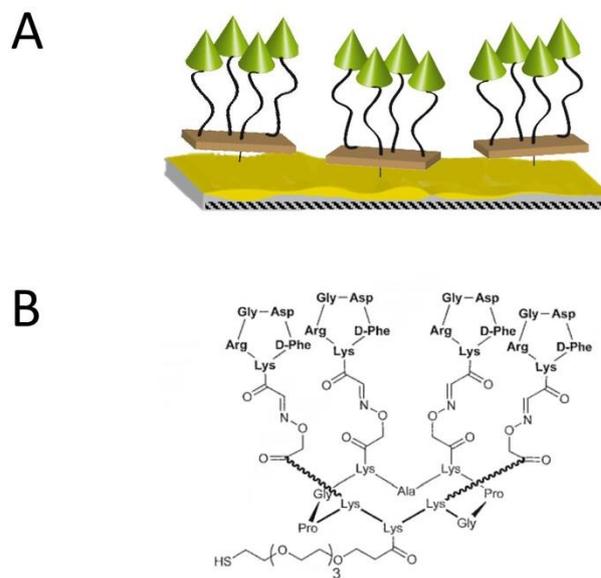


Figure 4 | A) Cartoon representation of polyelectrolyte multilayers displaying covalent 4RGD rafts. Polyelectrolyte multilayers are represented in yellow. RGD binding motifs are represented in green. B) Chemical structure of the 4RGD raft.

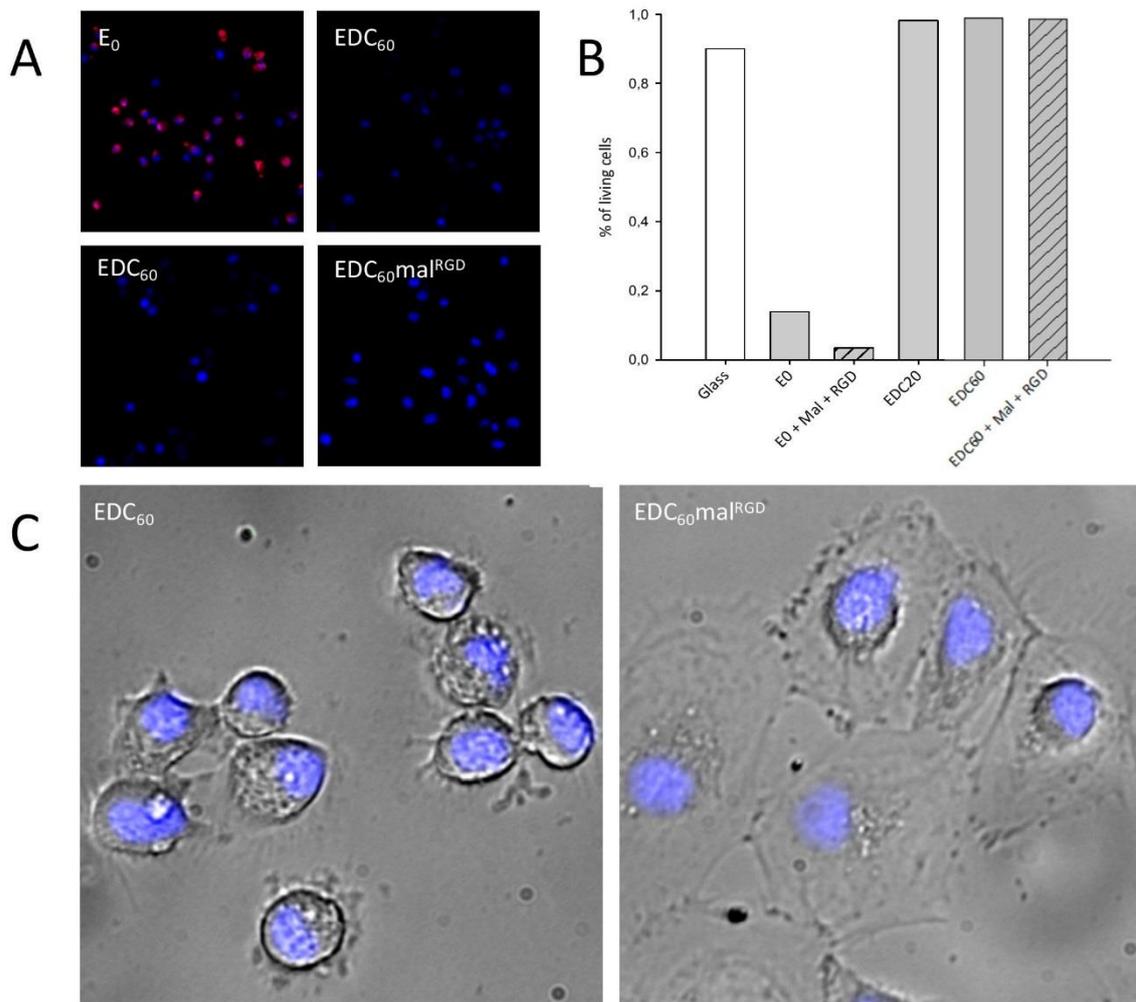


Figure 5 | Effect of the presence of covalently bound RDG on cell viability and spreading. A) Merge of Hoechst 33342 (blue) and EthD-III (red). B) Apoptotic, necrotic and healthy cells with respect glass, EDC<sub>0</sub>, EDC<sub>0</sub>mal<sup>RGD</sup>, EDC<sub>20</sub>, EDC<sub>60</sub> and EDC<sub>60</sub>mal<sup>RGD</sup> analyzed with the apoptotic/necrotic healthy cells detection kit (PromoKine) using ImageJ. C) Images in phase contrast and Hoechst 33342 of PtK2 cells after 45 min of cell culture on EDC<sub>60</sub> and EDC<sub>60</sub>mal<sup>RGD</sup>.

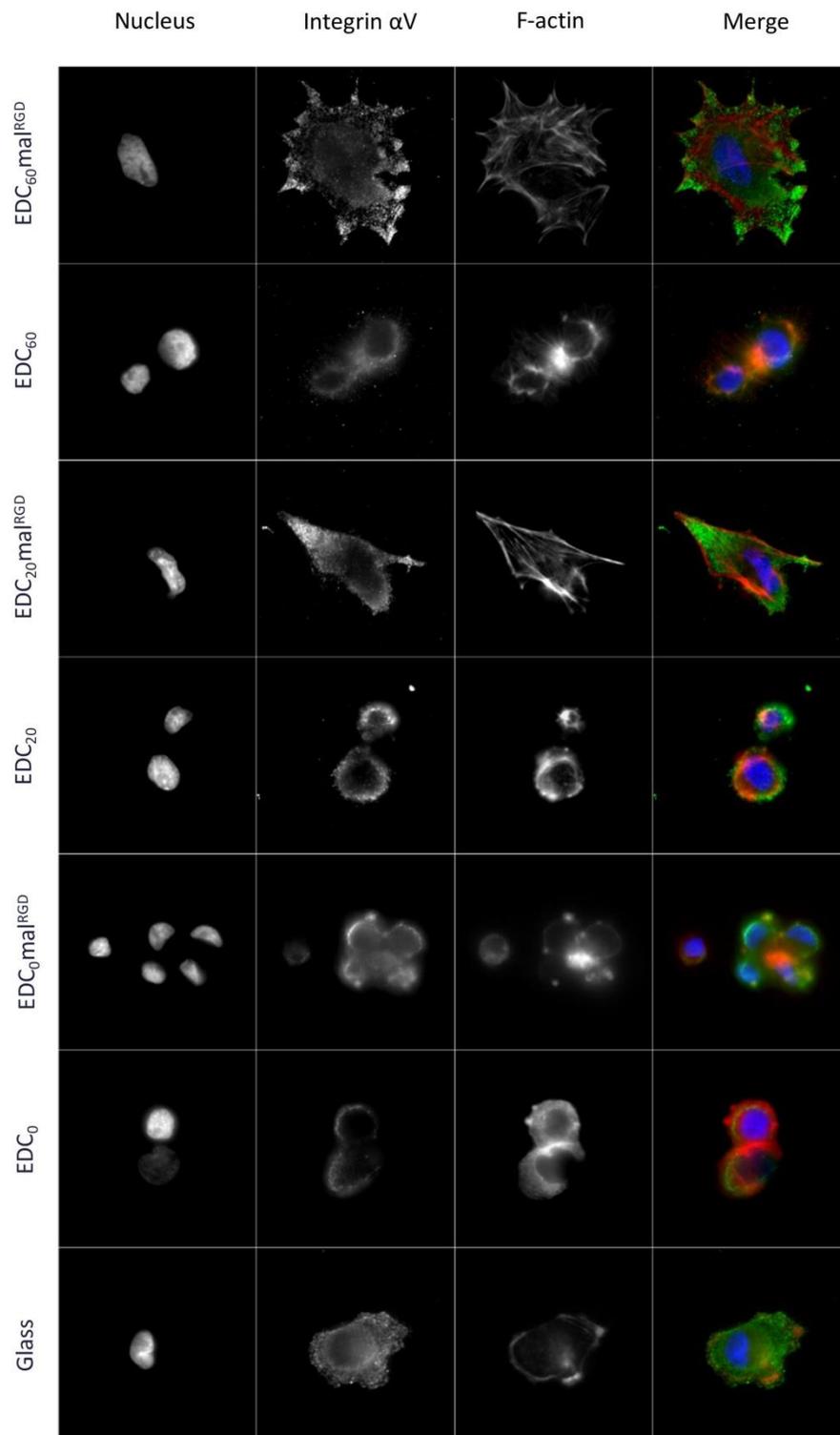


Figure 6 | Integrin  $\alpha$ V engagement of PtK2 cells cultured on glass, EDC<sub>0</sub>, EDC<sub>0</sub>mal<sup>RGD</sup>, EDC<sub>20</sub>, EDC<sub>20</sub>mal<sup>RGD</sup>, EDC<sub>60</sub> and EDC<sub>60</sub>mal<sup>RGD</sup>. Images in fluorescence after 45 min of cell culture.

