



**HAL**  
open science

# Mécanique de la phagocytose et comparaison avec d'autres processus immunitaires

Alexandra Zak

► **To cite this version:**

Alexandra Zak. Mécanique de la phagocytose et comparaison avec d'autres processus immunitaires. Biophysique [physics.bio-ph]. Institut Polytechnique de Paris, 2019. Français. NNT : 2019IPPAX012 . tel-02931176

**HAL Id: tel-02931176**

**<https://theses.hal.science/tel-02931176>**

Submitted on 5 Sep 2020

**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.



INSTITUT  
POLYTECHNIQUE  
DE PARIS

NNT : 2019IPPAX012

Thèse de doctorat



UNIVERSITÉ  
PARIS  
SUD

Comprendre le monde,  
construire l'avenir



# Mécanique de la phagocytose et comparaison avec d'autres processus immunitaires

Thèse de doctorat de l'Institut Polytechnique de Paris  
préparée à l'École polytechnique

École doctorale n°626 de l'Institut Polytechnique de Paris (ED IP Paris)  
Spécialité de doctorat : Biologie

Thèse présentée et soutenue à Palaiseau, le 4 décembre 2019, par

**ALEXANDRA ZAK**

Composition du Jury :

Sylvie CHOLLET-MARTIN Professeur, Université Paris-Sud (Laboratoire d'immunologie Autoimmunité et Hypersensibilités)	Présidente
Florence NIEDERGANG Directrice de Recherche, Institut Cochin	Rapporteuse
Manouk ABKARIAN Chargé de Recherche, Université de Montpellier (Centre de Biochimie Structurale)	Rapporteur
Karine GUEVORKIAN Chargée de Recherche, Institut Curie	Examinatrice
Julien HUSSON Professeur, École polytechnique (Laboratoire d'Hydrodynamique)	Directeur de thèse
Oliver NÜSSE Professeur, Université Paris-Sud (Laboratoire Chimie Physique)	Co-directeur de thèse
Sophie DUPRÉ-CROCHET Maître de Conférences, Université Paris-Sud (Laboratoire Chimie Physique)	Invitée



"Panta rhei !"

---

*Héraclite*



## Remerciements

Je remercie mon principal directeur de thèse, Julien Husson, Professeur au Laboratoire d'Hydrodynamique (LadHyX), pour toutes les connaissances pratiques et théoriques que tu m'as transmises. Ton soutien et ton exigence m'ont été précieux et sources de motivation tout au long de cette aventure.

Je remercie ensuite mon co-directeur de thèse Oliver Nüsse, Professeur au Laboratoire Chimie Physique (LCP). Je t'exprime ici ma gratitude pour l'orientation des choix techniques sur la partie biologique de ma thèse ainsi que pour les conseils sur la construction et la présentation des exposés oraux. Ces conseils m'ont permis d'apprendre à développer un peu de confiance.

Je remercie Avin Babataheri, ingénieure de recherche au LadHyX, tu as été la pièce maîtresse du soutien technique, et parfois moral quand les choses ne fonctionnaient pas. Je te remercie pour ta disponibilité et ton soutien quant à l'orientation professionnel. Ces moments passés avec toi ont toujours été riches d'apprentissage.

Je remercie Elodie Hudik, ingénieure d'étude au LCP, tu as été mon soutien précieux pour les expériences de biologie. Je te remercie pour ta pédagogie sur l'élaboration, la réalisation et l'analyse des données.

J'exprime toute ma gratitude à Sophie Dupré-Crochet, Maître de Conférence au LCP, tu m'as énormément appris sur la biologie des phagocytes. Tu m'as aidé à développer un esprit critique sur les bons contrôles de manips.

Je remercie Do chi toai Vu, ingénieur système au LadHyX, tu m'as soutenu quand j'essayais de détricoter un serpent entortillé nommé Python. Je t'exprime ici toute ma reconnaissance pour m'avoir aidé et soutenu dans ma démarche face à ces codes. Je remercie aussi Daniel Guy pour ton aide quand les PC Jedi ou Alexia ne répondaient plus.

Je remercie Abdul Barakat, Professeur au LadHyX, pour m'avoir suivi tout au long de cette thèse à travers les réunions de groupes. Je te remercie pour l'enthousiasme que tu m'as partagé.

Enfin, je remercie tous les amis que j'ai pu rencontrer lors de ma thèse. Je pense en premier lieu à Olga Chashchina et à Thévy Lok, mes co-promotionnelles de thèse. Je pense aussi à Antoine Barizien, à Belén Rodríguez García, à Claire Dessalles ainsi qu'à Xiuyu Wang. Ensemble, nous avons partagé les succès et les galères de la thèse. Je remercie Tom Maddalena pour la joie de vivre que tu m'as partagée en fin de troisième année. Je remercie aussi Emily Ball, Lisa Bertrand, Alexandra Ostrouch, Michaël Desfromont et mon frère, Enzo Bera, pour ces bons moments qui ont su me ressourcer. Enfin, cette aventure n'aurait pu se terminer sans le soutien et l'écoute de Pascal Jouy. Je vous exprime ici à tous mon entière amitié.

Je remercie aussi particulièrement Sandrine Desroches et Benoit Deveaux pour le soutien logistique précieux qui m'a permis d'écrire et de soutenir ma thèse dans de bonnes conditions.

Merci pour ces riches années et à bientôt !



# Table des matières

<b>Introduction générale</b>	<b>9</b>
<b>1 Rhéomètre à cellule unique : mesurer les propriétés viscoélastiques de cellules non adhérentes</b>	<b>37</b>
1 Introduction . . . . .	38
2 Rhéomètre à cellule unique . . . . .	38
3 Quantifier les propriétés viscoélastiques de cellules non adhérentes . . . . .	46
4 Différentes configurations du rhéomètre . . . . .	52
<b>2 Mécanique de la phagocytose</b>	<b>57</b>
1 Introduction . . . . .	59
2 Résultats . . . . .	63
3 Discussion . . . . .	101
4 Matériel et Méthodes . . . . .	105
<b>3 Single-cell immuno-mechanics : large cell-type-specific viscoelastic changes during white blood cell activation</b>	<b>115</b>
1 Introduction . . . . .	117
2 Discussion . . . . .	125
3 Materials and Methods . . . . .	127
4 Supplementary Material . . . . .	133
<b>Discussion générale</b>	<b>145</b>
<b>Liste des symboles</b>	<b>151</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>169</b>



# Introduction générale

## Sommaire

---

<b>1</b>	<b>Le système immunitaire . . . . .</b>	<b>10</b>
1.1	Brève définition d'une réponse immunitaire . . . . .	10
1.2	Exemple d'une réponse immunitaire . . . . .	12
<b>2</b>	<b>La phagocytose . . . . .</b>	<b>14</b>
2.1	Découverte de la phagocytose . . . . .	14
2.2	Les phagocytes . . . . .	16
2.3	Molécules impliquées dans l'établissement de la phagocytose . . . . .	21
2.4	Chronologie des événements morphologiques de la phagocytose . . . . .	23
2.5	La phagocytose peut être frustrée . . . . .	27
<b>3</b>	<b>La mécanique dans les fonctions immunes adaptatives . . . . .</b>	<b>29</b>
3.1	Les lymphocytes T . . . . .	29
3.2	Les lymphocytes B . . . . .	31
<b>4</b>	<b>Outils permettant de mesurer les propriétés mécaniques de cellules . . . . .</b>	<b>32</b>
4.1	Cytométrie de déformation en temps réel (Real-Time Deformability Cytometry) . . . . .	32
4.2	La microscopie à force atomique . . . . .	33
4.3	Les micropipettes . . . . .	34
<b>5</b>	<b>Objectifs de la thèse . . . . .</b>	<b>36</b>

---

Ce manuscrit de thèse est à l'interface de deux domaines : l'immunologie et la mécanique. Il a vocation à apporter un éclairage mécanique à la compréhension de fonctions immunes, notions centrales de l'immunologie et plus largement, de la biologie. La fonction principalement étudiée dans ce manuscrit est la capacité des cellules à détecter, ingérer et détruire un objet : la phagocytose. En quoi une cellule peut-elle réaliser une phagocytose menant avec succès à l'internalisation de l'objet ? En quoi les propriétés mécaniques des cellules capables de phagocyter pourraient-elles être limitantes dans cette capacité ? Existe-t-il des signatures mécaniques traduisant une fonction immune ? Après avoir expliqué le cadre et les objectifs de ce travail de thèse, nous proposons des réponses à ces questions.

## **1 Le système immunitaire**

Le système immunitaire est concomitant à la vie. Ce système est traditionnellement pensé comme nous protégeant contre les pathogènes, mais sa fonction ne se limite pas à la protection : il est aussi essentiel au développement d'un individu [Hooper et al., 2012, Pradeu, 2019, Morimoto and Nakajima, 2019]. Nous nous concentrerons dans cette introduction sur les fonctions protectrices du système immunitaire.

### **1.1 Brève définition d'une réponse immunitaire**

Une réponse immunitaire est déclenchée par la détection d'un antigène (motif moléculaire) immunogène qui va entraîner une succession de réactions cellulaires visant soit à détruire ce qui a été détecté comme portant l'antigène immunogène (un pathogène par exemple), soit à le tolérer, comme le sont les bactéries du microbiote [Köhler and Zeiser, 2019]. Une réponse visant à détruire un pathogène est une réponse effectrice ; une réponse visant à tolérer est tolérogène [Pradeu Thomas and Eric, 2017].

Dans cette introduction générale, nous avons choisi d'illustrer une réponse immunitaire effectrice déclenchée par une bactérie, qui débute avec la partie innée du système immunitaire et s'achève avec la partie adaptative. Nous présentons tout d'abord les acteurs cellulaires de la partie innée et adaptative.

#### **Les cellules de la partie innée**

Les cellules de la partie innée du système immunitaire sont celles qui détectent en premier l'antigène immunogène. Les acteurs cellulaires expriment des récepteurs qui ont une reconnaissance large des motifs moléculaires et sont moins spécifiques que ceux de la partie adaptative [Vivier and Malissen, 2005].

La partie innée du système immunitaire est composée de différents types cellulaires : les

granulocytes (neutrophiles, éosinophiles, basophiles) ainsi que les monocytes (qui peuvent être différenciés en macrophages ou en cellules dendritiques) (figure 1 page suivante). Les cellules dendritiques font le pont entre l'immunité innée et celle adaptative. Cette thèse portera essentiellement sur les neutrophiles.

### **Les cellules de la partie adaptative**

La partie innée du système immunitaire n'est retrouvée que chez les vertébrés à mâchoires. Cette partie du système immunitaire est hautement spécifique de l'antigène détecté et permet, notamment, d'apporter une mémoire de l'antigène détecté pour réagir plus rapidement lors de la prochaine rencontre avec cet antigène.

Dans cette partie adaptative, il existe deux grandes familles de lymphocytes : les T et les B (figure 1 page suivante). Ces lymphocytes sont appelés T ou B selon le récepteur qu'ils expriment à leur surface : le BCR (B Cell Recepteur) pour les lymphocytes B ou le TCR (T Cell Receptor) pour les lymphocytes T.

**Les lymphocytes T** Il existe plusieurs sous-familles de lymphocytes T qui ne partagent pas les mêmes fonctions. Certains vont être impliqués dans l'induction de la mort par apoptose des cellules infectées par un virus ou des cellules cancéreuses (les lymphocytes cytotoxiques), d'autres vont médier une inflammation (lymphocytes Th17), et d'autres encore vont réguler cette dernière (lymphocytes Treg, *reg* pour régulateur). Leurs fonctions ne sont pas toutes précisées ici, cependant les lymphocytes les plus importants pour cette thèse sont les lymphocytes T CD4+ (CD4+ car exprimant le corécepteur CD4, ces cellules sont aussi appelées lymphocytes T auxiliaires) qui participent à l'orchestration de la réponse immune adaptative, notamment en activant, par coopération, les lymphocytes B.

**Les lymphocytes B** Les lymphocytes B sont le support de la réponse immune adaptative humorale : ils sécrètent des anticorps solubles. Ces cellules ont besoin d'un lymphocyte T auxiliaire pour être activées. Après l'activation de leur récepteur BCR, celles-ci vont pouvoir se différencier en plasmocytes, cellules sécrétrices d'anticorps spécifiques de l'antigène qui a été reconnu lors de l'activation du lymphocyte B.

### **Les récepteurs des lymphocytes T et B : TCR et le BCR**

**Le TCR** Le TCR est composé de deux chaînes,  $\alpha$  et  $\beta$ , qui possèdent des zones hypervariables qui vont reconnaître un peptide antigénique. Ces chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  portent des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif) qui vont être phosphorylés lorsque que le TCR

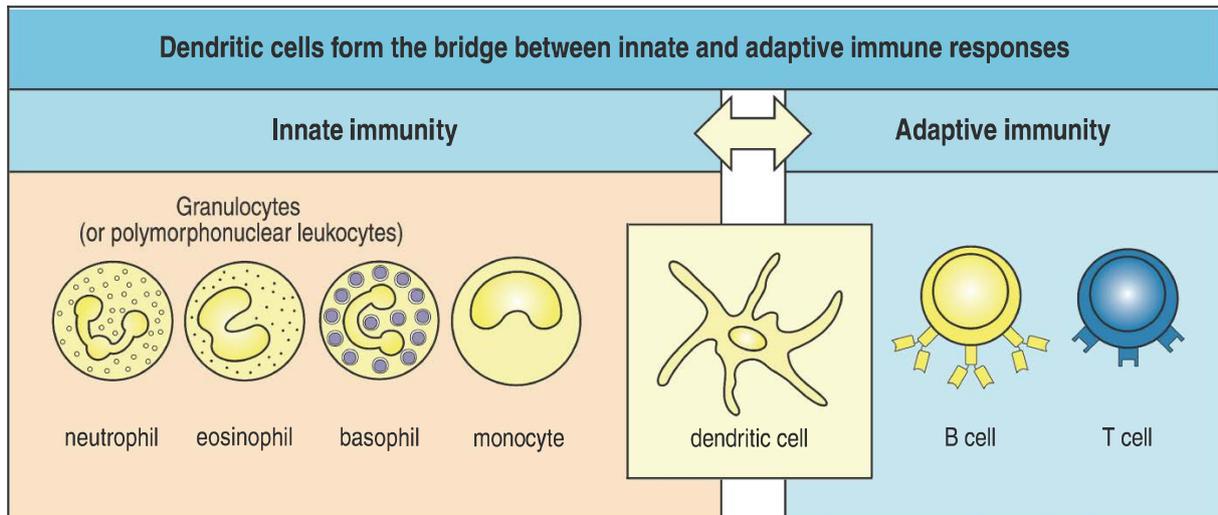


FIGURE 1 – Les acteurs cellulaires de la partie innée et de la partie adaptative du système immunitaire. Le schéma provient de la huitième édition du livre *Janeway's Immunobiology* [Kenneth Murphy, 2012].

a reconnu un antigène via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Le TCR seul ne peut pas transmettre le signal d'activation. La molécule CD3 qui est associée au TCR est composée de quatre chaînes : deux chaînes  $\epsilon$ , une  $\gamma$  et une  $\delta$ . Quand les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR ont reconnu un peptide antigénique, les chaînes du CD3 transmettent le signal à l'intérieur de la cellule via des cascades de signalisation (figure 2a page ci-contre).

**Le BCR** Le BCR porte aussi des motifs ITAM permettant d'induire des cascades de signalisation après la reconnaissance d'un antigène. Le BCR fait partie de la famille des immunoglobulines (Ig) et est un anticorps transmembranaire (figure 2b). Après coopération avec un lymphocyte T auxiliaire, les lymphocytes B vont se différencier en plasmocytes et sécréter des anticorps solubles, des immunoglobulines G (IgG) qui possèdent deux parties hypervariables qui se trouvent à l'extrémité N-terminale et sont hautement spécifiques de l'antigène (figure 2c page suivante). La partie constante de l'immunoglobuline sécrétée est celle qui nous intéresse dans le cadre de la phagocytose. Cette partie est appelée «  $F_c$  ». La partie entre la partie constante et celle variable est flexible et est constituée de ponts disulfures.