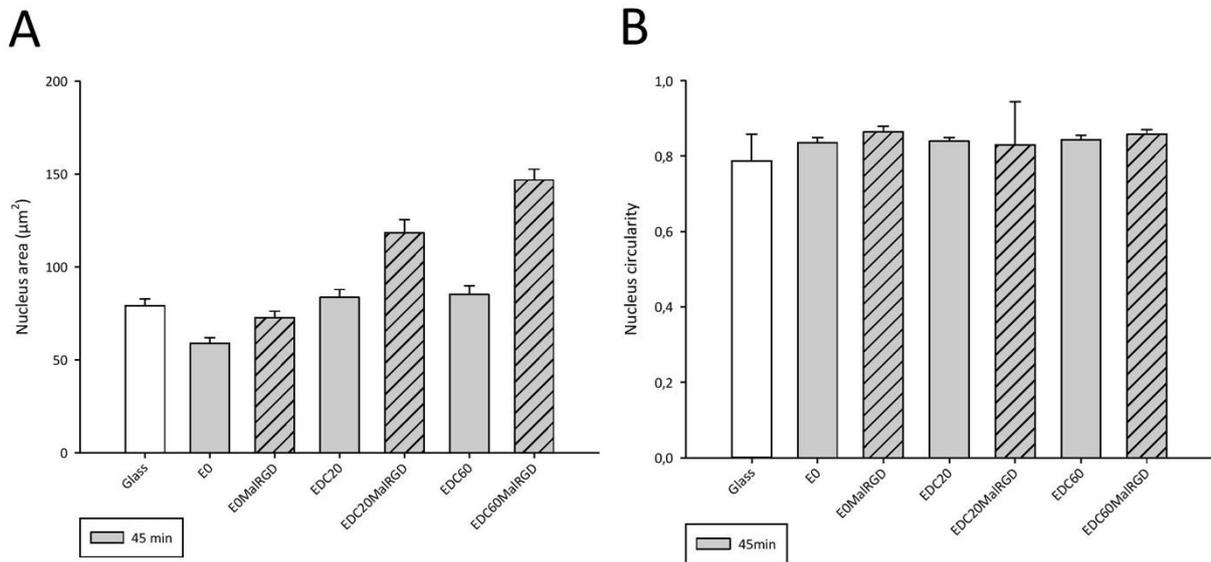


Figure 9 | Nucleus area (A) and circularity (B) of PtK2 cells culture on glass, EDC<sub>0</sub>, EDC<sub>0</sub>mal<sup>RGD</sup>, EDC<sub>20</sub>, EDC<sub>20</sub>mal<sup>RGD</sup>, EDC<sub>60</sub> and EDC<sub>60</sub>mal<sup>RGD</sup> after 45 min of cell culture.

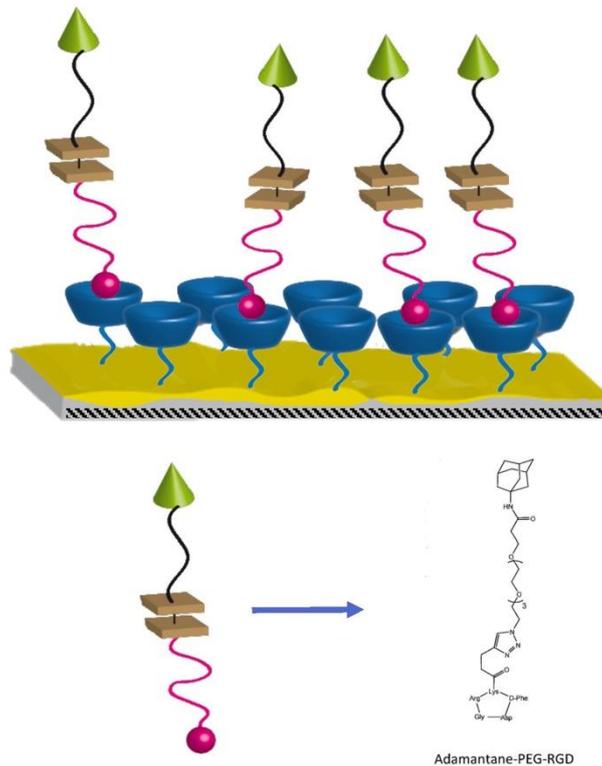
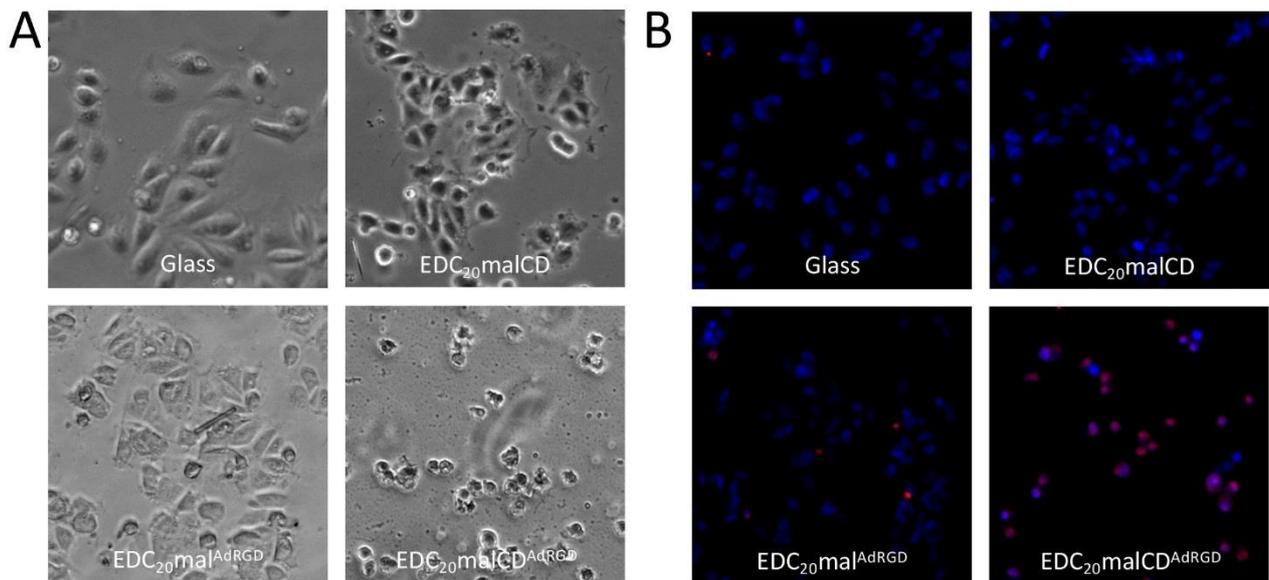


Figure 14 | Cartoon representation of polyelectrolytes multilayers displaying non-covalent RGD. Polyelectrolyte multilayers are represented in yellow. RGD is presented to the cell through a host-guest system composed of a polycyclodextrin host (in blue) and an adamantane guest (in pink). RGD binding motifs are represented in green.



**Figure 15 | Effect of the presence of non-covalently bound RDG on spreading and on cell viability . A) Images in phase contrast of PtK2 cells after 4 h of cell culture on glass, EDC<sub>20</sub>malCD, EDC<sub>20</sub>mal<sup>AdRGD</sup> and EDC<sub>20</sub>malCD<sup>AdRGD</sup>. B) Apoptotic, necrotic and healthy PtK2 cells cultured on glass, EDC<sub>20</sub>malCD, EDC<sub>20</sub>mal<sup>AdRGD</sup> and EDC<sub>20</sub>malCD<sup>AdRGD</sup> analyzed with the apoptotic/necrotic healthy cells detection kit (PromoKine) using ImageJ. Merge of Hoechst 33342 (blue) et EthD-III (red).**

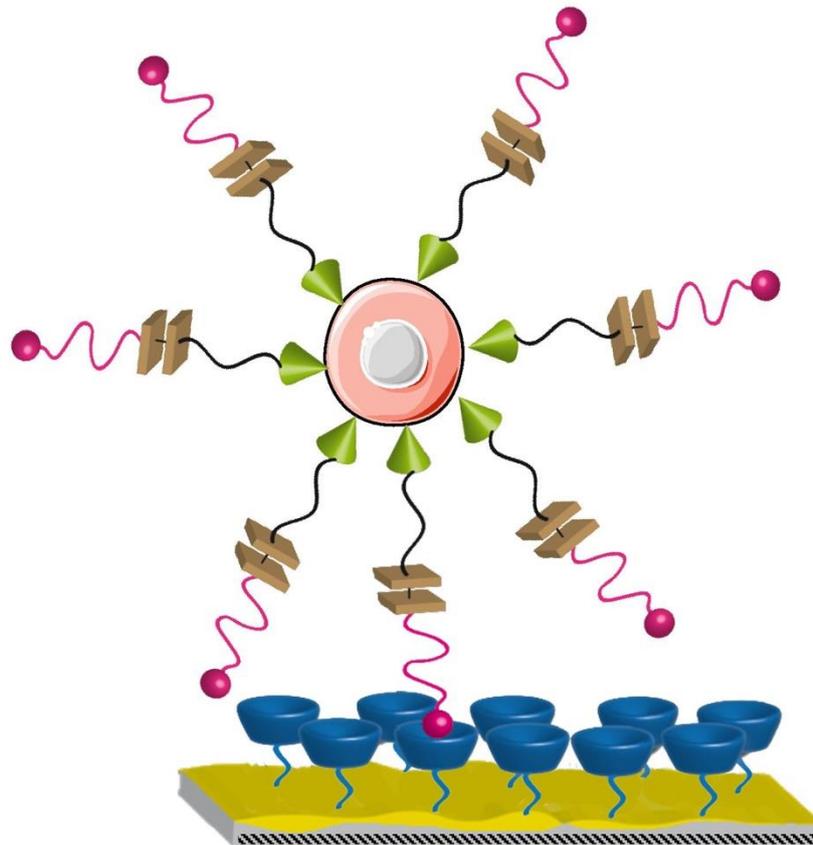
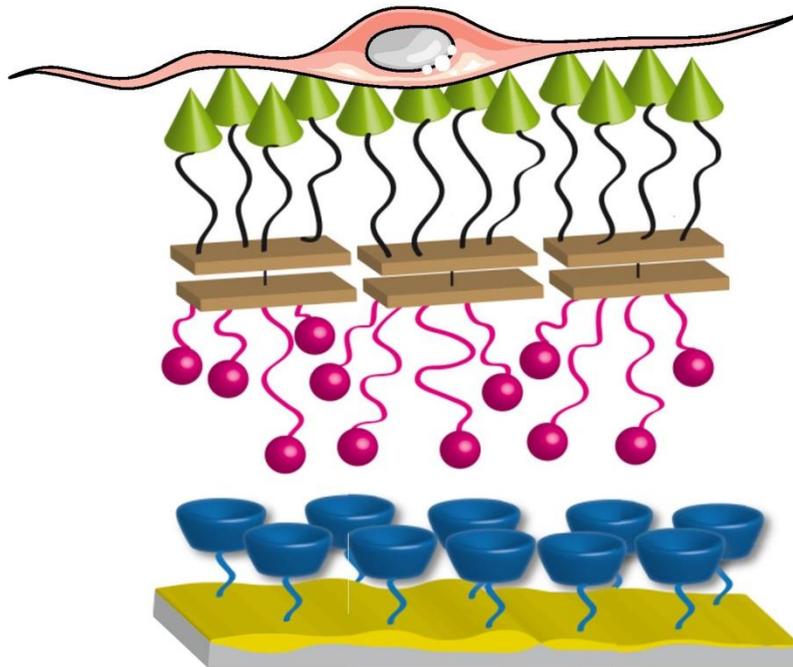


Figure 16 | Cartoon showing cells exerting traction forces against the substrate. These traction forces could be higher than host-guest interaction force leading to detachment of ADRGD molecules.



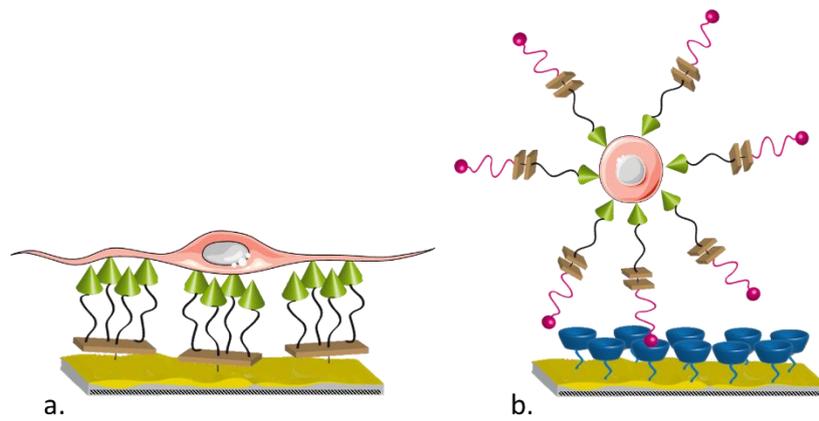
**Figure 17** |Cartoon representation of polyelectrolyte multilayers made of (PLL/HA)<sub>24</sub> (in yellow) crosslinked by EDC/NHS reaction, functionalized with maleimide and cyclodextrine (in bleu) interacting non-covalently with 4 Adamantane (in red)-PEG 1RGD (in green).

### 6.3 Résultats préliminaires

Un premier objectif a été d'étudier l'influence de la force d'interaction substrat-ligand sur l'adhérence cellulaire en utilisant un substrat de rigidité variable sur lequel les RGD sont présents de manière covalente. Le système développé est un système de raft comprenant 4-RGD liés de manière covalente sur des films multicouches de polyélectrolytes. La première étape a été de caractériser le module de Young des films utilisés et réticulés par des solutions contenant respectivement 20 et 60 mg/mL d'EDC (EDC<sub>20</sub> et EDC<sub>60</sub>). Les mesures réalisées par AFM (par nano-indentation) montrent que les films EDC<sub>0</sub>, EDC<sub>20</sub> et EDC<sub>60</sub> ont des modules élastiques apparents respectifs d'environ 20 kPa, 240 kPa et 760 kPa. Les importantes variations de module de Young caractérisées par des écart-types allant jusqu'à 300 kPa sont des incertitudes liées à la méthode de mesure. Une seconde étape a ensuite été de vérifier que le RGD était bien lié de manière covalente en présence de maléïmide. L'utilisation d'un raft RGD couplé à de la fluorescéine (4RGD<sup>FITC</sup>) et des expériences de redistribution de fluorescence après photo-blanchiment (FRAP, en anglais *Fluorescence recovery after photobleaching*) ont permis de répondre à la question. En absence de maléïmide, les rafts 4RGD<sup>FITC</sup> diffusent au sein du film. En présence de maléïmide qui permet les liaisons disulfures entre le raft et le film, les rafts 4RGD<sup>FITC</sup> ne diffusent pas. Les rafts 4RGD sont donc bien liés de manière covalente aux films en présence de maléïmide.

L'un des premiers objectifs de ce travail a été d'observer si les cellules étaient sensibles à la rigidité de leurs substrats en présence de RGD liés de manière covalente. Les substrats très faiblement rigides (EDC<sub>0</sub>) induisent une mort cellulaire par nécrose. Une importante viabilité cellulaire est observable sur EDC<sub>20</sub> et EDC<sub>60</sub> ; probablement due à la forte rigidité de ces films (240 et 760 kPa). Aucune augmentation notable de survie cellulaire n'est associée à la présence de RGD. Cependant, la présence de RGD présentés de manière covalente sur les films EDC<sub>20</sub>mal<sup>RGD</sup> et EDC<sub>60</sub>mal<sup>RGD</sup> est indispensable pour permettre l'étalement des cellules après 45 min de culture cellulaire. Cet étalement est associé à un engagement important des intégrines  $\alpha_v$  qui s'organisent en clusters ; ce qui a pour conséquence la formation de contacts focaux et de fibres de stress et d'augmenter l'aire nucléaire sans en modifier leur circularité.

Un second objectif a été d'étudier l'influence sur l'adhésion cellulaire d'un substrat sur lequel les RGDS sont présentés de manière non covalente (système hôte-invité). Un raft 1AD-1RGD a été utilisé comme ligand. Les observations réalisées en microscopie montrent qu'après 4 heures, les cellules PtK2 parviennent à s'étaler pour la condition contrôle verre et les conditions EDC<sub>20</sub>malCD et EDC<sub>20</sub>mal<sup>ADRGD</sup> mais pas en présence du système hôte-invité (EDC<sub>20</sub>malCD<sup>ADRGD</sup>). Ces résultats sont corrélés à celle de la viabilité cellulaire. Si les cellules montrent un important taux de survie pour les trois premières conditions, elles entrent en grande majorité en nécrose pour EDC<sub>20</sub>malCD<sup>ADRGD</sup>. Étant donné que pour s'attacher, la cellule génère des forces de tractions, une des hypothèses émises pour expliquer cette importante mort cellulaire est la suivante : la force de traction générée par la cellule est plus importante que la force d'interaction entre l'adamantane et la cyclodextrine, générant un détachement important de ces RGD. L'une des premières perspectives de ces travaux en cours est de répondre à l'hypothèse stipulée précédemment, serait de refaire les mêmes expériences en augmentant la multivalence et donc le nombre d'adamantanes associés à chaque RGD (**Figure 6-2**). Il serait également intéressant d'observer le comportement cellulaire au contact d'adamantane seul.