## 1.2 Exemple d'une réponse immunitaire

La figure 3 page 14 illustre une réponse immunitaire effectrice. Suite à une infection bac-

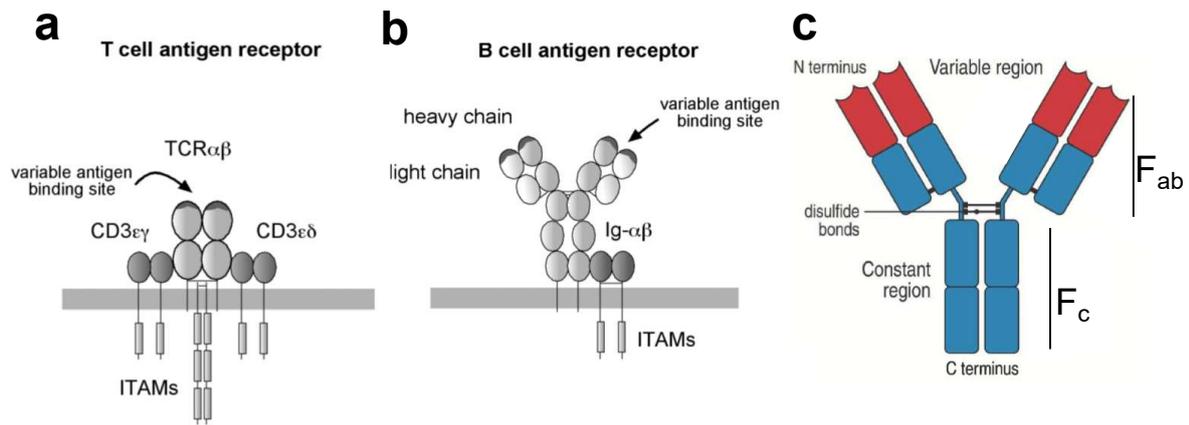


FIGURE 2 – Schémas des structures d'un TCR, d'un BCR et d'une IgG. a) Les différentes chaînes du TCR et du CD3. b) Les différentes chaînes du BCR. c) Schéma de la structure d'une IgG avec la partie variable ( $F_{ab}$ ) à l'extrémité N-terminale et la partie constante ( $F_c$ ) à l'extrémité C-terminale. Les schémas a) et b) proviennent de [Molnár et al., 2009] et le schéma c) provient de la huitième édition du livre *Janeway's Immunobiology* [Kenneth Murphy, 2012].

térienne locale, les macrophages et les cellules dendritiques résidents présents dans les tissus phagocytent les bactéries (figure 3 page suivante premier panneau) : elles les détectent et les internalisent pour les détruire. Une fois les bactéries phagocytées, une inflammation locale est générée par la sécrétion de protéines solubles (cytokines et chimiokines) pour recruter d'autres cellules sur le site de l'infection [Haraoka et al., 1999]. Après avoir phagocyté, les cellules dendritiques présentent à leur surface des peptides issus des bactéries en les présentant dans la poche antigénique du Complexe d'Histocompatibilité Majeur (CMH) ; elles sont alors appelées des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Ces CPA migrent ensuite au ganglion lymphatique où les TCR portés par les lymphocytes T CD4+ reconnaissent le peptide antigénique présenté par le CMH (p-CMH). Une fois qu'un TCR a reconnu un pCMH qui lui est spécifique, des corécepteurs vont stabiliser l'interaction entre le TCR et le pCMH et des molécules de co-stimulation (telle que le CD28) sont exprimées. Selon la sous-famille de lymphocytes T, ce corécepteur sera le CD4 ou le CD8, donnant lieu aux lymphocytes T CD4+ (lymphocytes T auxiliaires) ou aux lymphocytes T CD8+ (aussi appelés lymphocytes cytotoxiques). Quand la reconnaissance entre TCR et un pCMH est stabilisée, les deux cellules forment une interface appelée synapse immunologique [Dustin, 2014]. Cette synapse autorise un dialogue très précis entre lymphocyte et une CPA, dialogue qui dure plusieurs heures [Azar et al., 2010].

Les lymphocytes T CD4+ vont activer lymphocytes B qui vont ensuite se différencier en plas-

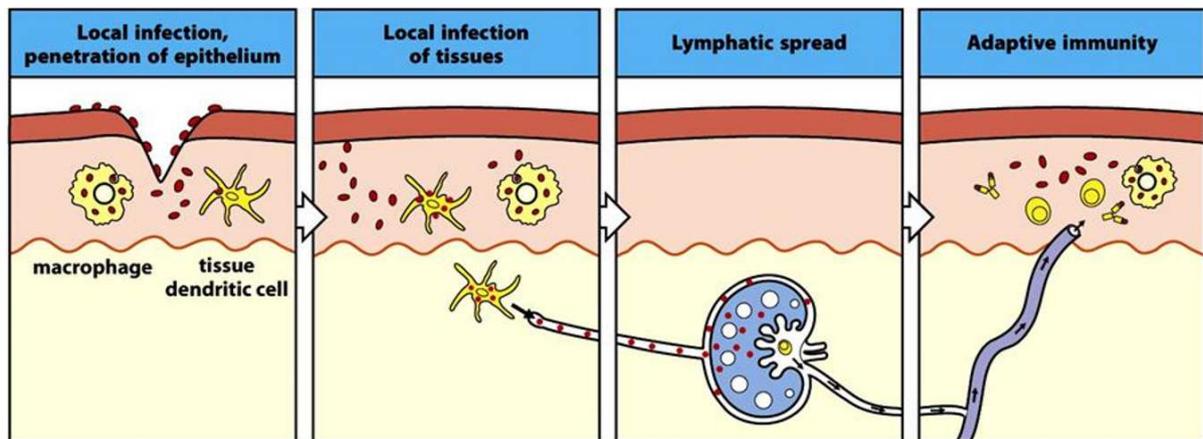


FIGURE 3 – Schéma d’une réponse immunitaire effectrice. De gauche à droite : les macrophages et les cellules dendritiques (en forme d’étoile) résidents phagocytent les bactéries, puis migrent au ganglion lymphatique pour recruter les lymphocytes T et B au site infecté. Le schéma provient de la huitième édition du livre *Janeway’s Immunobiology* [Kenneth Murphy, 2012].

mocytes, cellules capables de produire des anticorps.

## 2 La phagocytose

### 2.1 Découverte de la phagocytose

La phagocytose a été découverte par Elie Metchnikoff (1845-1916) (figure 4a) à la fin du 19e siècle, découverte pour laquelle il reçut le prix Nobel en 1908. Le mot phagocytose vient du grec *phagein* ("manger") et *kutos* ("cellule") et illustre la capacité d’une cellule à internaliser et détruire ce qu’elle a ingéré. E. Metchnikoff était un embryologiste. Pendant ses études, il travailla sur les éponges et les embryons de méduses. Il découvrit que le mésoderme (feuillet qui donne notamment lieu au développement des muscles) de ces embryons pouvait se former autrement que par invagination : des cellules flagellées appelées les cellules errantes (*wandering cells*) migrent d’un pôle de l’embryon et digèrent l’intérieur de celui-ci pour former le mésoderme (figure 4b). Pour illustrer la fonction digestive de ces cellules, E. Metchnikoff appela ce processus de formation du mésoderme *phagocytella* [Tauber and Chernyak, 1991]. Pensant que la capacité cellulaire à digérer pouvait servir de protection envers des infections ou tout corps étranger, E. Metchnikoff injecta des épines de roses dans des daphnies (petits crustacés transparents) et observa que des cellules étaient capables d’ingérer ces épines. Il injecta aussi des bactéries dans des grenouilles, donnant le même résultat (figure 4c). Il appela ce processus

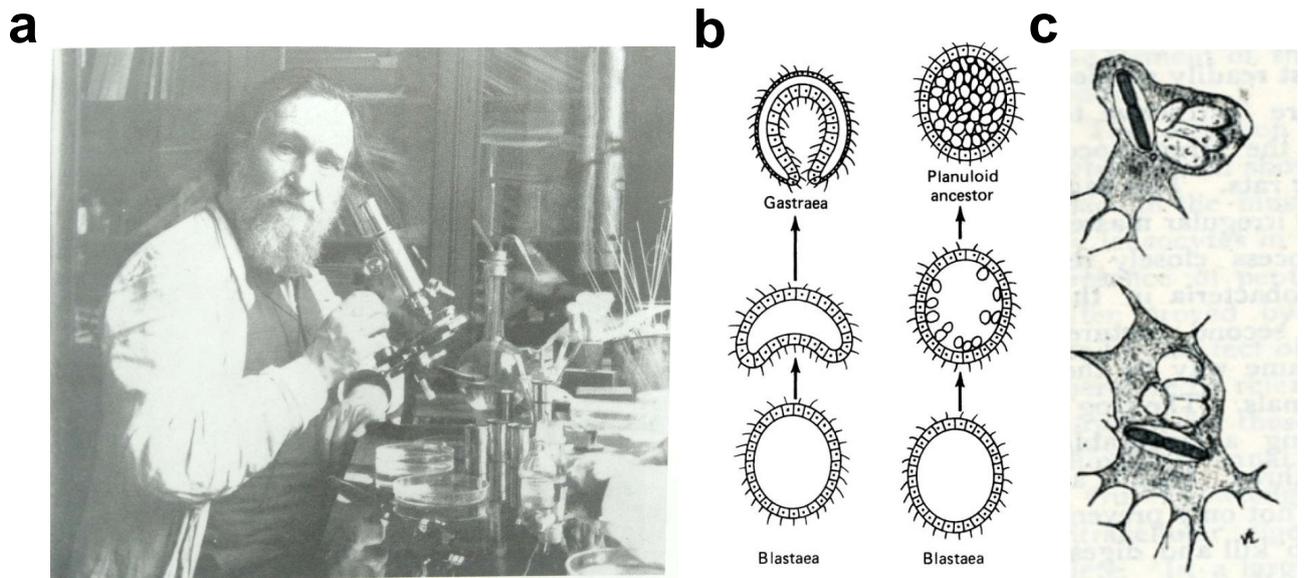


FIGURE 4 – Découverte de la phagocytose par E. Metchnikoff. a) E. Metchnikoff à l’Institut Pasteur vers 1906. b) Embryogenèse : formation du mésoderme par invagination (panneau de gauche) ou par invasion des cellules errantes (parenchymella, panneau de droite). c) Dessins originaux de E. Metchnikoff d’un bacille d’anthrax phagocyté par un leucocyte de grenouille. Les deux figures représentent le mouvement d’une même cellule. Les images a) et b) proviennent du livre *Metchnikoff and the Origins of Immunology* de A. I. Tauber et L. Chernyak [Tauber and Chernyak, 1991]. Le dessin en c) provient du livre *Immunité dans les maladie infectieuses* d’E. Metchnikoff [Metchnikoff, 1901].

*phagocytose* pour illustrer la capacité des cellules à ingérer et détruire.

**Définition de la phagocytose** La phagocytose est un processus cellulaire qui consiste pour une cellule à détecter, internaliser et détruire une bactérie, un champignon ou une cellule morte qui a un diamètre supérieur à  $0.5 \mu\text{m}$  [Flannagan et al., 2012, Niedergang, 2016b]. Ce processus est aussi utilisé par des amibes telles que *Dictyostelium discoideum* pour se nourrir [Dunn et al., 2018]. Pour les organismes pluricellulaires, la phagocytose sert à protéger l’organisme des pathogènes, et participe aussi au développement d’un individu en participant au remodelage des tissus [Lemaitre and Hoffmann, 2007, Galloway et al., 2019] ainsi que les phases d’initiation et de résolution de l’inflammation [Stuart and Ezekowitz, 2005].

Pendant la phagocytose, une cible à phagocyter est internalisée et transportée dans la cellule dans un compartiment transitoire appelé phagosome [Nüsse, 2011]. Plus la cible phagocytée est large, plus le phagosome sera large et se dirigera préférentiellement vers le noyau [Keller et al., 2017]. Pendant son transport, la cible ingérée est dégradée : le phagosome s’acidifie [Ip et al., 2010], des protéases sont activées et des espèces réactives de l’oxygène sont secrétées via l’enzyme NADPH Oxydase 2 (NOX2) [Dupre-Crochet et al., 2013]. Cette des-

truction permet d'exposer des sites cryptiques de la cible phagocytée qui étaient inaccessibles avant la destruction de la cible. Les peptides de cette cible seront ensuite exposés via le CMH de classe II [Underhill and Goodridge, 2012] (figure 5 de la présente page).

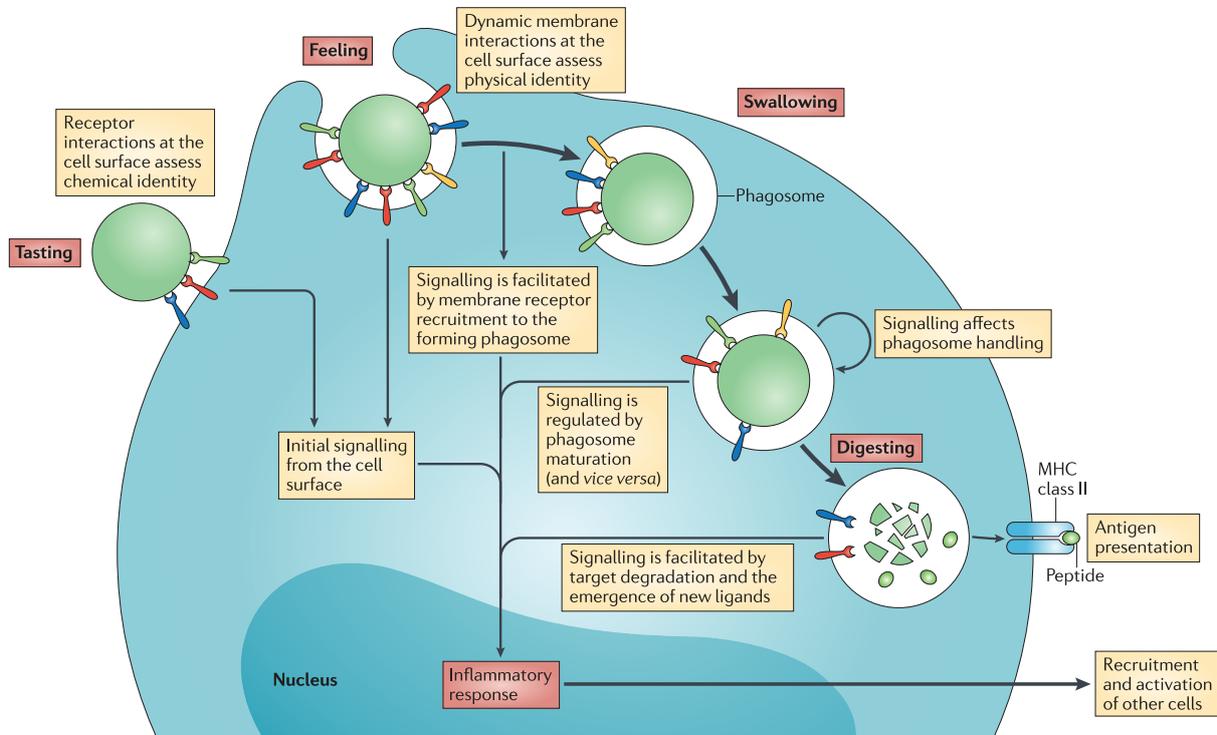


FIGURE 5 – Étapes de la phagocytose. La cellule détecte et internalise une cible dans un compartiment transitoire, le phagosome. La cible est dégradée à l'intérieur du phagosome, et des peptides issus de cette dégradation seront présentés via le CMH de classe II à la surface de la cellule. Le schéma représente un macrophage. Le schéma provient de [Underhill and Goodridge, 2012].

## 2.2 Les phagocytes

Les phagocytes sont des cellules capables de phagocyter. Les phagocytes professionnels sont les macrophages, les granulocytes (les neutrophiles, basophiles et éosinophiles) ainsi que les cellules dendritiques. Ces phagocytes professionnels dérivent d'un progéniteur commun présent dans la moelle osseuse et sont différenciés en phagocytes dans cette même moelle. Même s'il existe des phagocytes professionnels, la phagocytose n'est pas restreinte à ces derniers : les cellules épithéliales de la rétine [Finnemann et al., 1997] ou des cellules endothéliales du foie [Steffan et al., 1986] peuvent aussi phagocyter. Dans cette introduction, nous nous intéresserons particulièrement aux neutrophiles.

## **Les neutrophiles**

Les neutrophiles représentent 70% des leucocytes présents dans le sang humain. Ces cellules mobiles et non adhérentes ont un rôle important dans la fonction de défense de l'organisme contre les agents pathogènes, et sont aussi largement recrutées au niveau des sites inflammatoires [Mantovani et al., 2011]. La durée de vie des neutrophiles circulants est courte, allant de 6-8 heures [Dancey et al., 1976] à 5.4 jours dans la circulation sanguine humaine [Pillay et al., 2010]. Leur temps de demi-vie ex vivo est d'environ 2 jours (40 heures) [Colotta et al., 1992].

## **Les lignées cellulaires différenciées en neutrophiles**

Pour travailler avec des neutrophiles primaires humains, ces derniers doivent être extraits du sang selon un protocole long et délicat et ne peuvent ensuite être gardés en culture que quelques heures. Deux lignées cellulaires (PLB-985 et HL-60) provenant d'une même patiente atteinte de leucémie peuvent être différenciées en neutrophiles, nous permettant ainsi une facilité de culture. Nous n'avons pas réalisé de transfection sur ces lignées cellulaires pour ce travail de thèse, mais il est important de souligner que ces lignées offrent l'avantage de pouvoir être transfectées de manière stable. Une fois différenciées en neutrophiles, les lignées HL-60 et PLB-985 ne présentent pas de différence dans l'expression de leurs gènes [Ashkenazi and Marks, 2009]. Dans cette thèse, nous avons utilisé la lignée cellulaire PLB-985 que nous avons différenciée en neutrophiles. Ces neutrophiles différenciés sont appelés dans la suite des cellules PLB. Ces cellules PLB peuvent être utilisées pour comprendre les mécanismes physiologiques des neutrophiles. En effet, ces cellules ont un phénotype similaire à celui des neutrophiles primaires humains au regard de leur morphologie, de la dynamique de sécrétion d'anions superoxydes, de leurs granules négatives pour la myéloperoxidase ainsi que pour leurs capacités de dégranulation [Pedruzzi et al., 2002]

**Différenciation des neutrophiles** Pendant la granulopoïèse (différenciation d'un progéniteur en granulocyte), les myéloblastes (progéniteurs) vont progressivement être maturés en promyélocytes, en myélocytes, en métamyélocytes puis en neutrophiles (granulocytes), qui est le stade mature de la différenciation (figure 6 page suivante). Cette maturation est caractérisée par l'émergence de granules et de vésicules de sécrétion : la granulopoïèse commence avec les granules azurophiles (granules primaires) qui contiennent notamment des défensines et des myéloperoxidases qui seront recrutées au phagosome pendant la phagocytose. Des granules spécifiques (granules secondaires) émergent ensuite dans les myélocytes et les métamyélocytes, stades pendant lesquels le noyau commence à aborder une morphologie étirée. Des peptides an-

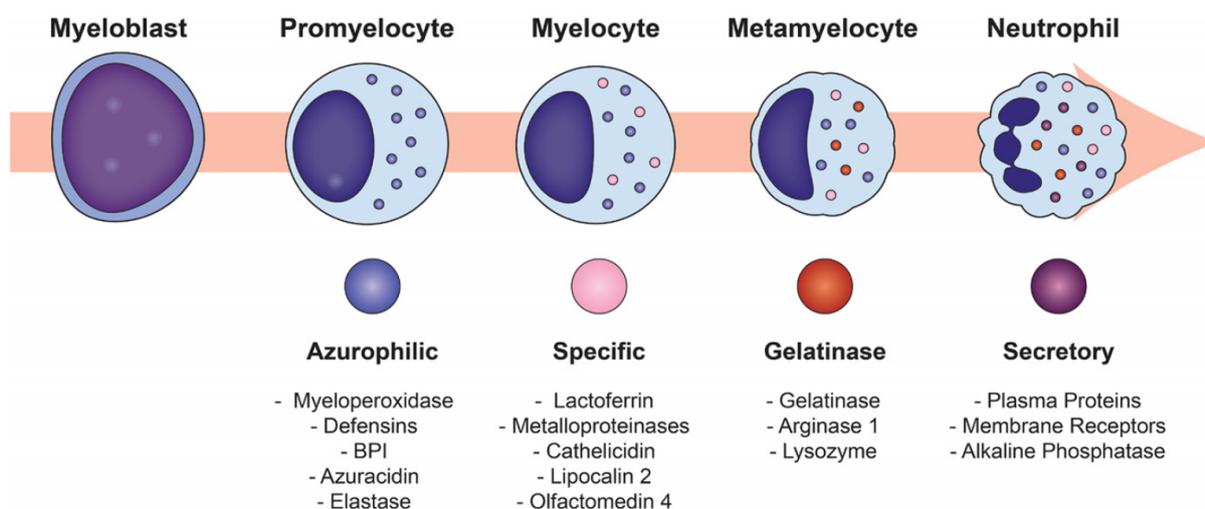


FIGURE 6 – Granulopoïèse. Différenciation d'un myéloblaste en neutrophile et les types de granules associés à chaque étape. Le myéloblaste est d'abord différencié en promyélocyte, dans lequel des granules azurophiles (granules primaires) se trouvent avec, notamment, des myéloperoxydases et des défensines se trouvant à l'intérieur de ces granules. Le promyélocyte est ensuite maturé en myélocyte, portant des vésicules spécifiques (granules secondaires) contenant des métalloprotéinases. Le myélocyte est ensuite différencié en métamyélocyte, dans lequel des granules à gélatinases (granules tertiaires) sont présentes. Le dernier stade de la différenciation, et celui du neutrophile, où le noyau apparaît comme polylobé et où des vésicules de sécrétion sont présentes contenant des protéines comme des récepteurs membranaires. Le schéma provient de [Lawrence et al., 2018].

timicrobiens sont présents dans ces granules spécifiques, peptides qui peuvent être sécrétés dans le phagosome ou dans le milieu extracellulaire. Les granules de gélatinases (granules tertiaires) sont formées pendant la transition de métamyélocytes en neutrophiles, phase pendant laquelle le neutrophile établit son premier contact avec l'endothélium [Jacobsen et al., 2007]. Des enzymes capables de dégrader la matrice extracellulaire, comme la gélatinase, se trouvent dans ces vésicules. Les vésicules sécrétoires, qui émergent une fois la différenciation terminée, sont celles qui sont majoritairement exocytées, constituant ainsi un important stock de membrane. Ces vésicules sécrétoires sont plus petites que les granules précédemment exposées. Celles-ci sont localisées à la membrane des neutrophiles, elles sont constituées de protéines essentielles à l'établissement d'un contact avec l'endothélium et sont facilement recrutées à la membrane pendant la phagocytose.

Une fois différenciées en neutrophiles, ces cellules entrent dans la circulation sanguine et migrent vers les tissus. Les neutrophiles matures sont appelés *polymorphonuclear neutrophil* (PMN) et seront appelés neutrophiles primaires dans ce manuscrit, en opposition aux cellules PLB qui sont issues d'une lignée cellulaire.

**Fonctions des neutrophiles** Les neutrophiles constituent la première ligne de défense contre les infections. En plus de leur fonction antimicrobienne, les neutrophiles sont impliqués dans la sécrétion de cytokines modulant l'inflammation, ainsi que dans plusieurs pathologies. Nous nous concentrerons ici sur l'activité anti-microbienne, c'est-à-dire défensive, des neutrophiles. Trois types de fonctions antimicrobiennes sont décrites : la phagocytose, la dégranulation et la libération de *Neutrophil Extracellular Traps* (NET) (7 de la présente page).

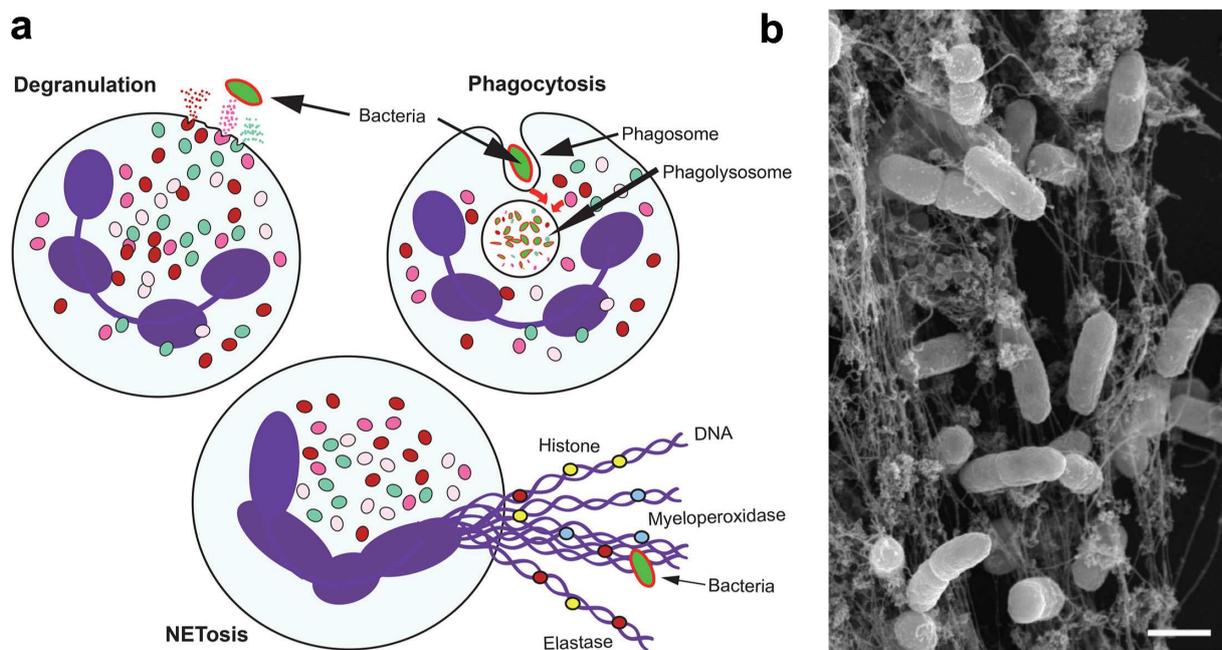


FIGURE 7 – Fonctions réalisées par les neutrophiles. a) Trois fonctions réalisées par les neutrophiles : dégranulation, phagocytose et NETose. Le schéma provient de [Rosales, 2018]. b) Bactéries capturées dans un NET. Microscopie électronique d'un neutrophile primaire humain incubé en présence de Salmonelles. L'image provient de [Brinkmann and Zychlinsky, 2012]. La barre d'échelle est de 1  $\mu\text{m}$ .

**La phagocytose** Cette fonction est au cœur de cette thèse, et est décrite à la page 15.

**La dégranulation** Au cours de leur différenciation, les neutrophiles acquièrent des granules possédant différentes protéines. La dégranulation consiste en libération de ces protéines contenues à l'intérieur des granules qui ont pour fonction de détruire les agents pathogènes (granules primaires et secondaires), de dégrader la matrice extracellulaire (granules tertiaires) ou d'augmenter la surface membranaire (vésicules sécrétoires). Une dégranulation excessive est retrouvée dans les pathologies inflammatoires comme l'asthme ou l'arthrite rhumatoïde [Rosales, 2018]. Cette fonction n'est pas restreinte aux neutrophiles, et est aussi retrouvée chez

les mastocytes ainsi que les éosinophiles.

Après qu'un récepteur exprimé à la surface cellulaire des neutrophiles, comme les lectines, les granules sont recrutées du cytoplasme à la membrane plasmique. Ce processus est dépendant de l'actine et des microtubules. Après son recrutement, la granule fusionne avec la membrane plasmique et le relargage des protéines contenues dans la granule a lieu dans le milieu extracellulaire. [Lacy, 2006]. La translocation à la membrane ainsi que le relargage du contenu des granules requiert une augmentation de la concentration intracellulaire du calcium ainsi qu'une hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP). Pendant l'exocytose, la surface de la membrane associée à la fusion des granules augmente chez les neutrophiles primaires [Nusse and Lindau, 1988]. L'augmentation de la surface a été mesurée par patch-clamp, et correspond à une augmentation de  $540 \mu\text{m}^2$ , valeur qui correspond à l'exocytose de toutes les granules primaires et secondaires contenues dans les neutrophiles primaires.

Le phagosome, compartiment transitoire formé pendant l'internalisation d'un objet phagocyté, acquiert ses propriétés antimicrobienne par la fusion des vésicules sécrétoires et des granules [Lee et al., 2003]. Les cellules PLB utilisées dans cette thèse ne sont pas des neutrophiles primaires extraits du sang. La capacité d'exocytose des cellules PLB en réponse au fMLF (N-formyl-Met-Leu-Phe, un tripeptide, un chemoattractant pour les neutrophiles) et a été comparé à celle des neutrophiles primaires. Les cellules PLB sont un bon modèle expérimental pour l'étude de l'exocytose des granules primaires, mais semblent posséder moins de granules secondaires comparativement aux neutrophiles primaires.

**La libération de *Neutrophil Extracellular Traps* (NET)** Cette fonction a été découverte en 2004 par l'équipe de A. Zychlinsky [Brinkmann et al., 2004]. Les NETs sont libérés pour contrôler une infection microbienne en provoquant une forme unique de mort cellulaire appelée *NETosis* en anglais ou NETose en français (figure 7b page précédente). Les NETs sont constitués de chromatine décondensée, d'histones et de protéines telles que l'élastase et la myéloperoxydase pour capturer et éliminer des pathogènes [Papayannopoulos et al., 2010]. Cette fonction n'est pas restreinte aux neutrophiles, elle est aussi retrouvée chez les éosinophiles [Yousefi et al., 2008], les mastocytes [von Köckritz-Blickwede et al., 2008] ainsi que chez les cellules végétales [Wen et al., 2009]. La mort d'un pathogène par libération de NETs dépend de la taille de ce pathogène : les pathogènes filamenteux comme le champignon *Candida albicans*, ne sont pas phagocytés, mais sont détruits par la libération de NETs par les neutrophiles [Branzk et al., 2014].

La formation d'un NET requiert d'abord la décondensation de l'ADN puis la fixation à certaines protéines cytosoliques comme la myéloperoxydase [Papayannopoulos et al., 2010].

La formation des NETs décrit trois phrases :

1. Expansion de la chromatine
2. Expansion maximale de la chromatine
3. Libération du NET

Au fur et à mesure de la formation du NET, la pression interne du neutrophile augmente. C'est cette augmentation de pression qui va induire la libération de la chromatine décondensée [Neubert et al., 2018].

## **2.3 Molécules impliquées dans l'établissement de la phagocytose**

### **L'opsonisation des cibles ingérées**

Pour qu'une cellule puisse reconnaître une particule à internaliser, cette particule peut être couverte de molécules particulières : des molécules du complément, des immunoglobulines G (IgG) ou des résidus glucidiques tels que mannose ou le fucose. Les IgG et les molécules du complément sont appelées opsonines. Dans cette thèse, nous discuterons seulement de la phagocytose impliquant les IgG. En effet, toutes nos expériences ont été réalisées avec des billes de polystyrène opsonisées avec des IgG. Ces IgG seront reconnues par les récepteurs reconnaissant la partie constante (appelée partie Fc) des IgG, les Fc $\gamma$  récepteurs (Fc $\gamma$ R).

### **Les récepteurs de la partie constante des IgG**

Les Fc $\gamma$  récepteurs (Fc $\gamma$ R) font partie de la famille des immunoglobulines. Il existe deux classes de Fc $\gamma$ R : les inhibiteurs et les activateurs. Dans notre cas, nous nous intéressons aux Fc $\gamma$ R activateurs de la phagocytose : Fc $\gamma$ RI, IIA et IIIA [Aderem and Underhill, 1999] (figure 8 page suivante).

Ces récepteurs activateurs possèdent tous un domaine extracellulaire qui reconnaît la partie Fc des IgG. Le Fc $\gamma$ RIIA possède un domaine transmembranaire ainsi qu'une queue cytoplasmique contenant des motifs ITAM. Pour les Fc $\gamma$ RI et IIIA, ce sont des protéines associées qui portent les motifs ITAM. Les récepteurs inhibiteurs comme le Fc $\gamma$ R IIB ne possèdent pas de motifs ITAM mais des ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif). Une fois que le ligand a été reconnu par la partie extracellulaire du récepteur activateur, ces récepteurs se dimérisent, entraînant la phosphorylation des motifs ITAM [Powell et al., 2006]. La kinase Syk a été co-précipitée avec les motifs ITAM phosphorylés du Fc $\gamma$ RIIIA [Darby et al., 1994] ainsi que du Fc $\gamma$ RIIA [Yanaga et al., 1996], montrant que cette kinase est recrutée après phosphorylation des ITAM. Une fois Syk recrutée, la Phospholipase C (PLC- $\gamma$ ) ainsi que la PI3-kinase sont activées, menant, à terme, à la polymérisation de l'actine. Quand l'actine est déstabilisée par la cytochalasine D, les Fc $\gamma$ R sont encore phosphorylés, montrant que ces

modifications post-traductionnelles de ces récepteurs se déroulent avant la polymérisation de l'actine [Greenberg et al., 1994, Jaumouillé and Grinstein, 2016].