**Figure 6-2 | Une des hypothèses émises pour l'influence des forces d'interaction substrat-ligand sur l'attachement cellulaire.** Sur des substrats à rigidité variable pour lesquels les RGD sont présentés de manière covalente, les cellules sont capables d'adhérer et de former des contacts focaux (a). Sur des substrats à rigidité variable pour lesquels les RGD sont présentés de manière non covalente, la force de traction générée par la cellule est plus importante que la force d'interaction entre l'adamantane et la cyclodextrine, générant un détachement important de ces RGD (b.).

---

## Chapitre 7 Conclusion et Perspectives

Le premier projet de recherche de cette thèse a porté sur l'influence de la rigidité du substrat sur l'organisation de la chromatine de cellules épithéliales rénales de rats-kangourous, PtK2. La diminution de la rigidité du substrat induit un changement d'organisation de la chromatine. Si les noyaux de ces cellules contiennent 10% d'hétérochromatine sur des substrats rigides (200 kPa :  $E_{200}$ ), cette proportion tend à augmenter sur des substrats faiblement rigides (50 kPa :  $E_{50}$  et 20 kPa  $E_{20}$ ). Les substrats très faiblement rigides (0 kPa :  $E_0$ ) induisent la mort cellulaire par nécrose. Il est cependant possible d'influencer le destin de ces cellules en jouant directement sur l'organisation de la chromatine. La trichostatine A est un inhibiteur des histones désacétylases qui permet un maintien artificiel de la chromatine sous forme décondensée, euchromatine. Les cellules dont la chromatine est structurée en euchromatine survivent, gardent leur enveloppe nucléaire intacte ainsi qu'un réseau de filaments intermédiaires résiduel autour du noyau, sans proliférer sur des hydrogels qui leurs étaient auparavant létaux. Ces mêmes cellules retrouvent leurs capacités à s'étaler et à entrer dans un nouveau cycle cellulaire lorsqu'elles sont transférées sur des substrats rigides. Ces résultats suggèrent que par le seul maintien de la chromatine sous forme euchromatine, les cellules entrent dans un état de quiescence leur permettant de survivre sur des hydrogels très faiblement rigides.

Parallèlement, le deuxième projet de cette thèse s'est intéressé à la survie de cellules cancéreuses du côlon SW480 sur des hydrogels très mous ( $E_{20}$ ). Plus précisément, un processus de dissémination métastatique *in vitro* a été mis au point en cultivant les cellules SW480 successivement sur des hydrogels très mous et sur des surfaces rigides (verre). Les cellules meurent massivement par nécrose lors du 1<sup>er</sup> passage sur  $E_{20}$ . Après une amplification sur verre, le taux de survie de ces cellules ainsi que leur motilité et l'organisation en hétérochromatine de leur noyau augmentent lors du 2<sup>ème</sup> passage sur  $E_{20}$ . Après une nouvelle amplification, le taux de survie ainsi que la motilité cellulaire continuent d'augmenter lors du 3<sup>ème</sup> passage sur  $E_{20}$ . Ce passage est caractérisé par une diminution du contenu en hétérochromatine des noyaux. Il semblerait donc qu'au cours des deux premiers passages, les cellules répondent à un processus de dissémination précoce « hétérochromatine-dépendant » alors qu'au cours des 3<sup>èmes</sup> et 4<sup>èmes</sup> passages, elles répondent à un processus de dissémination tardif « euchromatine dépendant ».

Un troisième projet de thèse a été d'étudier l'influence de la force d'interaction substrat-ligand sur l'adhérence cellulaire. Lorsque les RGD sont présentés de manière covalente à la surface des films, ils induisent un engagement important des intégrines organisées en cluster accompagné par la formation de contacts focaux et de fibres de stress d'actine. Cet étalement et cette organisation induit une augmentation de l'aire des noyaux sans en affecter la circularité. Lorsque les RGD sont présentés de manière non covalente à la surface des films (système hôte-invité), une importante mortalité cellulaire est observée. Cette mortalité pourrait s'expliquer par une incapacité des cellules à s'attacher au substrat ; les forces de traction permettant l'adhérence cellulaire étant plus fortes que les forces d'interaction du système hôte-invité. Ces trois projets offrent aux chercheurs plusieurs perspectives.

Etendre l'étude de l'influence de la rigidité d'hydrogels sur l'organisation de la chromatine des cellules d'intérêt pour l'ingénierie tissulaire. Plus particulièrement, s'intéresser à l'impact du module élastique des tissus sur la structure de la chromatine de cellules souches en fonction de leurs niveaux de différenciation. Ainsi, il serait possible de concevoir de nouveaux matériaux qui par leurs propriétés mécaniques reprogramment épigénétiquement le noyau de la cellule. Ces matériaux pourraient également être enrichis de facteurs nucléaires impliqués dans ces régulations épigénétiques. Le modèle *in vitro* de dissémination métastatique révèle une survie cellulaire qui augmente progressivement en fonction du nombre de passages sur des hydrogels mous. Plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer la survie des cellules cancéreuses : 1) une cellule cancéreuse « potentiellement résistante » est sélectionnée dès les premiers passages sur des hydrogels mous ; 2) une survie qui découle d'une ou plusieurs mutations et 3) une survie qui traduit une adaptation progressive des cellules tumorales à leur environnement.

La dernière hypothèse semble la plus plausible. En effet, deux passages successifs sur des hydrogels mous sont létaux pour les cellules tumorales. Une ou plusieurs mutations auraient définitivement imprimés à la cellule tumorale un phénotype tumorigénique permanent. Le transcriptome des cellules après passages successifs sur des hydrogels mous devrait renseigner cette question. L'augmentation de la survie après chaque passage sur substrats mous s'accompagne d'une augmentation de la vitesse de migration et d'une réorganisation de la chromatine nucléaire. Lors des premiers et des seconds passages, la survie est associée à une structuration condensée de la chromatine (hétérochromatine). Lors des troisièmes et quatrièmes passages, la survie est associée à une structure décondensée de la chromatine (euchromatine). Une question intéressante peut être posée. La structure de la chromatine de ces cellules tumorales a-t-elle des ressemblances physiques (mobilité de la chromatine par exemple) avec la structure de la chromatine de cellules souches ?

Dans le troisième projet, la manière de présenter un ligand RGD de manière covalente ou non sur un substrat à rigidité variable montre une forte influence sur l'adhérence cellulaire. Finalement, une question qui pourrait relier les deux premiers projets au troisième serait d'étudier si cette influence sur l'adhérence cellulaire est perçue par la cellule de façon similaire lorsqu'elle a un noyau « mécaniquement ouvert » (forme euchromatine majoritaire) ou un noyau mécaniquement silencieux (forte restructuration en hétérochromatine).

# Bibliographie

- **A**bedin, M. and N. King (2010). "Diverse evolutionary paths to cell adhesion." Trends in cell biology **20**(12): 734-742.
- **A**lbinì, A., Y. Iwamoto, H. K. Kleinman, G. R. Martin, S. A. Aaronson, J. M. Kozlowski and R. N. McEwan (1987). "A Rapid in Vitro Assay for Quantitating the Invasive Potential of Tumor Cells." Cancer Research **47**(12): 3239-3245.
- **A**rnold, M., M. S. Sierra, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal and F. Bray (2016). "Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality." Gut.
- **A**shley, N. (2013). "Regulation of intestinal cancer stem cells." Cancer Letters **338**(1): 120-126.
  
- **B**adeaux, A. I. and Y. Shi (2013). "Emerging roles for chromatin as a signal integration and storage platform." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(4): 211-224.
- **B**adique, F., D. R. StamoV, P. M. Davidson, M. Veuillet, G. Reiter, J.-N. Freund, C. M. Franz and K. Anselme (2013). "Directing nuclear deformation on micropillared surfaces by substrate geometry and cytoskeleton organization." Biomaterials **34**(12): 2991-3001.
- **B**arker, T. H. (2011). "The role of ECM proteins and protein fragments in guiding cell behavior in regenerative medicine." Biomaterials **32**(18): 4211-4214.
- **B**ártová, E., J. Krejčí, A. Harničarová, G. Galiová and S. Kozubek (2008). "Histone Modifications and Nuclear Architecture: A Review." Journal of Histochemistry and Cytochemistry **56**(8): 711-721.
- **B**ausch, A. R. and K. Kroy (2006). "A bottom-up approach to cell mechanics." Nat Phys **2**(4): 231-238.
- **B**ellis, S. L. (2011). "Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials." Biomaterials **32**(18): 4205-4210.
- **B**lock, J., V. Schroeder, P. Pawelzyk, N. Willenbacher and S. Köster (2015). "Physical properties of cytoplasmic intermediate filaments." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1853**(11, Part B): 3053-3064.
- **B**onnans, C., J. Chou and Z. Werb (2014). "Remodelling the extracellular matrix in development and disease." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(12): 786-801.
- **B**osman, F. T., A. de Bruine, C. Flohil, A. van der Wurff, J. ten Kate and W. Dinjens (2003). "Epithelial-stromal interactions in colon cancer." International Journal of Developmental Biology **37**(1): 203-211.
- **B**oudou, T., T. Crouzier, C. Nicolas, K. Ren and C. Picart (2011). "Polyelectrolyte Multilayer Nanofilms Used as Thin Materials for Cell Mechano-Sensitivity Studies." Macromolecular Bioscience **11**(1): 77-89.
- **B**oudou, T., T. Crouzier, K. Ren, G. Blin and C. Picart (2010). "Multiple functionalities of polyelectrolyte multilayer films: new biomedical applications." Advanced Materials **22**(4): 441-467.
- **B**rabletz, T. (2012). "EMT and MET in metastasis: where are the cancer stem cells?" Cancer cell **22**(6): 699-701.
- **B**ravo-Cordero, J. J., M. A. O. Magalhaes, R. J. Eddy, L. Hodgson and J. Condeelis (2013). "Functions of cofilin in cell locomotion and invasion." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(7): 405-415.
- **B**urdick, J. A. and G. D. Prestwich (2011). "Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications." Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.) **23**(12): H41-H56.
- **B**utcher, D. T., T. Alliston and V. M. Weaver (2009). "A tense situation: forcing tumour progression." Nat Rev Cancer **9**(2): 108-122.
  