L'efficacité de la phagocytose peut être augmentée en utilisant l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) : celui-ci augmente le nombre de Fc $\gamma$ RI exprimés à la surface membranaire et prolonge l'expression des Fc $\gamma$ R II et III dans les neutrophiles primaires humains, facilitant ainsi la détection et l'internalisation des cibles opsonisées avec des IgG [Klebanoff et al., 1992]. Dans nos travaux, nous avons utilisé l'IFN- $\gamma$  pour faciliter la phagocytose des cibles opsonisées avec des IgG.

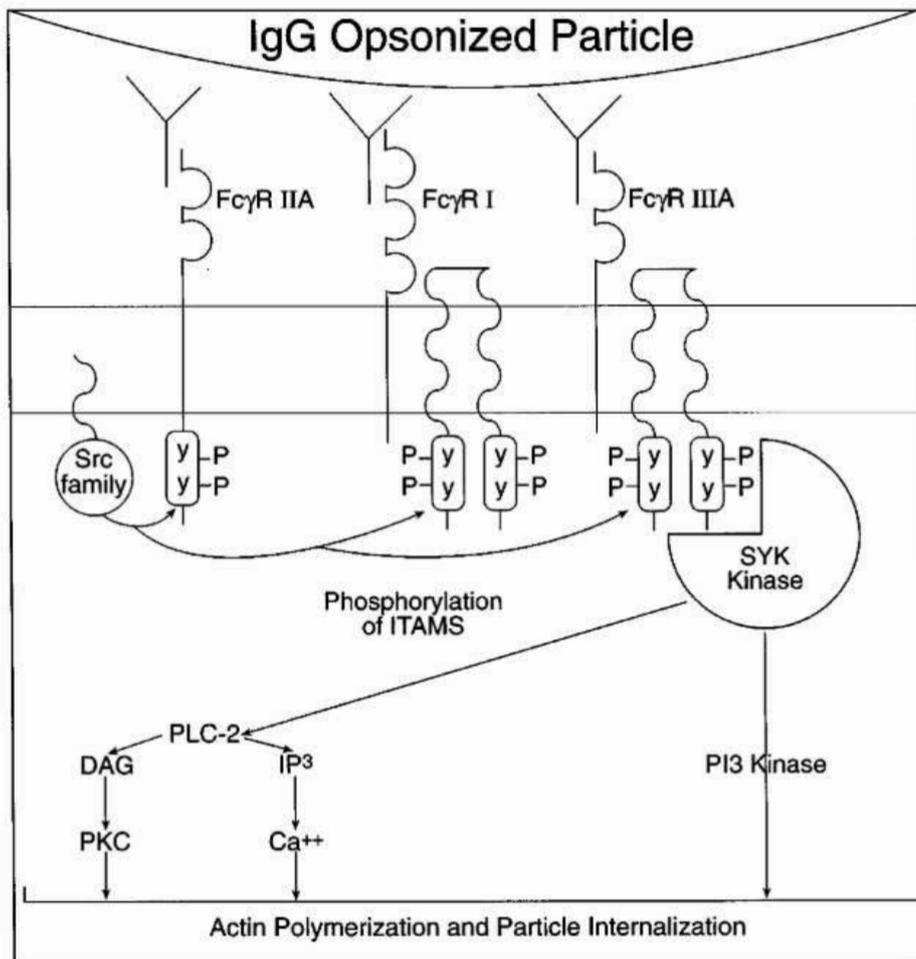


FIGURE 8 – Représentation graphique des Fc $\gamma$ R. Les motifs ITAM sont représentés par la lettre Y (pour tyrosine), le P signifie que la tyrosine est phosphorylée. La kinase Syk est recrutée une fois ces ITAM phosphorylés, amenant à l'activation de la phospholipase C (PLC- $\gamma$ ) ainsi qu'à la PI3Kinase. Ces voies de signalisation induisent la polymérisation de l'actine et permettent l'internalisation de la cible opsonisée avec des IgG. La représentation graphique provient de [Aderem and Underhill, 1999].

## 2.4 Chronologie des évènements morphologiques de la phagocytose

Quand une cellule phagocyte, de larges changements morphologiques s'opèrent. Nous détaillons ici les étapes morphologiques et les réarrangements moléculaires nécessaires à l'établissement de la coupe phagocytaire et à la fermeture du phagosome. La coupe phagocytaire est formée quand la cellule commence à ingérer la cible. Cette coupe a la forme d'une calotte sphérique qui s'élargit progressivement pendant que la cellule s'étend sur la cible. Le phagosome est un compartiment transitoire qui permet l'internalisation et la dégradation de la cible [Nüsse, 2011]. Les trois phases morphologiques décrites dans le cas des cibles opsonisées avec des IgG [Herant et al., 2006] seront (i) la formation d'un piédestal, (ii) l'étalement de la coupe phagocytaire sur la cible où un angle entre la coupe et le corps cellulaire est présent, (iii) la fermeture du phagosome où la perte de cet angle est observée (figure 9 de la présente page).

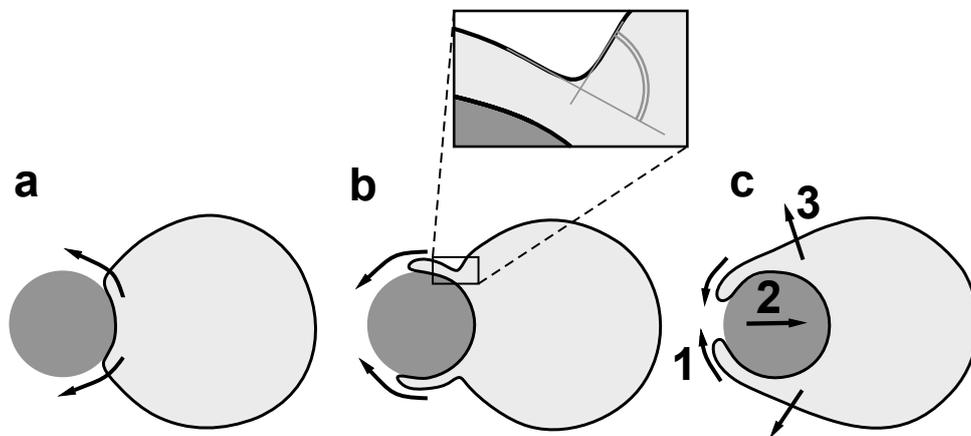


FIGURE 9 – Les étapes morphologiques de la phagocytose. a) Le piédestal, phase pendant laquelle la cellule se déforme après contact avec la cible, les flèches signifient l'étalement de la coupe phagocytaire qui va suivre. b) L'étalement de la coupe phagocytaire sur la bille présentant un angle entre la coupe et le corps cellulaire. c) La fermeture du phagosome (1) la cible est déplacée vers l'intérieur du corps cellulaire (2) et l'angle entre le corps cellulaire et la coupe phagocytaire disparaît (3). La représentation graphique provient de [Herant et al., 2006].

### Le piédestal

La cellule se déforme légèrement quand celle-ci détecte la cible à phagocyter. Lors de la reconnaissance de la cible opsonisée avec des IgG, les  $Fc\gamma R$  à la surface du phagocyte vont reconnaître les parties Fc des IgG et former des clusters à l'interface entre la cible et la cellule. Cette interface est appelée synapse phagocytaire [Goodridge et al., 2011, Niedergang, 2016a]. L'établissement de cette synapse dépend notamment de l'exclusion de la phosphatase CD45 [Niedergang and Grinstein, 2018]. L'interface entre la cellule et la cible est retreinte en largeur :

la phosphatase CD45 a une partie extracellulaire trop longue pour être maintenue au centre de la synapse phagocytaire [Burroughs and Van Der Merwe, 2007, Ostrowski et al., 2016]. Pour que la synapse se forme, un autre critère de taille existe : la longueur de la partie Fc des IgG doit être inférieure à 10.5 nm pour permettre l'exclusion du CD45 [Bakalar et al., 2018]. Les clusters formés par les Fc $\gamma$ R et l'exclusion du CD45 favorisent la progression de la coupe phagocytaire autour de la cible.

### **La progression de la coupelle autour de la bille**

Pendant la progression de la coupe phagocytaire, l'actine polymérise aux extrémités de la coupe tout en se dépolymérisant à l'arrière de ces extrémités [Bretschneider et al., 2009] (figure 10a page suivante).

Une fois que la formation de la synapse phagocytaire a débuté, la mobilité des Fc $\gamma$ R est dictée par l'actine. Cette mobilité est affectée mais n'est pas directement reliée à phosphorylation des récepteurs par la kinase Syk [Kiefer et al., 1998, Jaumouillé et al., 2014]. Quand Syk est inhibée, la coupe phagocytaire peut débuter mais ne peut plus progresser, montrant que l'activation Syk via les Fc $\gamma$ Rs est nécessaire à la progression de la coupe (figure 10b et c page ci-contre).

Pendant cette phase de progression, l'aire cellulaire augmente [Lam et al., 2009] en consommant notamment les microvillosités se trouvant à la surface cellulaire [Hallett and Dewitt, 2007, Herant et al., 2005]. Si la cible est assez large pour nécessiter davantage de surface apparente pour être internalisée, la cellule recrute de la membrane par exocytose [Suzaki et al., 1997, Hackam et al., 1998, Gauthier et al., 2011, Masters et al., 2013a].

**Les forces générées pendant la formation de la coupelle** Pendant la progression de la coupelle, les neutrophiles déplacent la cible : suggérant une force de poussée exercée par la cellule sur la cible) (figure 11a) [Lee et al., 2011a]. Les particules de zymosan (levures inactivées par la chaleur) ici opsonisées avec des IgG, sont davantage déplacées par les neutrophiles que les billes de polystyrène de 3 $\mu$ m de diamètre aussi opsonisées avec des IgG (figure 11).

C-Y. Lee et ses collègues ont utilisé des inhibiteurs pharmacologiques pour étudier le rôle du cytosquelette d'acto-myosine dans l'établissement de ces déplacements. La latrunculine A et la cytochalasine D inhibent la polymérisation de l'actine : la latrunculine A inhibe la formation des filaments d'actine (F-actine) et la cytochalasine D déstabilise la F-actine. ML-7 est un inhibiteur de la kinase des chaînes légères de la myosine. La latrunculine A et la cytochalasine D diminuent la capacité des neutrophiles à déplacer la bille, montrant que la génération de ces déplacements dépend de la polymérisation de l'actine. Le déplacement du zymosan est significativement réduit quand la kinase des chaînes légères de la myosine est inhibée, cette diminution n'est pas significative dans le cas des billes opsonisées avec des IgG (figure 11c).

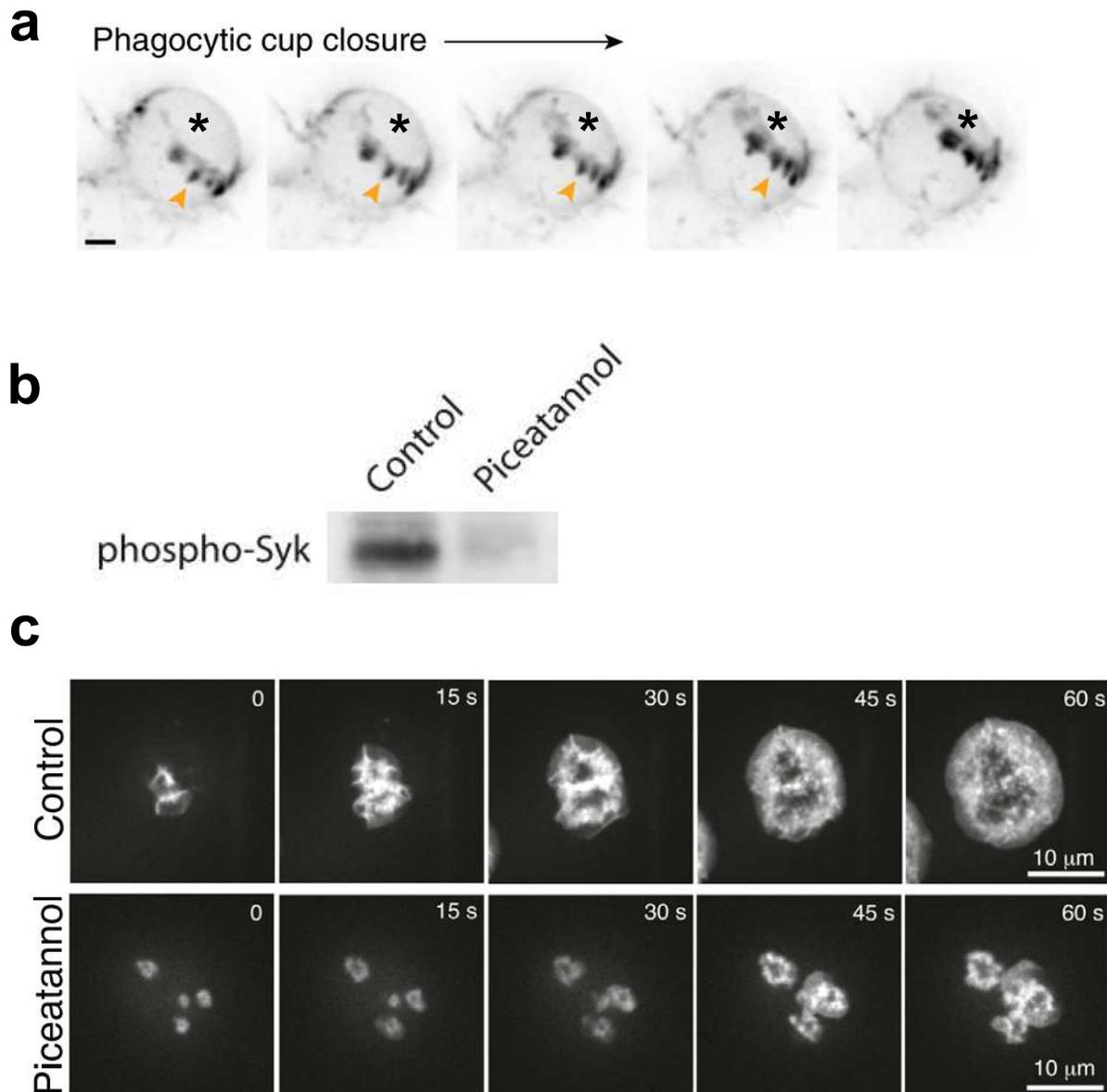


FIGURE 10 – L’actine est impliquée dans la progression de la coupe phagocytaire. a) Microscopie à feuillet de lumière montrant l’actine polymérisée (flèches oranges) à l’extrémité de la coupe phagocytaire sur des macrophages RAW exprimant un plasmide Lifeact permettant de visualiser des filaments d’actine (F-actine). La bille phagocytée (montrée avec l’astérisque) est de 7  $\mu$ m de diamètre et est opsonisée avec des IgG. b) Western-blot montrant que la phosphorylation de Syk endogène est inhibée par le piceatannol. c) Série d’images de microscopie confocale de l’actine marquée GFP chez des macrophages RAW dans la condition contrôle et avec l’inhibiteur piceatannol. Les images proviennent pour a) de Barger et al. [Barger et al., 2019] et b) de Jaumouille et al. [Jaumouillé et al., 2014].

La littérature montre que l'inhibition de la myosine II altère la capacité des macrophages à phagocyter des globules rouges opsonisés avec des IgG, sans pour autant totalement annihiler cette capacité [Tsai and Discher, 2008] : la myosine II joue un rôle non essentiel dans l'établissement de la coupe phagocytaire quand les cibles sont opsonisées avec des IgG [Olazabal et al., 2002]. Ce comportement est aussi observé chez *Dictyostelium* où les amibes n'exprimant pas la myosine II peuvent encore phagocyter [Clarke et al., 2010].

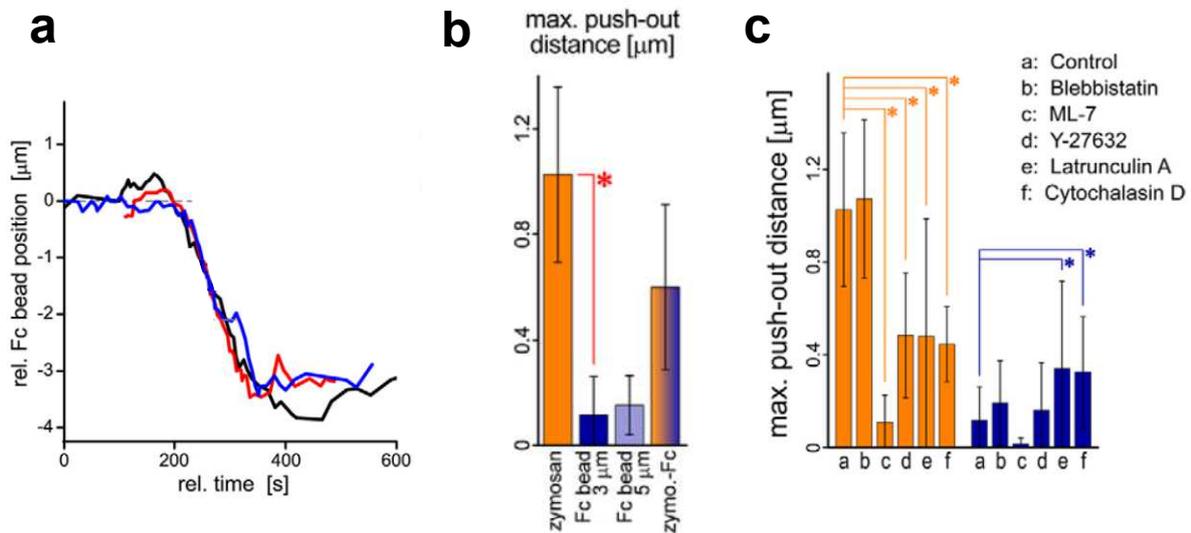


FIGURE 11 – Les neutrophiles exercent des forces de poussée pendant la phagocytose. a) Positions de billes opsonisées avec des IgG en fonction du temps où  $t_0$  est le contact entre le neutrophile et la bille. b) Distance maximale à laquelle la cible est poussée. « Fc » signifie que la cible est opsonisée avec des IgG. c) Distance maximale à laquelle un neutrophile pousse une particule de zymosan (orange) ou une bille de polystyrène (bleu) opsonisées avec des IgG en présence de différents inhibiteurs du cytosquelette. La blebbistatine inhibe la myosine II, ML-7 inhibe la kinase de la chaîne légère de la myosine, Y-27632 inhibe la kinase ROCK (Rho Kinase), la latrunculine A inhibe la formation des filaments d'actine (F-actine) et la cytochalasine D déstabilise la F-actine. Les données proviennent de [Lee et al., 2011a].

## **La fermeture du phagosome**

Quand le phagocyte arrête de s'étaler, celui-ci génère des forces de contraction pendant la fermeture du phagosome [Evans and Zhelev, 1993, Herant et al., 2003, Herant et al., 2005] (figure 12a page suivante). Ce processus est dépendant du cytosquelette d'acto-myosine. L'actine polymérisée (F-actine) et la dynamine, une enzyme responsable de la scission de vésicules d'endocytose, sont nécessaires à la fermeture du phagosome [Marie-Anaïs et al., 2016] (figure 13b page 29). Les myosines sont impliquées dans les étapes de contraction et de formation des phagosomes [Barger et al., 2019, Diakonova et al., 2002, Dieckmann et al., 2010].

## **2.5 La phagocytose peut être frustrée**

Quand la cible à internaliser est trop large par rapport aux capacités d'extension de la cellule (consommation des microvillosités et capacités d'exocytose), le phagosome ne peut pas se fermer. La phagocytose est alors incomplète, et est dite frustrée. Dans cette thèse, nous parlerons de la phagocytose complète lorsque le phagosome est fermé par opposition à la phagocytose frustrée. La phagocytose frustrée ne se limite pas aux objets en trois dimensions, mais peut être étudiée en opsonisant une surface plane.

Les phagocytes professionnels n'ont pas tous les mêmes capacités d'internalisation : les macrophages de la lignée J774 peuvent phagocyter deux ou trois billes de polystyrène de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre opsonisées avec des IgG [Lam et al., 2009] (figure 13a et b page 29) alors que les neutrophiles humains ne peuvent phagocyter complètement une sphérule de champignon d'environ 20  $\mu\text{m}$  de diamètre (figure 13c page 29). Cette différence entre une phagocytose complète (avec fermeture du phagosome) ou frustrée est en partie expliquée par leur taille initiale et la capacité d'extension de la surface apparente qui est environ trois fois plus élevée chez les macrophages J774 que chez les neutrophiles primaires humains [Lam et al., 2009].

### **Forces générées pendant la phagocytose frustrée**

Les forces de traction exercées par des macrophages THP-1 lors phagocytose frustrée sur surfaces planes opsonisées avec des IgG ont été étudiées par Traction Force Microscopy (TFM) [Kovari et al., 2016a]. Cette technique permet de quantifier les forces (ici de contraction) exercées par unité de surface (contraintes). Après 5-10 minutes d'étalement, la cellule ne peut plus s'étendre davantage (figure 14a page 30) et exerce une contrainte maximale sur le substrat (figure 14b page 30). Pendant cette contraction, 80 % des cellules qui ont atteint leur aire maximale rétractent leur membrane (figure 14a panneau de droite). Les 20 % des cellules qui ne se contractent pas se repolarisent et adoptent un phénotype migratoire.

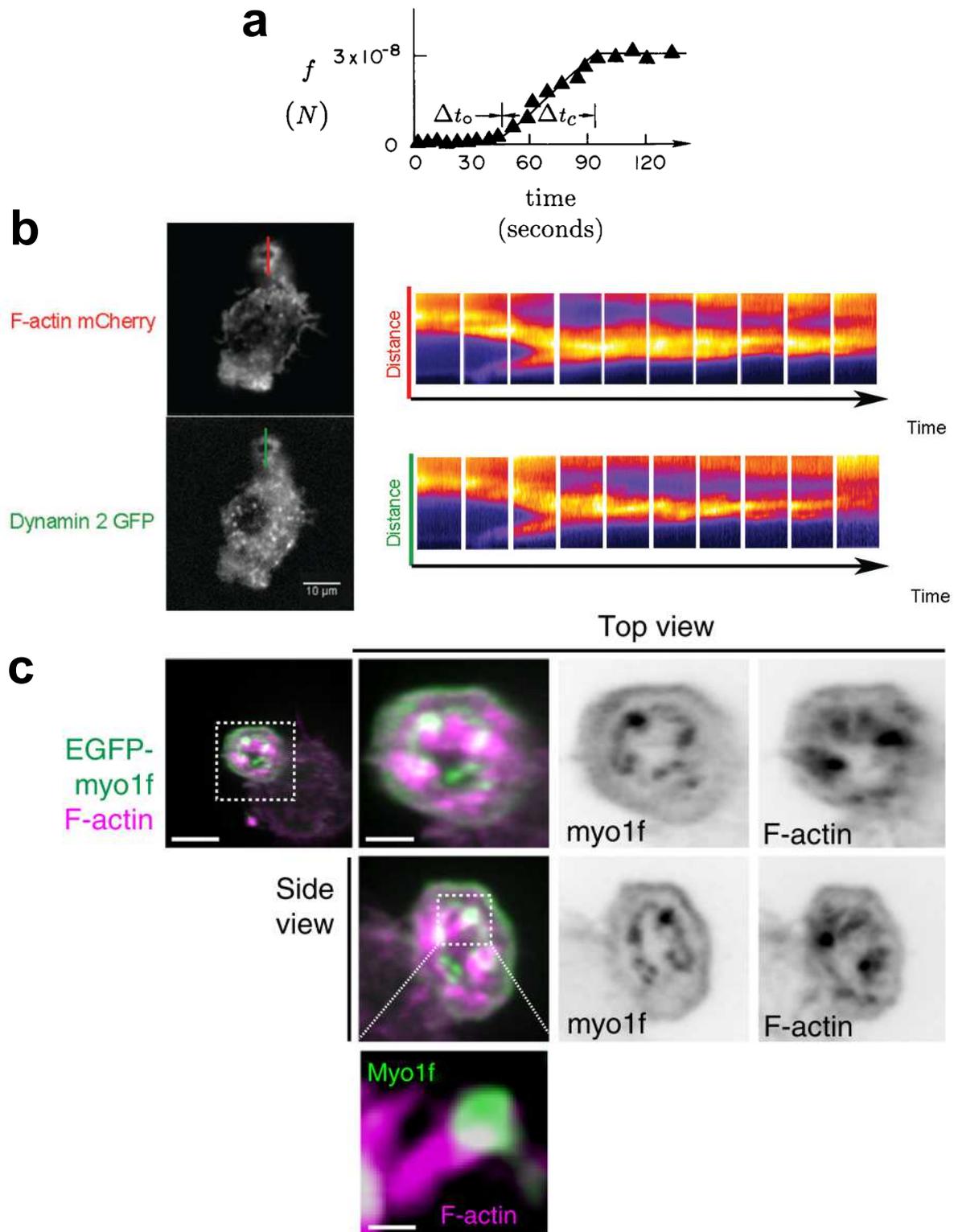


FIGURE 12 – Force de contraction pendant la fermeture du phagosome et implication du cytosquelette d'acto-myosine. a) Forces exercées par un neutrophile primaire humain pendant la phagocytose d'une particule de zymosan où  $\Delta t_0$  est le contact entre la levure et la cellule et où  $\Delta t_c$  est l'intervalle de temps où la force de contraction débute pour atteindre son maximum quand la cellule ferme son phagosome. Le graphique provient de [Evans and Zhelev, 1993]. b) La dynamine-2 et la F-actine sont impliquées dans la fermeture du phagosome des macrophages RAW. Les images de microscopie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) (panneau de gauche) et les kymographes (panneau de droite) proviennent de [Marie-Anaïs et al., 2016]. c) La fermeture du phagosome implique la myosine 1F ainsi que la F-actine chez les macrophages RAW. Les images de microscopie confocale proviennent de [Barger et al., 2019].

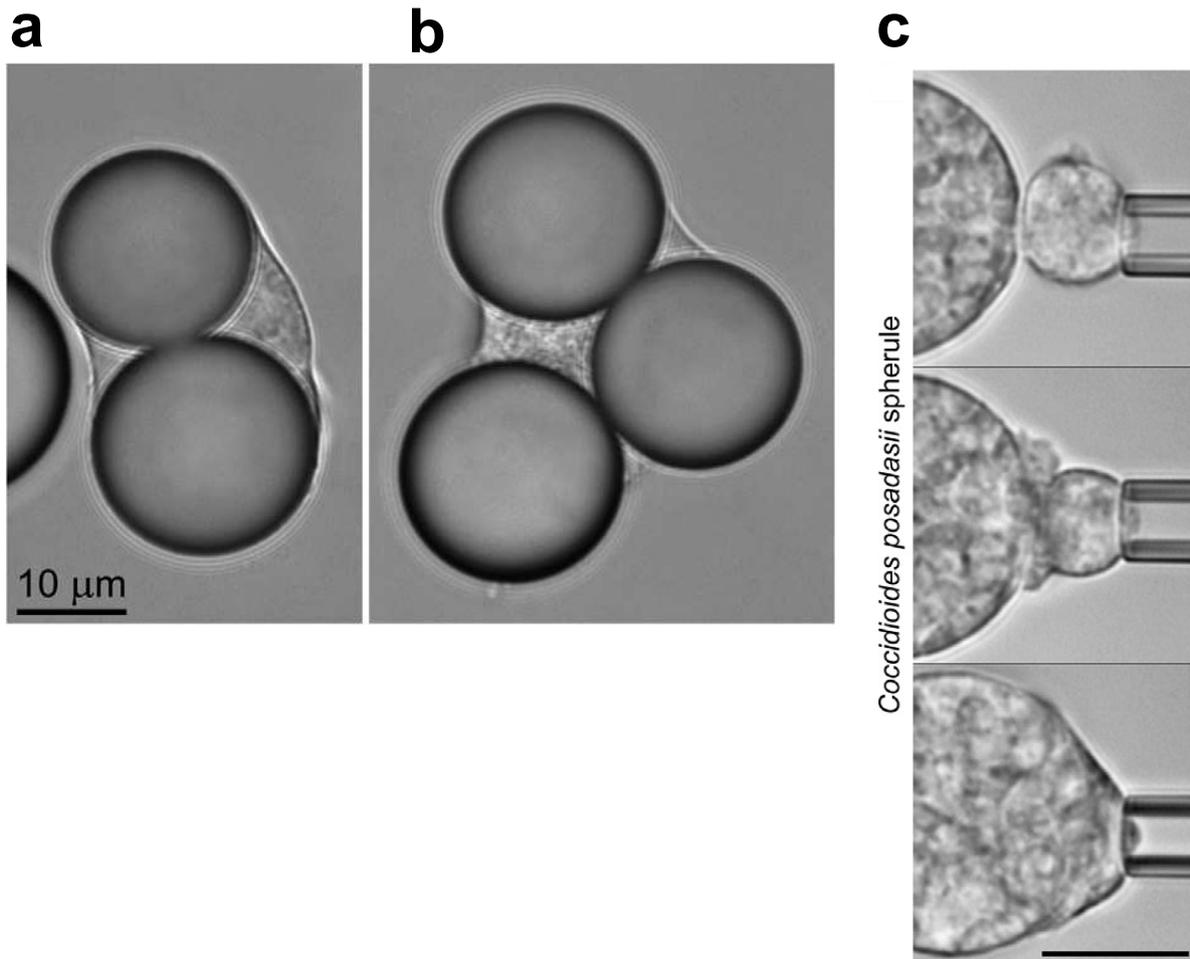


FIGURE 13 – Les phagocytes ont différentes capacités d’internalisation. a) Macrophages J774 ayant phagocyté deux billes de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre et b) trois billes de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre opsonisées avec des IgG. L’image est tirée de [Lam et al., 2009]. c) Phagocytose frustrée d’une sphérule de *Coccidioides posadasii* par un neutrophile maintenu par une micropipette (à droite). Les barres d’échelle sont de 10  $\mu\text{m}$ . L’image provient de [Heinrich, 2015]

### 3 La mécanique dans les fonctions immunes adaptatives

#### 3.1 Les lymphocytes T

Quand un lymphocyte T CD4+ engage son TCR avec un peptide présent dans la poche antigénique du CMH (p-CMH), présent à la surface d’une cellule présentatrice d’antigènes (CPA), la synapse immunologique se forme [Dustin, 2014]. Pendant la formation de cette synapse, l’actine se réarrange [Kumari et al., 2014]. Les forces transmises par le TCR au pCMH ont été étudiées avec des capteurs de tension basés sur des nanoparticules d’or couplées à des brins d’ADN [Liu et al., 2016], ainsi qu’avec une technique basée sur l’utilisation de micropipettes

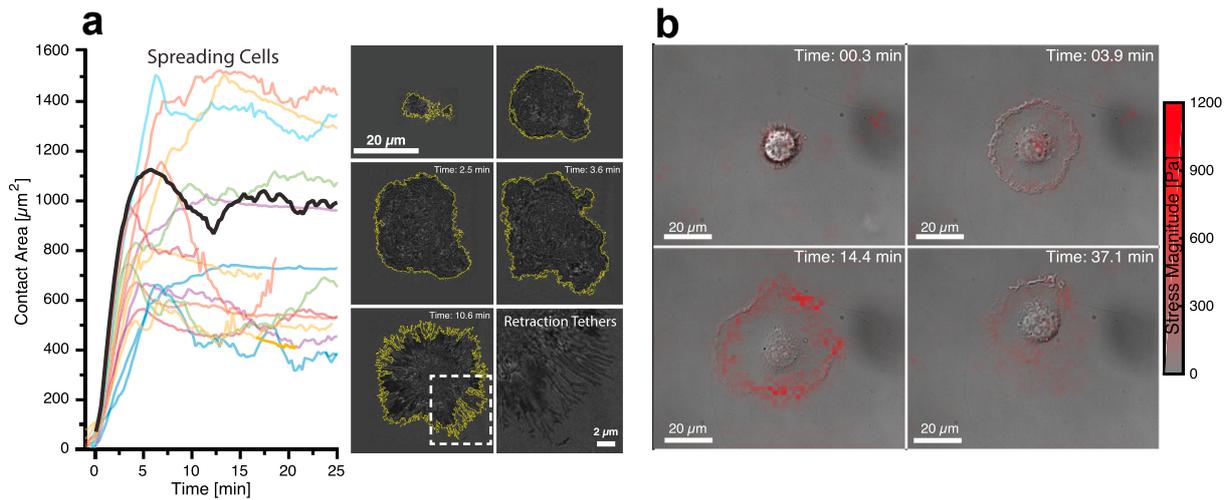


FIGURE 14 – Étalement et contraintes exercées sur le substrat lors de la phagocytose frustrée. a) Dynamique d'étalement de macrophages J774 (panneau de gauche, courbes représentant le comportement de 13 cellules individuelles) et morphologie lors de l'étalement réalisé par imagerie RICM (Reflection Interference Contrast Microscopy) (panneau de droite, correspondant à la ligne noire à gauche). b) Morphologie cellulaire et carte de couleur indiquant l'amplitude des forces de traction exercées sur le substrat lors de la Traction Force Microscopy. Les images proviennent de [Kovari et al., 2016b].

où une sonde de force couverte de p-CMH est attachée à un globule rouge et présentée à un lymphocyte [Liu et al., 2014]. Les deux techniques donnent le même résultat : les TCR exercent des forces de l'ordre de 10 pN.