- **C**aló, E. and V. V. Khutoryanskiy (2015). "Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products." European Polymer Journal **65**: 252-267.
- **C**hang, W., H. J. Worman and G. G. Gundersen (2015). "Accessorizing and anchoring the LINC complex for multifunctionality." The Journal of Cell Biology **208**(1): 11-22.
- **C**harras, G. and E. Sahai (2014). "Physical influences of the extracellular environment on cell migration." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(12): 813-824.

- Chen, X., W. Xiao, W. Chen, L. Luo, S. Ye and Y. Liu (2013). "The epigenetic modifier trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses proliferation and epithelial–mesenchymal transition of lens epithelial cells." *Cell death & disease* **4**(10): e884.
- Cherkezyan, L., Y. Stypula-Cyrus, H. Subramanian, C. White, M. Dela Cruz, R. K. Wali, M. J. Goldberg, L. K. Bianchi, H. K. Roy and V. Backman (2014). "Nanoscale changes in chromatin organization represent the initial steps of tumorigenesis: a transmission electron microscopy study." *BMC Cancer* **14**(1): 1-10.
- Chia, R., F. Achilli, M. F. W. Festing and E. M. C. Fisher (2005). "The origins and uses of mouse outbred stocks." *Nat Genet* **37**(11): 1181-1186.
- Coutu, D. L. and T. Schroeder (2013). "Probing cellular processes by long-term live imaging – historic problems and current solutions." *Journal of Cell Science* **126**(17): 3805-3815.
- Cox, T. R. and J. T. Eler (2011). "Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer." *Disease Models and Mechanisms* **4**(2): 165-178.
  
- Dahl, K. N. and A. Kalinowski (2011). "Nucleoskeleton mechanics at a glance." *Journal of Cell Science* **124**(5): 675-678.
- Dahl, K. N., A. J. S. Ribeiro and J. Lammerding (2008). "Nuclear shape, mechanics, and mechanotransduction." *Circulation research* **102**(11): 1307-1318.
- Davidson, P. M., O. Fromigué, P. J. Marie, V. Hasirci, G. Reiter and K. Anselme (2010). "Topographically induced self-deformation of the nuclei of cells: dependence on cell type and proposed mechanisms." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **21**(3): 939-946.
- de Ruijter, A. J. M., A. H. van Gennip, H. N. Caron, S. Kemp and A. B. P. van Kuilenburg (2003). "Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family." *Biochemical Journal* **370**(Pt 3): 737-749.
- Decher, G. (1997). "Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites." *science* **277**(5330): 1232-1237.
- Di Cio, S. and J. E. Gautrot (2016). "Cell sensing of physical properties at the nanoscale: Mechanisms and control of cell adhesion and phenotype." *Acta Biomaterialia* **30**: 26-48.
- Dillon, N. and R. Festenstein (2002). "Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility." *Trends in Genetics* **18**(5): 252-258.
- Discher, D. E., P. Janmey and Y.-I. Wang (2005). "Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate." *Science* **310**(5751): 1139-1143.
- Discher, D. E., D. J. Mooney and P. W. Zandstra (2009). "Growth Factors, Matrices, and Forces Combine and Control Stem Cells." *Science* **324**(5935): 1673-1677.
- Dokmanovic, M., C. Clarke and P. A. Marks (2007). "Histone Deacetylase Inhibitors: Overview and Perspectives." *Molecular Cancer Research* **5**(10): 981.
- Drummond, D. C., C. O. Noble, D. B. Kirpotin, Z. Guo, G. K. Scott and C. C. Benz (2004). "CLINICAL DEVELOPMENT OF HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS AS ANTICANCER AGENTS." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **45**(1): 495-528.
- Dupont, S., L. Morsut, M. Aragona, E. Enzo, S. Giulitti, M. Cordenonsi, F. Zanconato, J. Le Digabel, M. Forcato and S. Bicciato (2011). "Role of YAP/TAZ in mechanotransduction." *Nature* **474**(7350): 179-183.
- Dupont, S., L. Morsut, M. Aragona, E. Enzo, S. Giulitti, M. Cordenonsi, F. Zanconato, J. Le Digabel, M. Forcato, S. Bicciato, N. Elvassore and S. Piccolo (2011). "Role of YAP/TAZ in mechanotransduction." *Nature* **474**(7350): 179-183.
- Dyer, K. D. and H. F. Rosenberg (2006). "The RNase a superfamily: Generation of diversity and innate host defense." *Molecular Diversity* **10**(4): 585-597.
  
- Edward, J. O., S. R.-Q. Patrick, S. Maryna, T. Zach, S. S. Jacqueline, Z. Bernhard, A. Tanya, B. Frikkie De, W. H. Jakobus, D. F. Ryan and R. B. Lee (2016). Earliest hominin cancer: 1.7-million-year-old osteosarcoma from Swartkrans Cave, South Africa.
- Engler, A., L. Bacakova, C. Newman, A. Hategan, M. Griffin and D. Discher (2004). "Substrate Compliance versus Ligand Density in Cell on Gel Responses." *Biophysical Journal* **86**(1): 617-628.
- Engler, A. J., S. Sen, H. L. Sweeney and D. E. Discher (2006). "Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification." *Cell* **126**(4): 677-689.
- Eyckmans, J., T. Boudou, X. Yu and Christopher S. Chen (2011). "A Hitchhiker's Guide to Mechanobiology." *Developmental Cell* **21**(1): 35-47.

- Faux, M. C., J. L. Ross, C. Meeker, T. Johns, H. Ji, R. J. Simpson, M. J. Layton and A. W. Burgess (2003). "Restoration of full-length adenomatous polyposis coli (APC) protein in a colon cancer cell line enhances cell adhesion." Journal of Cell Science **117**(3): 427-439.
- Fedorchak, G. R., A. Kaminski and J. Lammerding (2014). "Cellular mechanosensing: Getting to the nucleus of it all." Progress in Biophysics and Molecular Biology **115**(2-3): 76-92.
- Fidler, I. J. (2003). "The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited." Nat Rev Cancer **3**(6): 453-458.
- Flemming, W. (1882). Zellsubstanz, kern und zelltheilung, Vogel.
- Fletcher, D. A. and R. D. Mullins (2010). "Cell mechanics and the cytoskeleton." Nature **463**(7280): 485-492.
- Francius, G. (2006). Détermination des propriétés viscoélastiques de films multicouches de polyélectrolytes par sonde colloïdale au microscope de force atomique.
- Francius, G., J. Hemmerle, V. Ball, P. Lavalley, C. Picart, J.-C. Voegel, P. Schaaf and B. Senger (2007). "Stiffening of soft polyelectrolyte architectures by multilayer capping evidenced by viscoelastic analysis of AFM indentation measurements." The Journal of Physical Chemistry C **111**(23): 8299-8306.
- Frantz, C., K. M. Stewart and V. M. Weaver (2010). "The extracellular matrix at a glance." Journal of Cell Science **123**(24): 4195-4200.
  
- Gaspar-Maia, A., A. Alajem, E. Meshorer and M. Ramalho-Santos (2011). "Open chromatin in pluripotency and reprogramming." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(1): 36-47.
- Gaspar-Maia, A., A. Alajem, E. Meshorer and M. Ramalho-Santos (2011). "Open chromatin in pluripotency and reprogramming." Nature reviews Molecular cell biology **12**(1): 36-47.
- Geckil, H., F. Xu, X. Zhang, S. Moon and U. Demirci (2010). "Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics." Nanomedicine (London, England) **5**(3): 469-484.
- Geiger, B., J. P. Spatz and A. D. Bershadsky (2009). "Environmental sensing through focal adhesions." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(1): 21-33.
- Georges, P. C. and P. A. Janmey (2005). "Cell type-specific response to growth on soft materials." Journal of applied physiology **98**(4): 1547-1553.
- Gilkes, D. M., G. L. Semenza and D. Wirtz (2014). "Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis." Nat Rev Cancer **14**(6): 430-439.
- Ginnebaugh, K. R., A. Ahmad and F. H. Sarkar (2014). "The therapeutic potential of targeting the epithelial-mesenchymal transition in cancer." Expert Opinion on Therapeutic Targets **18**(7): 731-745.
- Giudice, F. S., D. S. Pinto, Jr., J. E. Nör, C. H. Squarize and R. M. Castilho (2013). "Inhibition of Histone Deacetylase Impacts Cancer Stem Cells and Induces Epithelial-Mesenchyme Transition of Head and Neck Cancer." PLoS ONE **8**(3): e58672.
- Graham, D. M. and K. Burrige (2016). "Mechanotransduction and nuclear function." Current Opinion in Cell Biology **40**: 98-105.
- Gribova, V., T. Crouzier and C. Picart (2011). "A material's point of view on recent developments of polymeric biomaterials: control of mechanical and biochemical properties." Journal of Materials Chemistry **21**(38): 14354-14366.
- Gu, L. and D. J. Mooney (2016). "Biomaterials and emerging anticancer therapeutics: engineering the microenvironment." Nat Rev Cancer **16**(1): 56-66.
- Guilluy, C. and K. Burrige (2015). "Nuclear mechanotransduction: Forcing the nucleus to respond." Nucleus **6**(1): 19-22.
- Guo, L. and L. Teng (2015). "YAP/TAZ for cancer therapy: Opportunities and challenges (Review)." International journal of oncology **46**(4): 1444-1452.
  