Le TCR se fixe au p-CMH avec différentes affinités selon le peptide détecté [Corse et al., 2011]. De façon intéressante, le TCR exerce les mêmes forces aux p-CMH présentant des peptides de fortes ou de faibles affinités : c'est la vélocité de l'actine (le flux rétrograde de l'actine) à la synapse immunologique qui permet de distinguer la nature des peptides détectés par le TCR via le CMH [Colin-York et al., 2019].

Les forces générées par les lymphocytes T CD4+ ont été étudiées par une technique de Micropipette Force Probe développée au LadHyX dans l'équipe de J. Husson [Sawicka et al., 2017] (figure 15a). Cette technique permet de combiner les observations morphologiques aux mesures de forces exercées par un lymphocyte quand une bille modèle d'une CPA lui est présentée : cette bille présente à sa surface les molécules CD3 et CD28 qui permettent l'activation du TCR [Bashoura et al., 2014]. Cette bille modèle est fixée à l'extrémité d'une micropipette flexible dont la raideur est connue. En poussant la bille, la cellule déplace l'extrémité de la micropipette d'une distance  $x_{bead}$  (figure 15a page suivante) permettant de remonter à la force exercée par le lymphocyte sur la bille. Pendant la stimulation,

le lymphocyte génère une protrusion riche en actine qui pousse la bille puis la tire (figure 15b de la présente page). La force de poussée commence quelques dizaines de secondes après le contact avec la bille (figure 15b insert du haut de la présente page). Le lymphocyte pousse aussi vite qu'il ne tire la bille (figure 15b insert du bas de la présente page).

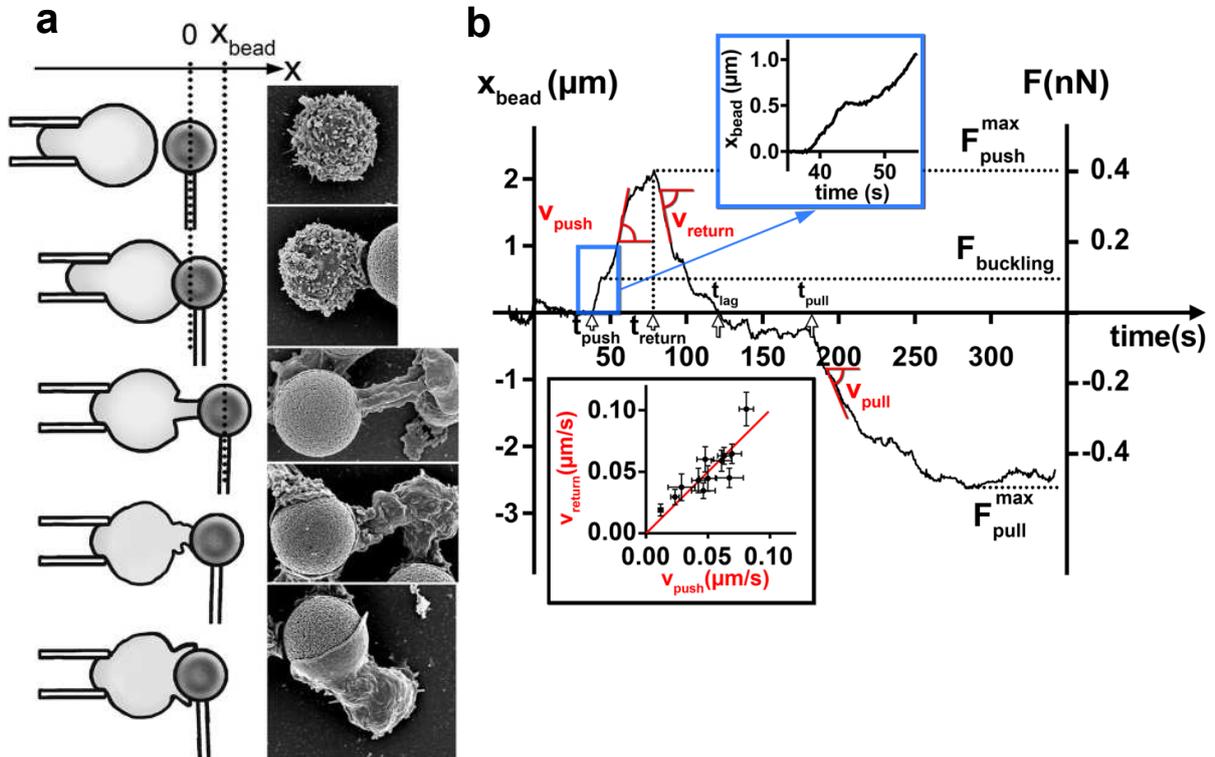


FIGURE 15 – Les lymphocytes T exercent des forces de poussées et de traction quand ils sont stimulés par une bille mimant une cellule présentatrice d'antigènes. a) Dessins de la technique Micropipette Force Probe illustrant le déplacement d'une bille de  $4.5 \mu\text{m}$  de diamètre ( $x_{bead}$ ) présentant à la surface les molécules CD3 et CD28 pendant la stimulation du lymphocyte T (panneau de gauche). Images de microscopie électronique à balayage d'un lymphocyte T stimulé par la bille. b) Position de la bille et forces exercées par le lymphocyte T en fonction du temps. La cellule pousse et puis tire la bille. La cellule commence à pousser quelques dizaines de secondes après le contact avec la bille (insert du haut). La cellule pousse aussi vite qu'elle ne tire (insert du bas, la ligne rouge est une régression linéaire). Les images proviennent de [Sawicka et al., 2017].

### 3.2 Les lymphocytes B

Tout comme les lymphocytes T, les lymphocytes B exercent des forces. Ces forces ont été étudiées par Traction Force Microscopy (TFM). Comme le BCR peut reconnaître des antigènes

natifs, ces cellules n'ont pas besoin de CPA modèle : des surfaces planes ont été couvertes avec des antigènes de lysozymes d'œuf de poule. Les lymphocytes B murins ont été incubés sur ces surfaces. Quand les lymphocytes B engagent leur BCR spécifiques à ces antigènes, ils forment une synapse immunologique. Pendant l'établissement de cette synapse, les lymphocytes B exercent des forces de contraction qui dépendent de l'activité du cortex d'acto-myosine et sont régulées dans l'espace : les forces générées par la polymérisation de l'actine sont au centre de la synapse phagocytaire, alors que celles exercées par la myosine sont situées à la périphérie [Kumari et al., 2019].

Nous avons vu que le cortex d'acto-myosine est impliqué dans la génération de forces chez les lymphocytes B, mais aussi dans l'établissement de la protrusion riche en actine générée par les lymphocytes T CD4+ lors de leur activation. Lors de la phagocytose, l'établissement de la coupe phagocytaire nécessite elle aussi la polymérisation de l'actine.

Si dans une cellule l'actine polymérise beaucoup, nous pouvons nous attendre à ce que son cortex d'actomyosin s'épaississe, et que, en spéculant, les propriétés mécaniques de la cellule s'en trouveront modifiées. Nous nous sommes demandés si, dans le cas des phagocytes, de tels changements mécaniques avaient lieu lors de la formation de la coupe phagocytaire. Pour démontrer l'existence de ces changements mécaniques, nous avons développé un outil mécanique (un rhéomètre) basé sur l'utilisation de micropipettes. Ce rhéomètre est décrit dans le chapitre suivant. Nous présentons d'abord quelques outils mécaniques permettant de quantifier les propriétés élastiques et visqueuses (propriétés viscoélastiques) des cellules. Notre rhéomètre permet de combiner les observations morphologiques aux mesures des propriétés viscoélastiques des cellules non adhérentes pendant qu'une cellule réalise une fonction biologique telle que la phagocytose.

## **4 Outils permettant de mesurer les propriétés mécaniques de cellules**

### **4.1 Cytométrie de déformation en temps réel (Real-Time Deformability Cytometry)**

L'équipe de J. Gück a développé une puce microfluidique qui permet de faire passer une cellule dans un canal avec un flux contrôlé [Otto et al., 2015, Toepfner et al., 2018] (figure 16a page suivante). Quand la cellule passe dans ce canal, elle est déformée par les forces de cisaillement qui lui sont appliquées par le fluide environnant. Cette technique permet de caractériser à haut débit (1000 cellules/secondes) l'élasticité des cellules et a récemment été étendue à la quantification à haut débit de la viscoélasticité des cellules [Fregin et al., 2019].

Cette technique a l'avantage de mesurer rapidement les propriétés d'une large population de cellules non adhérentes sans tri préalable et de distinguer chaque sous-population de leucocytes du sang humain (figure 16b et c de la présente page). Cependant, cette technique ne permet pas de quantifier la dynamique des propriétés mécaniques pendant que celles-ci réalisent leur fonction biologique, comme par exemple la phagocytose : la présentation d'un objet à la cellule est ici limitée.

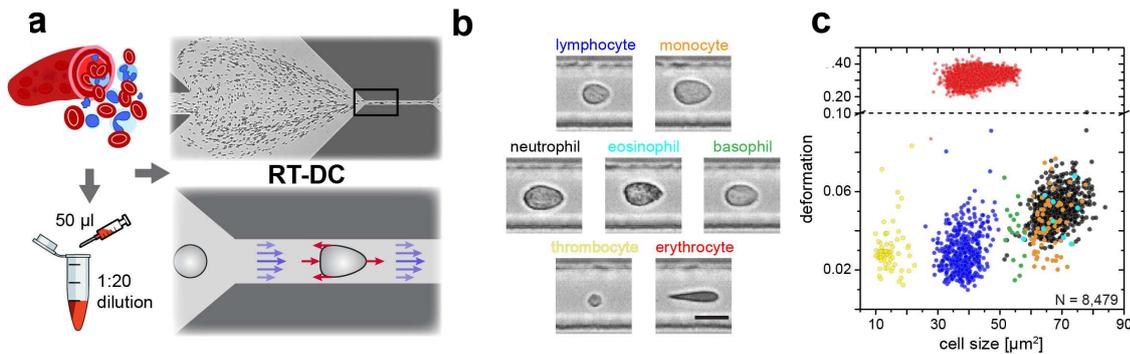


FIGURE 16 – Cytométrie de déformation en temps réel. a) A partir de sang dilué, plus de 100 000 cellules vont passer une par une dans le canal microfluidique où un flux contrôlé va appliquer des forces de cisaillements et déformer chaque cellule. RT-DC signifie « Real-Time Deformability Cytometry ». b) Sous-populations cellulaires. c) Déformation de chaque type de leucocytes en fonction de leur taille. Les images proviennent de [Toepfner et al., 2018].

## 4.2 La microscopie à force atomique

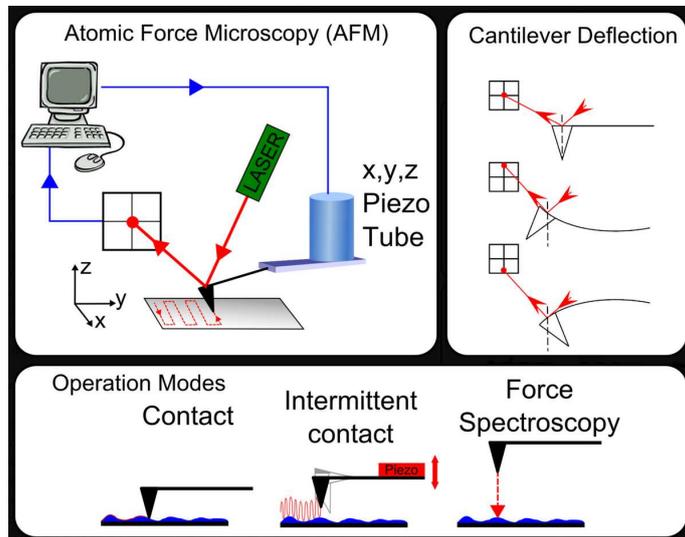
La microscopie à force atomique (AFM pour Atomic Force Microscopy) consiste en une platine piézo-électrique reliée à un levier (cantilever) d'une raideur connue, généralement couplée à un microscope optique. Ce cantilever peut exercer des forces contrôlées sur une cellule étalée sur un substrat plat (figure 17a page suivante) et scanner sa surface pour en connaître sa topologie (figure 17b page suivante). La force est exercée en défléchissant le cantilever à l'aide de la platine piezo-électrique. La déflexion du cantilever est mesurée grâce à un faisceau laser qui se réfléchit que le cantilever et atteint une photodiode ; cette mesure permet de quantifier la force exercée.

Avec cette technique, il est possible de fixer une bille recouverte de molécules d'intérêt au cantilever, et de mesurer la force nécessaire pour rompre un lien moléculaire unique (spectroscopie de force) [Casuso et al., 2011] ou pour connaître les forces d'interactions entre un récepteur et son ligand entre deux cellules [Puech et al., 2011]. L'AFM permet aussi de mesurer les propriétés mécaniques des cellules adhérentes : leur module de conservation (propor-

tionnel à l'élasticité) et le module de perte (proportionnel à la viscosité) [Rigato et al., 2017, Roca-cusachs et al., 2006].

Cette technique est donc puissante par l'amplitude des possibilités de mesures qu'elle présente : topologie, spectroscopie de force, et quantification des propriétés mécaniques.

**a**



**b**

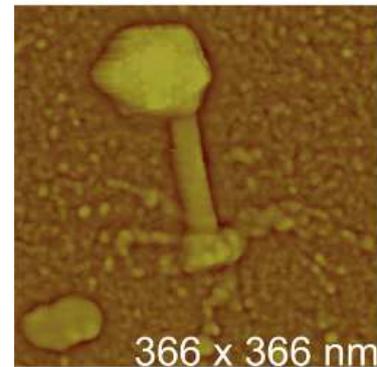


FIGURE 17 – Microscopie à force atomique. a) Principe de la technique. Le cantilever est défléchi par un laser (panneaux du haut). De gauche à droite dans le panneau du bas : les différents modes de la technique. Le cantilever scanne la surface pour obtenir sa topologie. Le mode intermittent permet de quantifier les propriétés proportionnelles à l'élasticité et à la viscosité de la cellule. La spectroscopie de force permet de quantifier les forces inter ou intramoléculaires. Les schémas proviennent de : <http://biomechanicalregulation-lab.org/afm>. b) Images de la topologie d'un bactériophage. L'image provient de [Kuznetsov and McPherson, 2011].

### 4.3 Les micropipettes

Les micropipettes ont été utilisées dans cette thèse, et représentent la base de notre rhéomètre. Les micropipettes permettent de travailler avec des cellules non-adhérentes et d'étudier des interactions cellules-cellules ou cellules-billes : nous pouvons varier les natures des objets présentés à la cellule.

Les micropipettes permettent de mesurer des tensions cellulaires de cellules non-adhérentes (ou rendues non-adhérentes) à l'état passif [Evans and Yeung, 1989, Tsai et al., 1994, Drury and Dembo, 1999] ou pendant un processus actif tel que la phagocytose [Evans and Zhelev, 1993, Herant et al., 2005, Herant et al., 2006, Lee et al., 2011a]. Cette technique permet aussi de mesurer les forces générées par des lympho-

cytes [Basu et al., 2016, Sawicka et al., 2017]. La viscosité apparente peut aussi être quantifiée en mesurant le temps d'entrée d'une cellule dans une micropipette [Evans and Yeung, 1989, Needham and Hochmuth, 1990, Lam et al., 2009]. Les micropipettes offrent donc des mesures mécaniques pendant un processus actif au niveau cellule unique.