- Haberland, M., R. L. Montgomery and E. N. Olson (2009). "The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy." Nat Rev Genet **10**(1): 32-42.
- Halder, G., S. Dupont and S. Piccolo (2012). "Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(9): 591-600.
- Hersel, U., C. Dahmen and H. Kessler (2003). "RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond." Biomaterials **24**(24): 4385-4415.
- Ho, C. Y. and J. Lammerding (2012). "Lamins at a glance." Journal of Cell Science **125**(9): 2087-2093.
- Hoffman, A. S. (2012). "Hydrogels for biomedical applications." Advanced Drug Delivery Reviews **64**, Supplement: 18-23.

- Holzapfel, B. M., J. C. Reichert, J.-T. Schantz, U. Gbureck, L. Rackwitz, U. Nöth, F. Jakob, M. Rudert, J. Groll and D. W. Hutmacher (2013). "How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view." Advanced Drug Delivery Reviews **65**(4): 581-603.
- Hrabeta, J., M. Stiborova, V. Adam, R. Kizek and T. Eckschlager (2014). "Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. A review." Biomedical Papers **158**(2): 161-169.
- Huebsch, N. and D. J. Mooney (2009). "Inspiration and application in the evolution of biomaterials." Nature **462**(7272): 426-432.
- Humphries, J. D., A. Byron and M. J. Humphries (2006). "Integrin ligands at a glance." Journal of Cell Science **119**(19): 3901-3903.
- Humphries, J. D., N. R. Paul, M. J. Humphries and M. R. Morgan (2015). "Emerging properties of adhesion complexes: what are they and what do they do?" Trends in Cell Biology **25**(7): 388-397.
- Hynes, R. O. (2002). "Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines." Cell **110**(6): 673-687.
- Hynes, R. O. (2004). "The emergence of integrins: a personal and historical perspective." Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology **23**(6): 333-340.
- Hynes, R. O. (2012). "The evolution of metazoan extracellular matrix." The Journal of Cell Biology **196**(6): 671-679.
- Hynes, R. O. and A. Naba (2012). "Overview of the Matrisome—An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology **4**(1): a004903.
  
- Indra, I., V. Undyala, C. Kadow, U. Thirumurthi, M. Dembo and K. A. Beningo (2011). "An in vitro correlation of mechanical forces and metastatic capacity." Physical biology **8**(1): 10.1088/1478-3975/1088/1081/015015.
- Isermann, P. and J. Lammerding (2013). "Nuclear Mechanics and Mechanotransduction in Health and Disease." Current biology : CB **23**(24): 10.1016/j.cub.2013.1011.1009.
- Iskratsch, T., H. Wolfenson and M. P. Sheetz (2014). "Appreciating force and shape [mdash] the rise of mechanotransduction in cell biology." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(12): 825-833.
  
- Jaalouk, D. E. and J. Lammerding (2009). "Mechanotransduction gone awry." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(1): 63-73.
- Janmey, P. A., R. G. Wells, R. K. Assoian and C. A. McCulloch (2013). "From tissue mechanics to transcription factors." Differentiation; research in biological diversity **86**(3): 112-120.
- Jansen, K. A., D. M. Donato, H. E. Balcioğlu, T. Schmidt, E. H. J. Danen and G. H. Koenderink (2015). "A guide to mechanobiology: Where biology and physics meet." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1853**(11, Part B): 3043-3052.
- Ji, M., E. J. Lee, K. B. Kim, Y. Kim, R. Sung, S.-J. Lee, D. S. Kim and S. M. Park (2015). "HDAC inhibitors induce epithelial-mesenchymal transition in colon carcinoma cells." Oncology reports **33**(5): 2299-2308.
- Joyce, J. A. and J. W. Pollard (2009). "Microenvironmental regulation of metastasis." Nat Rev Cancer **9**(4): 239-252.
  
- Kai, F., H. Laklai and V. M. Weaver "Force Matters: Biomechanical Regulation of Cell Invasion and Migration in Disease." Trends in Cell Biology.
- Kapoor, S. and S. C. Kundu (2016). "Silk protein-based hydrogels: Promising advanced materials for biomedical applications." Acta Biomaterialia **31**: 17-32.
- Kharkar, P. M., K. L. Kiick and A. M. Kloxin (2013). "Designing degradable hydrogels for orthogonal control of cell microenvironments." Chemical Society Reviews **42**(17): 7335-7372.
- Kim, M., J. Y. Lee, C. N. Jones, A. Revzin and G. Tae (2010). "Heparin-Based Hydrogel as a Matrix for Encapsulation and Cultivation of Primary Hepatocytes." Biomaterials **31**(13): 3596-3603.
- Klein, C. A. (2008). "The Metastasis Cascade." Science **321**(5897): 1785-1787.
- Kocgozlu, L., P. Lavalley, G. Koenig, B. Senger, Y. Haikel, P. Schaaf, J.-C. Voegel, H. Tenenbaum and D. Vautier (2009). "Selective and uncoupled role of substrate elasticity in the regulation of replication and transcription in epithelial cells." Journal of Cell Science **123**(1): 29-39.
- Kocgozlu, L., M. Rabineau, G. Koenig, Y. Haikel, P. Schaaf, J.-N. Freund, J.-C. Voegel, P. Lavalley and D. Vautier (2012). "The control of chromosome segregation during mitosis in epithelial cells by substrate elasticity." Biomaterials **33**(3): 798-809.
- Kong, D., A. Ahmad, B. Bao, Y. Li, S. Banerjee and F. H. Sarkar (2012). "Histone Deacetylase Inhibitors Induce Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Prostate Cancer Cells." PLoS ONE **7**(9): e45045.

- Kothari, A. N., Z. Mi, M. Zapf and P. C. Kuo (2014). "Novel clinical therapeutics targeting the epithelial to mesenchymal transition." Clinical and Translational Medicine **3**(1): 1-14.
- Kouzarides, T. (2007). "Chromatin Modifications and Their Function." Cell **128**(4): 693-705.
- Kumar, S. and V. M. Weaver (2009). "Mechanics, malignancy, and metastasis: The force journey of a tumor cell." Cancer and Metastasis Reviews **28**(1): 113-127.
  
- Landecker, H. (2009). "Seeing things: from microcinematography to live cell imaging." Nat Meth **6**(10): 707-709.
- Langer, R. and D. A. Tirrell (2004). "Designing materials for biology and medicine." Nature **428**(6982): 487-492.
- Langer, R. and J. P. Vacanti (1993). "Tissue engineering." Science **260**(5110): 920-926.
- Lao, V. V. and W. M. Grady (2011). "Epigenetics and colorectal cancer." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **8**(12): 686-700.
- Latt, S. A., G. Stetten, L. A. Juergens, H. F. Willard and C. D. Scher (1975). "Recent developments in the detection of deoxyribonucleic acid synthesis by 33258 Hoechst fluorescence." Journal of Histochemistry & Cytochemistry **23**(7): 493-505.
- Lee, K. Y. and D. J. Mooney (2012). "Alginate: properties and biomedical applications." Progress in polymer science **37**(1): 106-126.
- Lee, P. and Charles W. Wolgemuth (2016). "Physical Mechanisms of Cancer in the Transition to Metastasis." Biophysical Journal **111**(1): 256-266.
- Levental, I., P. C. Georges and P. A. Janmey (2007). "Soft biological materials and their impact on cell function." Soft Matter **3**(3): 299-306.
- Li, S. H. A., Y. Sun and D. Gao (2013). "Role of the nervous system in cancer metastasis." Oncology Letters **5**(4): 1101-1111.
- Lichtman, J. W. and J.-A. Conchello (2005). "Fluorescence microscopy." Nat Meth **2**(12): 910-919.
- Liu, H., J. Wen, Y. Xiao, J. Liu, S. Hopyan, M. Radisic, C. A. Simmons and Y. Sun (2014). "In Situ Mechanical Characterization of the Cell Nucleus by Atomic Force Microscopy." ACS Nano **8**(4): 3821-3828.
- Liu, L., Y. Liu, J. Li, G. Du and J. Chen (2011). "Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives." Microbial Cell Factories **10**: 99-99.
- Lo, C.-M., H.-B. Wang, M. Dembo and Y.-I. Wang (2000). "Cell Movement Is Guided by the Rigidity of the Substrate." Biophysical Journal **79**(1): 144-152.
  
- Marcucci, F., G. Stassi and R. De Maria (2016). "Epithelial-mesenchymal transition: a new target in anticancer drug discovery." Nat Rev Drug Discov **15**(5): 311-325.
- Markowitz, S. D. and M. M. Bertagnolli (2009). "Molecular Origins of Cancer: Molecular Basis of Colorectal Cancer." The New England journal of medicine **361**(25): 2449-2460.
- Markowitz, S. D., D. M. Dawson, J. Willis and J. K. V. Willson (2002). "Focus on colon cancer." Cancer Cell **1**(3): 233-236.
- Marks, P. A., R. A. Rifkind, V. M. Richon, R. Breslow, T. Miller and W. K. Kelly (2001). "Histone deacetylases and cancer: causes and therapies." Nat Rev Cancer **1**(3): 194-202.
- Mason, B. N., J. P. Califano and C. A. Reinhart-King (2012). Matrix Stiffness: A Regulator of Cellular Behavior and Tissue Formation. Engineering Biomaterials for Regenerative Medicine: Novel Technologies for Clinical Applications. K. S. Bhatia. New York, NY, Springer New York: 19-37.
- Mellad, J. A., D. T. Warren and C. M. Shanahan (2011). "Nesprins LINC the nucleus and cytoskeleton." Current Opinion in Cell Biology **23**(1): 47-54.
- Meshorer, E. and T. Misteli (2006). "Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(7): 540-546.
- Miranti, C. K. and J. S. Brugge (2002). "Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction." Nat Cell Biol **4**(4): E83-E90.
- Mitragotri, S. and J. Lahann (2009). "Physical approaches to biomaterial design." Nat Mater **8**(1): 15-23.
- Moroishi, T., C. G. Hansen and K.-L. Guan (2015). "The emerging roles of YAP and TAZ in cancer." Nature reviews. Cancer **15**(2): 73-79.
- Mouw, J. K., G. Ou and V. M. Weaver (2014). "Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(12): 771-785.

- Mukhopadhyay, N. K., E. Weisberg, D. Gilchrist, R. Bueno, D. J. Sugarbaker and M. T. Jaklitsch "Effectiveness of Trichostatin A as a Potential Candidate for Anticancer Therapy in Non-Small-Cell Lung Cancer." The Annals of Thoracic Surgery **81**(3): 1034-1042.
- Necas, J., L. Bartosikova, P. Brauner and J. Kolar (2008). Hyaluronic acid (hyaluronan): a review.
- Nemir, S. and J. L. West (2010). "Synthetic Materials in the Study of Cell Response to Substrate Rigidity." Annals of Biomedical Engineering **38**(1): 2-20.
- Nguyen, D. X., P. D. Bos and J. Massague (2009). "Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization." Nat Rev Cancer **9**(4): 274-284.
- O'Dwyer, D., L. D. Ralton, A. O'Shea and G. I. Murray (2011). "The Proteomics of Colorectal Cancer: Identification of a Protein Signature Associated with Prognosis." PLoS ONE **6**(11): e27718.
- Obenauf, A. C. and J. Massagué "Surviving at a Distance: Organ-Specific Metastasis." Trends in Cancer **1**(1): 76-91.
- Olins, D. E. and A. L. Olins (2003). "Chromatin history: our view from the bridge." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(10): 809-814.
- Ophir, J., I. Cespedes, H. Ponnkantti, Y. Yazdi and X. Li (1991). "Elastography: a quantitative method for imaging the elasticity of biological tissues." Ultrasonic imaging **13**(2): 111-134.
- Oyen, M. L. (2014). "Mechanical characterisation of hydrogel materials." International Materials Reviews **59**(1): 44-59.
- Paget, S. "THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST." The Lancet **133**(3421): 571-573.
- Pelham, R. J. and Y.-I. Wang (1997). "Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(25): 13661-13665.
- Pellegrino, T., W. J. Parak, R. Boudreau, M. A. Le gros, D. Gerion, A. P. Alivisatos and C. A. Larabell (2003). "Quantum dot-based cell motility assay." Differentiation **71**(9): 542-548.
- Polioudaki, H., S. Agelaki, R. Chiotaki, E. Politaki, D. Mavroudis, A. Matikas, V. Georgoulas and P. A. Theodoropoulos (2015). "Variable expression levels of keratin and vimentin reveal differential EMT status of circulating tumor cells and correlation with clinical characteristics and outcome of patients with metastatic breast cancer." BMC Cancer **15**: 399.
- Polyak, K. and R. A. Weinberg (2009). "Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits." Nat Rev Cancer **9**(4): 265-273.
- Porcel, C., P. Lavalle, V. Ball, G. Decher, B. Senger, J.-C. Voegel and P. Schaaf (2006). "From exponential to linear growth in polyelectrolyte multilayers." Langmuir **22**(9): 4376-4383.
- Portela, A. and M. Esteller (2010). "Epigenetic modifications and human disease." Nat Biotech **28**(10): 1057-1068.
- Rabineau, M., L. Kocgozlu, D. Dujardin, B. Senger, Y. Haikel, J.-C. Voegel, J.-N. Freund, P. Schaaf, P. Lavalle and D. Vautier (2013). "Contribution of Soft Substrates to Malignancy and Tumor Suppression during Colon Cancer Cell Division." PLoS ONE **8**(10): e78468.
- Rajagopalan, H., M. A. Nowak, B. Vogelstein and C. Lengauer (2003). "The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer." Nat Rev Cancer **3**(9): 695-701.
- Rathinam, R. and S. K. Alahari (2010). "Important role of integrins in the cancer biology." Cancer and Metastasis Reviews **29**(1): 223-237.
- Ratner, B. D. (2013). A History of Biomaterials A2 - Ratner, Buddy D. Biomaterials Science (Third Edition). A. S. Hoffman, F. J. Schoen and J. E. Lemons, Academic Press: xli-liii.
- Ratner, B. D., A. S. Hoffman, F. J. Schoen and J. E. Lemons (2013). Introduction - Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor. Biomaterials Science (Third Edition), Academic Press: xxv-xxxix.
- Reymond, N., B. B. d'Agua and A. J. Ridley (2013). "Crossing the endothelial barrier during metastasis." Nat Rev Cancer **13**(12): 858-870.
- Richardson, J. J., M. Björnalm and F. Caruso (2015). "Technology-driven layer-by-layer assembly of nanofilms." Science **348**(6233).

- Richert, L., F. Boulmedais, P. Lavalle, J. Mutterer, E. Ferreux, G. Decher, P. Schaaf, J.-C. Voegel and C. Picart (2004). "Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross-linking." Biomacromolecules **5**(2): 284-294.
- Richert, L., P. Lavalle, D. Vautier, B. Senger, J. F. Stoltz, P. Schaaf, J. C. Voegel and C. Picart (2002). "Cell Interactions with Polyelectrolyte Multilayer Films." Biomacromolecules **3**(6): 1170-1178.
- Ross, T. D., B. G. Coon, S. Yun, N. Baeyens, K. Tanaka, M. Ouyang and M. A. Schwartz (2013). "Integrins in mechanotransduction." Current Opinion in Cell Biology **25**(5): 613-618.
- Rosso, F., A. Giordano, M. Barbarisi and A. Barbarisi (2004). "From Cell–ECM interactions to tissue engineering." Journal of Cellular Physiology **199**(2): 174-180.
- Rozario, T. and D. W. DeSimone (2010). "The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view." Developmental Biology **341**(1): 126-140.
- Rydzek, G., P. Schaaf, J.-C. Voegel, L. Jierry and F. Boulmedais (2012). "Strategies for covalently reticulated polymer multilayers." Soft Matter **8**(38): 9738-9755.
  
- **S**axena, M. and G. Christofori (2013). "Rebuilding cancer metastasis in the mouse." Molecular oncology **7**(2): 283-296.
- Schiller, H. B. and R. Fässler (2013). "Mechanosensitivity and compositional dynamics of cell–matrix adhesions." EMBO reports **14**(6): 509-519.
- Shaoping, M. (2004). "Role of histone deacetylase inhibitors in the treatment of cancer (Review)." International journal of oncology **25**: 1509-1519.
- Sipos, F. and O. Galamb (2012). "Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions in the colon." World Journal of Gastroenterology : WJG **18**(7): 601-608.
- Sosa, B. A., U. Kutay and T. U. Schwartz (2013). "Structural insights into LINC complexes." Current Opinion in Structural Biology **23**(2): 285-291.
- Stewart, B. and C. P. Wild (2016). "World cancer report 2014." World.
- Suresh, S. (2007). "Biomechanics and biophysics of cancer cells." Acta Materialia **55**(12): 3989-4014.
- Swift, J. and D. E. Discher (2014). "The nuclear lamina is mechano-responsive to ECM elasticity in mature tissue." Journal of Cell Science **127**(14): 3005-3015.
  
- **T**ang, Z., Y. Wang, P. Podsiadlo and N. A. Kotov (2006). "Biomedical Applications of Layer-by-Layer Assembly: From Biomimetics to Tissue Engineering." Advanced Materials **18**(24): 3203-3224.
  
- **U**zer, G., C. T. Rubin and J. Rubin (2016). "Cell Mechanosensitivity Is Enabled by the LINC Nuclear Complex." Current Molecular Biology Reports **2**(1): 36-47.
  