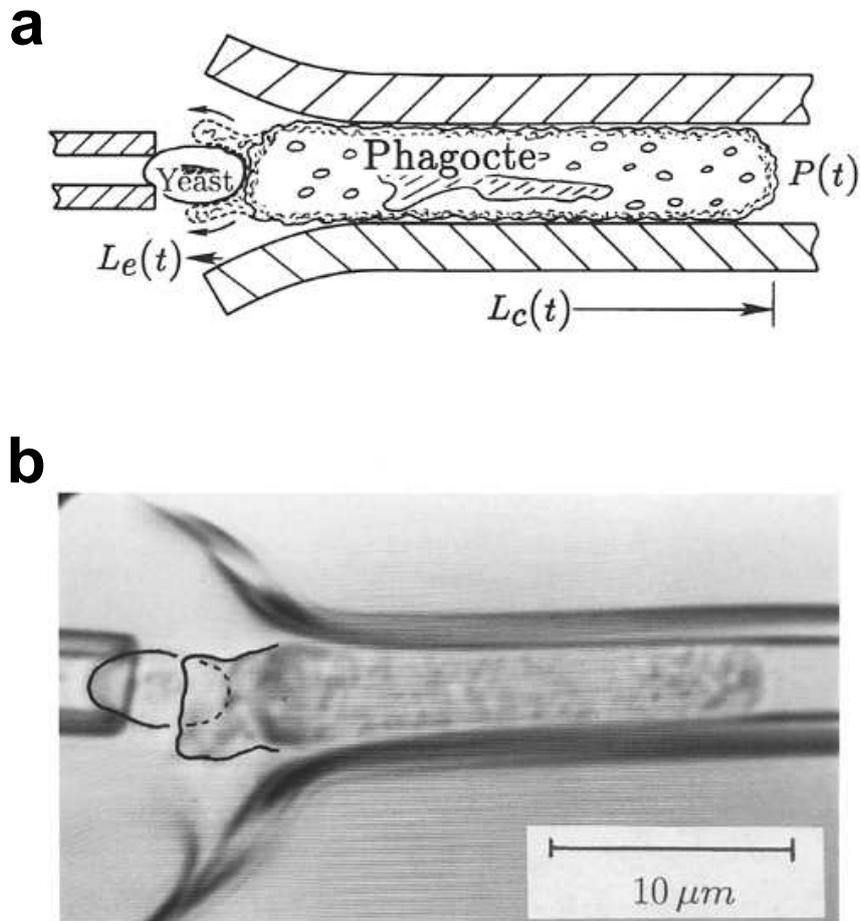


FIGURE 18 – Phagocytose d'une levure par un neutrophile. a) Schéma d'un phagocyte (neutrophile) maintenu dans une micropipette phagocytant une levure. b) Image de microscopie optique du schéma en a). Les images proviennent de [Evans and Zhelev, 1993].

## 5 Objectifs de la thèse

Cette thèse expérimentale est à l'interface entre deux domaines : la mécanique et l'immunologie. L'objectif premier de cette thèse était d'appréhender le comportement viscoélastique des neutrophiles pendant la phagocytose. Pour cela, j'ai utilisé un outil préexistant qui a subi plusieurs développements pendant ma thèse : le rhéomètre à cellule unique. Cet outil nous a permis de quantifier l'évolution de la rigidité et de la viscosité des neutrophiles pendant la phagocytose. Les résultats qui découlent de mes expériences ont été mis en perspectives avec d'autres fonctions immunitaires.

Les objectifs de la thèse étaient donc de :

- Continuer le développement du rhéomètre à cellule unique pour être capable de mesurer la rigidité et la viscosité pendant la phagocytose au niveau de la cellule unique.
- Quantifier l'évolution des propriétés viscoélastiques des neutrophiles pendant la phagocytose.
- Identifier un paramètre physique (telle que taille de la bille à phagocyter) pouvant être à l'origine de l'évolution des propriétés viscoélastiques d'un neutrophile pendant la phagocytose.

Dans le premier chapitre, nous décrivons de quoi est composé le rhéomètre à cellule unique et comment l'extraction des propriétés viscoélastiques est réalisée. Ensuite, dans le second chapitre, nous exposerons mes résultats sur l'évolution de ces propriétés pendant la phagocytose. Grâce aux collaborations de J. Husson, ces résultats sont mis en perspectives dans le troisième et dernier chapitre. Nous concluons ce manuscrit sur nos observations et sur notre compréhension de l'évolution de la rigidité et de la viscosité des cellules immunitaires pendant qu'elles réalisent leur fonction.

# Chapitre 1

## Rhéomètre à cellule unique : mesurer les propriétés viscoélastiques de cellules non adhérentes

### Sommaire

---

<b>1</b>	<b>Introduction</b> . . . . .	<b>38</b>
<b>2</b>	<b>Rhéomètre à cellule unique</b> . . . . .	<b>38</b>
2.1	Fabrication des micropipettes . . . . .	38
2.1.1	Micropipettes rigides . . . . .	40
2.1.2	Micropipettes flexibles . . . . .	43
2.2	Calibration d'un microindenteur . . . . .	44
<b>3</b>	<b>Quantifier les propriétés viscoélastiques de cellules non adhérentes</b> . . . . .	<b>46</b>
3.1	Modèle de Hertz . . . . .	46
3.1.1	Mesure de la force . . . . .	47
3.1.2	Extraction du module d'Young ( $E_{Young}$ ) . . . . .	48
3.2	Mesures des propriétés mécaniques proportionnelles à l'élasticité et à la viscosité cellulaires : $K'$ et $K''$ . . . . .	48
3.3	Mesures des propriétés viscoélastiques cellulaires intrinsèques : $E_{Young}^{Eq}$ et $\mu$ . . . . .	49
3.3.1	Calculs du module d'Young effectif ( $E_{Young}^{Eq}$ ) . . . . .	49
3.3.2	Calculs de la viscosité effective ( $\mu$ ) . . . . .	52
<b>4</b>	<b>Différentes configurations du rhéomètre</b> . . . . .	<b>52</b>
4.1	La configuration avant . . . . .	52
4.2	La configuration arrière . . . . .	52
4.3	La configuration cycle-arrière . . . . .	54

---

# 1 Introduction

Ce chapitre décrit la technique que nous avons développée et utilisée pour quantifier les propriétés viscoélastiques des neutrophiles pendant la phagocytose (voir chapitre 2) ainsi que pendant d'autres fonctions immunes avec d'autres types de leucocytes (voir chapitre 3).

## 2 Rhéomètre à cellule unique

Le rhéomètre à cellule unique est un outil basé sur l'utilisation de micropipettes. Une micropipette rigide permet de maintenir une cellule et de lui présenter un objet qui est ici une bille de polystyrène de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre couverte d'anticorps. Cette bille est maintenue par une micropipette flexible (figure 1.1 page suivante).

La micropipette rigide est reliée à un réservoir d'eau qui permet de contrôler la pression d'aspiration ( $\Delta p$ ) à l'intérieur de la micropipette. La pression d'aspiration est de nature hydrostatique et la différence de pression s'écrit :  $\Delta p = \rho g \Delta h$  où  $\rho$  est la masse volumique de l'eau,  $g$  l'accélération de la pesanteur et  $\Delta h$  la différence de hauteur de la colonne d'eau par rapport à la valeur d'équilibre (le « zéro de pression ») où la cellule n'est ni poussée ni aspirée par le fluide de la micropipette.

Pour mesurer cette pression d'aspiration avec laquelle la cellule sera aspirée, nous mettons d'abord le réservoir à une hauteur  $h$  où  $\Delta p$  est nulle (où une cellule n'est ni aspirée ni soufflée de l'extrémité de la pipette). Nous pouvons ensuite abaisser le niveau du réservoir d'eau pour appliquer une pression d'aspiration contrôlée. Une cellule est aspirée dans la micropipette rigide avec un  $\Delta p$  de 20 Pa, ce qui revient à diminuer de 2 mm ( $\Delta h=2\text{mm}$ , moyennant  $g \sim 10 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$ ) la hauteur du réservoir d'eau par rapport à la valeur d'équilibre (figure 1.1 page ci-contre).

La pression d'aspiration de la micropipette flexible est appliquée par un microinjecteur qui détend un volume d'air en amont du liquide qui remplit l'extrémité de la micropipette flexible par montée capillaire. Cette pression d'aspiration n'est pas finement contrôlée, et est très largement supérieure à 20 Pa (de l'ordre de plusieurs kPa [Basu et al., 2016]). Cette forte pression d'aspiration évite que la bille ne soit arrachée par la cellule quand celle-ci commence à s'étaler sur la bille.

Une fois ces ajustements de pression d'aspiration réalisés, nous aspirons une cellule avec la micropipette rigide et une bille avec la micropipette flexible.

### 2.1 Fabrication des micropipettes

Pour fabriquer une micropipette, nous partons d'un capillaire en verre borosilicate de 1.0 mm de diamètre extérieur et de 0.78 mm de diamètre intérieur (Harvard Apparatus). Nous pla-

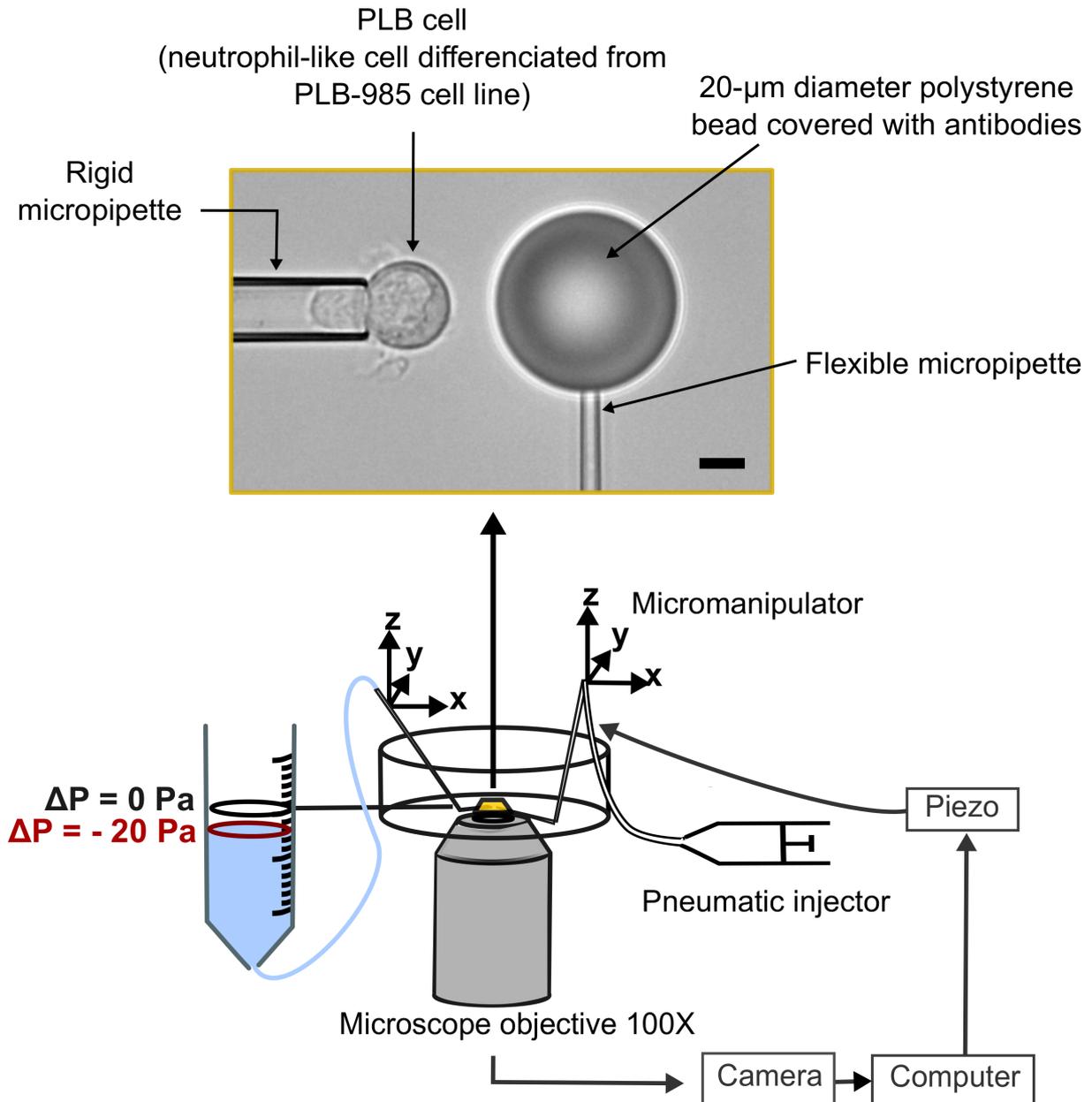


FIGURE 1.1 – Vue d’ensemble du rhéomètre à cellule unique. Une boîte de Petri est placée sur un objectif de grossissement 100 X (CFI Plan Apo Lambda 100X Oil) d’un microscope inversé (Eclipse Ti2, Nikon). La micropipette de gauche est reliée à un réservoir d’eau, qui aspire avec une pression d’aspiration ( $\Delta p$ ) de 20 Pa une cellule PLB différenciée en neutrophile. La micropipette de droite est flexible et une forte pression d’aspiration est appliquée dans cette micropipette pour maintenir une bille de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre en polystyrène couverte d’anticorps. Une platine de translation piezoélectrique permet d’imposer un déplacement à la micropipette flexible. La photo du haut représente la configuration obtenue quand une cellule et une bille sont aspirées dans les micropipettes. La barre d’échelle est de 5  $\mu\text{m}$ .

çons ce capillaire dans une étireuse (P-97, Sutter Instruments). Dans l'étireuse, le capillaire passe dans un filament qui va chauffer et faire entrer le verre borosilicate en fusion pendant un temps contrôlé pour ensuite tirer le capillaire à ses extrémités avec une vitesse également contrôlée. L'étireuse fonctionne avec un programme qui fixe différents paramètres (température de chauffe, vitesse de traction etc.) et permet d'obtenir des pipettes de profil désiré et reproductible.

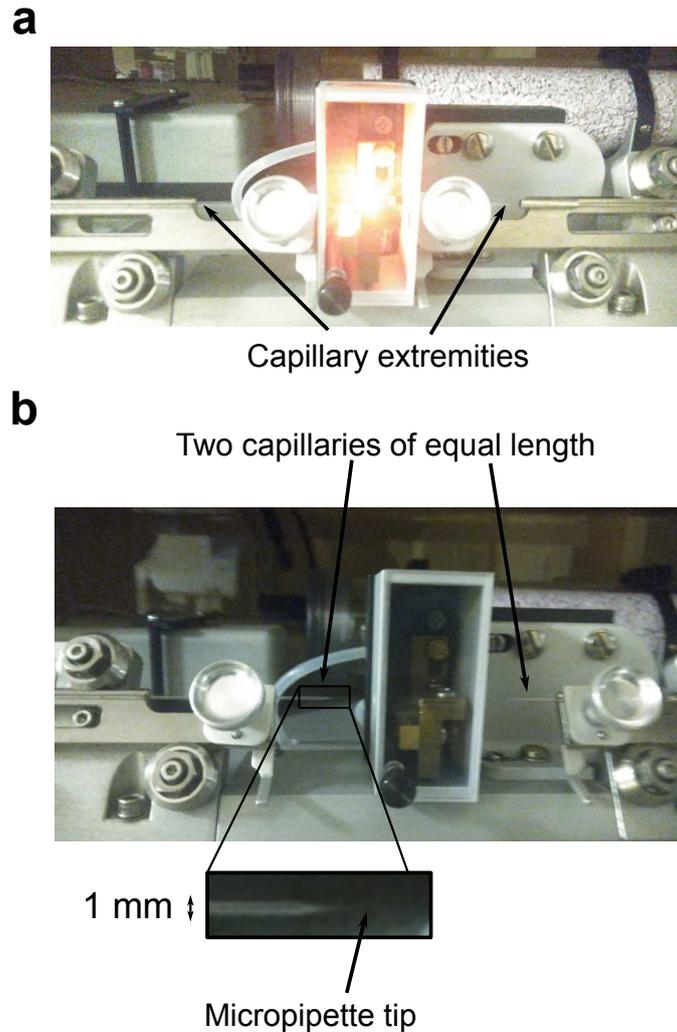


FIGURE 1.2 – Étireuse. a) Un capillaire de verre borosilicate de 1 mm de diamètre est placé à travers un filament chauffant (point de lumière orangé) dans une étireuse. b) Les deux capillaires sont formés.