- **V**an Steensel, B. (2011). "Chromatin: constructing the big picture." Embo J **30**.
- Vandesande, F. (1979). "A critical review of immunocytochemical methods for light microscopy." Journal of Neuroscience Methods **1**(1): 3-23.
- Vanhaecke, T., P. Papeleu, G. Elaut and V. Rogiers (2004). "Trichostatin A-like hydroxamate histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents: toxicological point of view." Current medicinal chemistry **11**(12): 1629-1643.
- Venkatesh, S. and J. L. Workman (2015). "Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription." Nat Rev Mol Cell Biol **16**(3): 178-189.
- Vigushin, D. M., S. Ali, P. E. Pace, N. Mirsaidi, K. Ito, I. Adcock and R. C. Coombes (2001). "Trichostatin A Is a Histone Deacetylase Inhibitor with Potent Antitumor Activity against Breast Cancer in Vivo." American Association for Cancer Research **7**(4): 971-976.
- Vogel, V. and M. Sheetz (2006). "Local force and geometry sensing regulate cell functions." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(4): 265-275.
  
- **W**alen, K. H. and S. W. Brown (1962). "Chromosomes in a Marsupial (*Potorous tridactylis*) Tissue Culture." Nature **194**(4826): 406-406.
- Wang, H.-B., M. Dembo and Y.-L. Wang (2000). "Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells." American Journal of Physiology-Cell Physiology **279**(5): C1345-C1350.

- Wang, N., J. D. Tytell and D. E. Ingber (2009). "Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(1): 75-82.
- Wang, X., J. Xu, H. Wang, L. Wu, W. Yuan, J. Du and S. Cai (2015). "Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, reverses epithelial–mesenchymal transition in colorectal cancer SW480 and prostate cancer PC3 cells." Biochemical and Biophysical Research Communications **456**(1): 320-326.
- Wang, Z., M. Gerstein and M. Snyder (2009). "RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics." Nat Rev Genet **10**(1): 57-63.
- Wei, S. C., L. Fattet, J. H. Tsai, Y. Guo, V. H. Pai, H. E. Majeski, A. C. Chen, R. L. Sah, S. S. Taylor, A. J. Engler and J. Yang (2015). "Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway." Nat Cell Biol **17**(5): 678-688.
- Wells, R. G. (2008). "The role of matrix stiffness in regulating cell behavior." Hepatology **47**(4): 1394-1400.
- Whittle, N. and N. Singewald (2014). "HDAC inhibitors as cognitive enhancers in fear, anxiety and trauma therapy: where do we stand?" Biochemical Society Transactions **42**(2): 569-581.
- Williams, D. F. (2009). "On the nature of biomaterials." Biomaterials **30**(30): 5897-5909.
- Winograd-Katz, S. E., R. Fässler, B. Geiger and K. R. Legate (2014). "The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(4): 273-288.
  
- Xu, X., A. K. Jha, D. A. Harrington, M. C. Farach-Carson and X. Jia (2012). "Hyaluronic Acid-Based Hydrogels: from a Natural Polysaccharide to Complex Networks." Soft matter **8**(12): 3280-3294.
  
- Yeung, T., P. C. Georges, L. A. Flanagan, B. Marg, M. Ortiz, M. Funaki, N. Zahir, W. Ming, V. Weaver and P. A. Janmey (2005). "Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion." Cell motility and the cytoskeleton **60**(1): 24-34.
  
- Zhdanov, V. P. (2009). "Kinetics of the formation of cancer metastases via induced premetastatic cancer-stem-cell niches." Physical Review E **79**(6): 061913.
- Zink, D., A. H. Fischer and J. A. Nickerson (2004). "Nuclear structure in cancer cells." Nature Rev Cancer **4**.

# Communications scientifiques

## Communications orales

- Florence Flick, M. Rabineau, E. Mathieu, B. Senger, P. Lavalle, P. Schaaf, J.N. Freund, Y. Haikel, D. Vautier, *Chromatin plasticity directs the fate of healthy cells and cancer cells on soft matrices*, Matrix Europe Biology 2016 (MBE2016), Grèce, du 11 au 14 juin 2016.
- Florence Flick, M. Rabineau, E. Mathieu, B. Senger, P. Lavalle, P. Schaaf, J.N. Freund, Y. Haikel, D. Vautier, *Soft matrix selects aggressive colon cancer cells through chromatin structure remodeling*, 4<sup>ème</sup> Journées scientifiques de la Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), France, du 28 au 29 avril 2016.
- Florence Flick, L. Jierry, P. Lavalle, B. Senger, P. Schaaf, Y. Haikel, D. Vautier, *Influence of the matrix-ligand interactions strength on epithelial cell adhesion*. 3<sup>èmes</sup> journées scientifiques de la Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), France, du 16 au 17 avril 2015.
- Florence Flick, L. Jierry, P. Lavalle, B. Senger, P. Schaaf, Y. Haikel, D. Vautier, *Influence of the matrix-ligand interactions strength on epithelial cell adhesion*. XXIII<sup>ème</sup> Réunion Annuelle de la Société Française de Biologie de la Matrice Extracellulaire (SFBMEc) à Lyon, France, du 11 au 13 mars 2015.

## Communications par affiche

- Florence Flick, M. Rabineau, E. Mathieu, B. Senger, P. Lavalle, P. Schaaf, J.N. Freund, Y. Haikel, D. Vautier, *Chromatin plasticity directs the fate of healthy cells and cancer cells on soft matrices*, Matrix Europe Biology 2016 (MBE2016), Grèce, du 11 au 14 juin 2016.



## Publications scientifiques

- Rabineau, M., **Flick F.**, Mathieu E., Tu A., Senger B., Voegel J.-C., Lavalle P., Schaaf P., Freund J.-N., Haikel Y. and Vautier D. (2015). Cell guidance into quiescent state through chromatin remodeling induced by elastic modulus of substrate. *Biomaterials* 37: 144-155.
- **Flick F.**, Rabineau M., Mathieu E., Duluc I., Senger B., Lavalle P., Schaaf P., Freund J.N., Haikel Y., Vautier D. Soft matrix guides survival of colon cancer cells through chromatin structure remodeling. En préparation
- Yataghane R., **Flick F.**, Tu A., Senger B., Lavalle P., Schaaf P., Haikel Y. & Vautier D. Influence of the substrate-ligand interaction strength on epithelial cell adhesion. En préparation.

## La plasticité de la chromatine oriente le destin des cellules saines et des cellules cancéreuses sur des matrices de faibles rigidités.

### Résumé

L'objectif de cette thèse est d'étudier l'influence d'hydrogels de faibles rigidités sur l'organisation de la chromatine de cellules épithéliales PtK2 et cancéreuses SW480. Sur des hydrogels mous, la chromatine de PtK2 se structure en hétérochromatine tandis que les hydrogels très mous entraînent la mort des cellules par nécrose. Sur ces substrats, la chromatine, maintenue sous forme euchromatine par inhibition de HDAC, guide la cellule vers un état de quiescence. Ces cellules entrent en mitose lorsqu'elles sont transférées sur des surfaces rigides. Un processus de dissémination métastatique est développé *in vitro* en cultivant des cellules cancéreuses SW480 successivement sur des hydrogels très mous ( $E_{20}$ ) et des surfaces rigides (verre). Les cellules meurent massivement lors du 1<sup>er</sup> passage sur  $E_{20}$ . Après amplification sur verre, au 2<sup>ème</sup> passage sur  $E_{20}$ , leur survie, motilité et contenu en hétérochromatine augmentent. Au 3<sup>ème</sup> passage, la survie et la motilité progressent cependant le contenu en hétérochromatine diminue. Du 1<sup>er</sup> au 2<sup>ème</sup> passage, les cellules répondent à un processus de dissémination précoce « hétérochromatine-dépendant », du 3<sup>ème</sup> au 4<sup>ème</sup> passage à un processus tardif « euchromatine-dépendant ».

### Mots-clés

Mécano-biologie / Biomatériaux / Films multicouches de polyélectrolytes / Rigidité du substrat / Plasticité de la chromatine / Dissémination métastatique / Adhérence cellulaire.

### Résumé en anglais

The aim of this thesis is to investigate the influence of soft hydrogels on the chromatin plasticity of epithelial PtK2 and cancer SW480 cells. On soft hydrogels, the chromatin of PtK2 cells is organized in heterochromatin whereas very soft hydrogels direct the cell death by necrosis. On these substrates, the chromatin maintained in euchromatin by inhibition of HDAC guides the cells into quiescence. These cells transferred on stiff substrate enter in mitosis. An *in vitro* process of metastatic dissemination is developed from an SW480 cancer cells grown alternatively on very soft hydrogels ( $E_{20}$ ) and stiff surfaces (glass). On the 1<sup>st</sup> seeding on  $E_{20}$ , cells die massively. After the proliferation of the surviving cells on glass, the 2<sup>nd</sup> seeding on  $E_{20}$  shows that cell viability, motility and heterochromatin content increase. On the 3<sup>rd</sup> seeding on  $E_{20}$ , survival and motility continue to increase while the heterochromatin content decreases drastically. From the 1<sup>st</sup> to 2<sup>nd</sup>  $E_{20}$  seeding, cells respond to an early heterochromatin-dependent process of metastatic dissemination and from the 3<sup>rd</sup> to 4<sup>th</sup>  $E_{20}$  seeding to a late euchromatin-dependent process.

### Keywords

Mechanobiology / Biomaterials / Polyelectrolyte multilayers / Substrate stiffness / Chromatin plasticity / Metastatic dissemination / Cell adhesion