### 2.1.1 Micropipettes rigides

À partir d'un capillaire étiré, nous utilisons une microforge (MF-200, World Precision Instruments) pour contrôler le diamètre de l'extrémité de la micropipette qui va servir à aspirer la

cellule. La microforge est équipée d'une bille de silice placée sur un filament (figure 1.3a page suivante). Quand un courant électrique passe dans ce filament, la bille de silice est chauffée. Pour contrôler le diamètre de l'extrémité de la micropipette, nous plaçons un capillaire étiré dans cette bille silice chauffée. Le verre borosilicate de la micropipette a une température de fusion supérieure à celle de la silice. Le verre de silice à l'état liquide rentre dans la micropipette. L'arrêt du chauffage du filament de la microforge fait solidifier très rapidement le verre de silice. Grâce à une translation micrométrique, la séparation mécanique de la micropipette et de la bille de silice fait casser l'extrémité de la micropipette à l'endroit où le verre de silice a formé un ménisque à l'intérieur de la micropipette. Nous mesurons le diamètre de la micropipette (3 à 5  $\mu\text{m}$ ) à l'aide d'une mire placée dans un oculaire de la microforge.

Nous utilisons une seconde micro-forge (MF-900, Narishige) pour donner au corps des micropipettes un angle de  $45^\circ$  (figure 1.1 page 39). Cette seconde microforge a un filament orienté selon l'axe de l'objectif utilisé pour observer la micropipette et le filament, si bien que nous observons le filament « en coupe » (figure 1.3b page suivante). En faisant passer du courant dans le filament, celui-ci chauffe et fait fondre la micropipette localement. Sous l'action de son propre poids celui-ci se plie et forme un angle que nous contrôlons en arrêtant le chauffage. Nous mesurons l'angle adopté grâce aux graduations dans un oculaire de la micro-forge. Nous forgeons des micropipettes avec un angle de  $40-45^\circ$  (figure 1.3b page suivante).

**Remplissage des micropipettes rigides.** Nos micropipettes rigides sont utilisées pour maintenir des cellules. Pour éviter que les cellules n'adhèrent au verre, nous remplissons l'extrémité des micropipettes par du milieu de culture cellulaire contenant du sérum. La micropipette est ensuite remplie d'eau pour pouvoir être connectée au réservoir d'eau du rhéomètre qui contrôle la pression d'aspiration exercée dans la micropipette (figure 1.4 page 43).

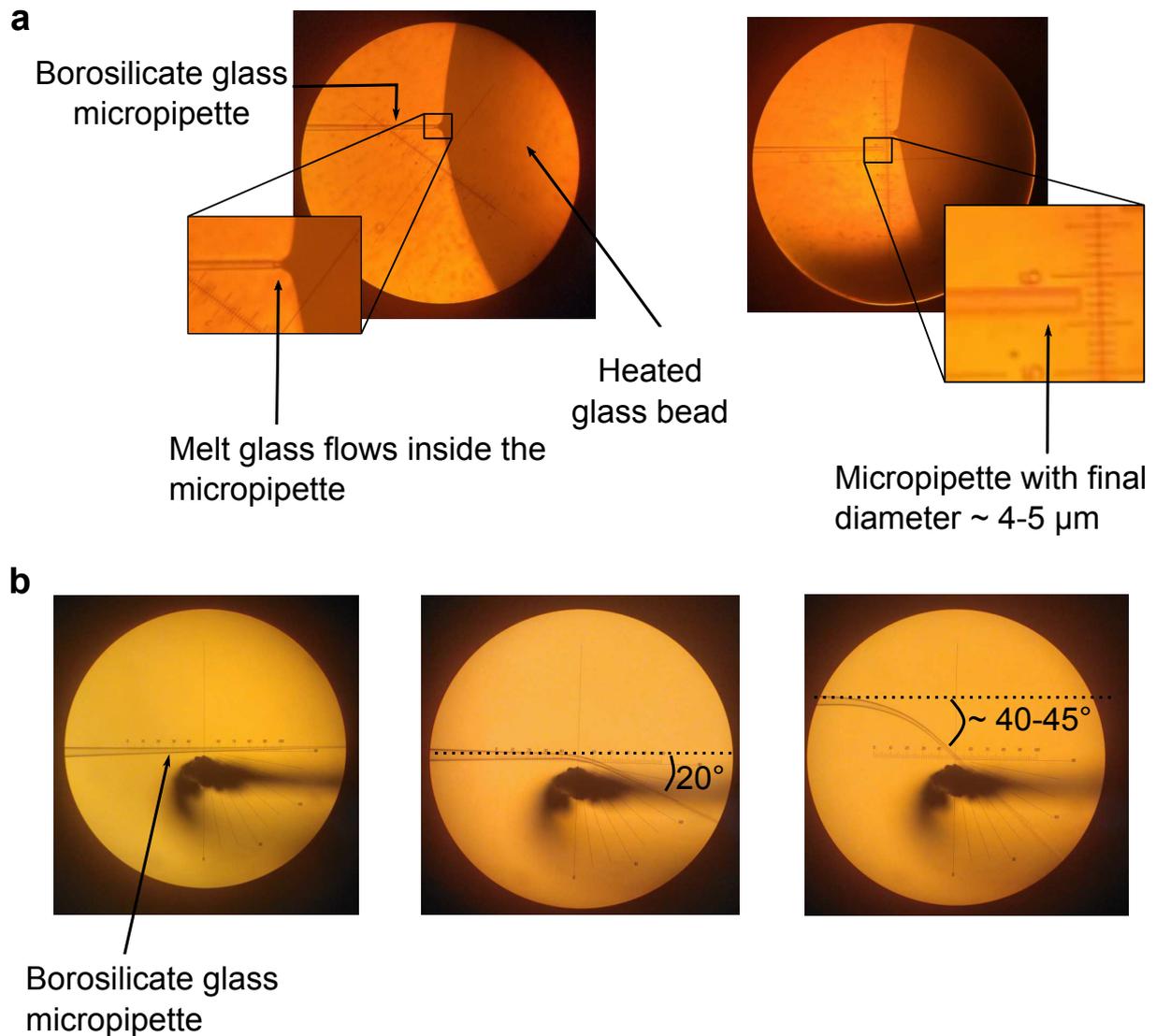


FIGURE 1.3 – Forgeage d’une micropipette rigide. a) Microforge MF-200 (World Precision Instruments [WPI]) pour contrôler le diamètre final de la micropipette. Panneau à gauche : la micropipette en verre borosilicate est placée dans une bille de verre de silice en fusion. La température de fusion de la silice est inférieure à celle du verre borosilicate et coule dans la micropipette. Panneau à droite : la micropipette a été détachée de la bille et son diamètre final est d’environ  $4\text{-}5 \mu\text{m}$ . b) Microforge MF-900 (Narishige) pour donner un angle à la micropipette. De gauche à droite : la micropipette est initialement droite. Le filament de la microforge chauffé fait fondre la micropipette qui adopte un angle. Nous utilisons un angle de  $40\text{-}45^\circ$ .

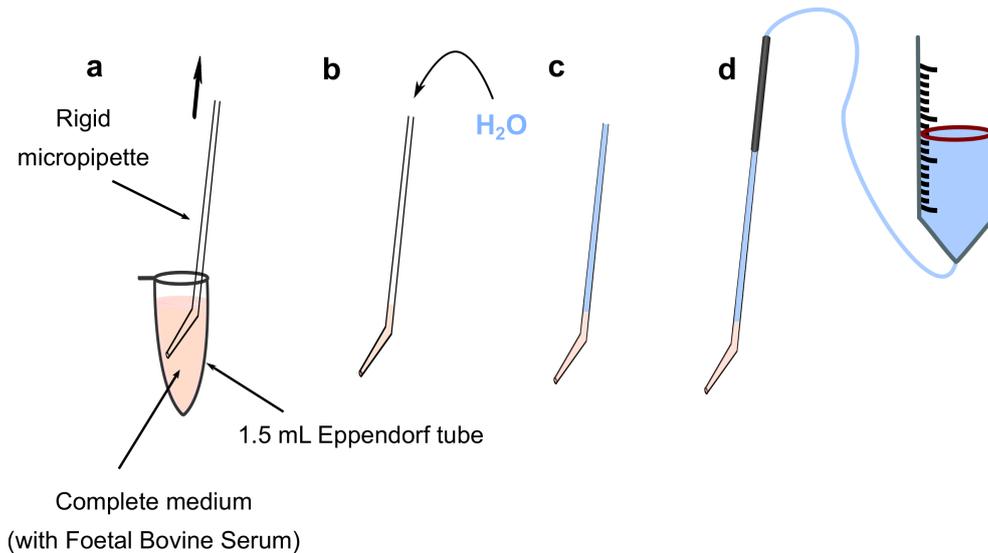


FIGURE 1.4 – Remplissage d’une micropipette rigide. a) La micropipette est placée dans du milieu complet contenant du Sérum de Veau Fœtal . La micropipette est remplie de milieu jusqu’à son angle. Cette solution sert à éviter que la cellule n’adhère au verre de la micropipette. b) Grâce à un microcapillaire, la micropipette est c) remplie d’eau puis d) connectée au réservoir d’eau du rhéomètre.

### 2.1.2 Micropipettes flexibles

**Deux types de micropipettes flexibles** Ces micropipettes peuvent être ouvertes à leur extrémité pour pouvoir aspirer une bille (figure 1.5a page suivante), ou terminées par une bille de verre et sont alors appelées microindenteurs [Guillou et al., 2016a, Sawicka et al., 2017]. Dans les deux cas, un objet sphérique se trouve à l’extrémité de ces micropipettes flexibles. La sphère se trouvant à l’extrémité de ces micropipettes sert à indenter la cellule.

**Fabrication d’un microindenteur** Pour fabriquer un microindenteur, nous utilisons la microforge qui nous sert à couper l’extrémité des micropipettes. La micropipette flexible est doucement insérée dans la bille de silice en fusion de la microforge puis en est retirée alors que la bille est encore en fusion. Du verre provenant de la bille en fusion est alors entraîné avec la micropipette flexible et se refroidit une fois sorti de la bille en fusion. En réchauffant la bille de silice, nous refaisons fondre le verre se trouvant à l’extrémité de la micropipette flexible. Sous l’effet de la tension de surface du verre, une goutte (quasi-)sphérique se forme à l’extrémité de la micropipette (figure 1.6 page suivante).

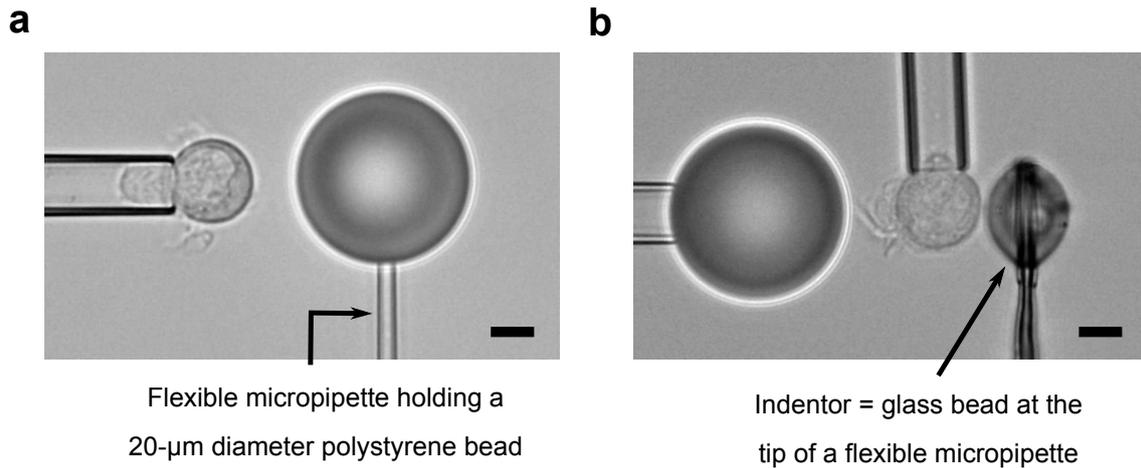


FIGURE 1.5 – Deux types de micropipettes flexibles. a) Une micropipette flexible avec une extrémité ouverte permettant d’aspirer une bille, ici une bille de polystyrène de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre couverte d’anticorps. b) Un microindenteur : une micropipette flexible avec à son extrémité une bille de verre. La barre d’échelle est de 5  $\mu\text{m}$ .

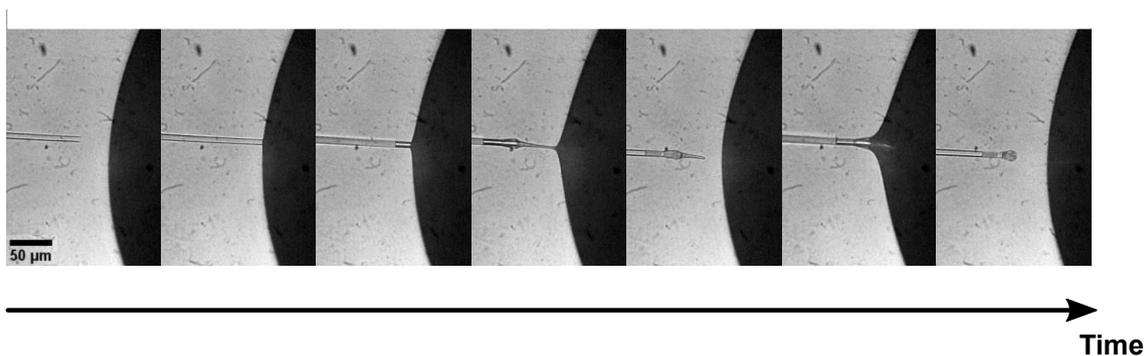


FIGURE 1.6 – Fabrication du microindenteur. La grande bille sombre à droite est une bille de silice en fusion, ce qui permet d’y faire pénétrer l’extrémité d’une micropipette en verre borosilicate (à gauche). La micropipette flexible est ensuite retirée sans arrêter le chauffage de la bille de silice, ce qui entraîne du verre liquide sur l’extrémité de la micropipette. Cet excédent de verre est ensuite refondu jusqu’à former une goutte sphérique qui se solidifie une fois le chauffage de la microforge arrêté.

## 2.2 Calibration d’un microindenteur

Nous calibrons chaque microindenteur (c’est-à-dire que nous mesurons sa raideur en flexion  $k$ ) pour pouvoir mesurer la force que le celui-ci va exercer sur la cellule. Pour cela, Julien Husson et ses collègues ont développé un dispositif contrôlant le mouvement de la platine piezoélectrique [Guillou et al., 2016a, Basu et al., 2016, Sawicka et al., 2017]. Ce dispositif nous permet de calibrer avec précision la raideur d’une pipette flexible.

Nous utilisons une sonde de force commerciale qui a une raideur en flexion connue (Aurora Scientific, modèle 406A) qui nous permet de calibrer des microindenteurs de référence d'une raideur élevée. Avec un microindenteur de référence nous calibrons un microindenteur de deuxième génération d'une raideur moins élevée (d'environ 1 nN/ $\mu\text{m}$ ). La raideur de ces microindenteurs de seconde génération est beaucoup plus faible que celle du microindenteur de référence et est notée  $k_{std}$ . Notre microindenteur à calibrer a une raideur  $k_{ind}$ .

Les deux extrémités des microindenteurs sont placées l'une contre l'autre et se trouvent à la position 0 (figure 1.7a page suivante). Le microindenteur à calibrer est translaté d'une distance  $x$  sur l'axe de translation de la platine piezoélectrique (perpendiculairement au corps des deux microindenteurs). En conséquence, le microindenteur à calibrer est défléchi d'une distance  $z$ . La position de ce microindenteur est gardée fixe. Si ce mouvement de translation s'effectue à vitesse suffisamment faible, nous pouvons négliger tout effet inertiel et utiliser le principe d'action-réaction : la force appliquée par un microindenteur sur l'autre est équilibrée par une force de réaction opposée exercée par l'autre microindenteur sur le premier (figure 1.7a page suivante) où :

$$\vec{F}_1 = -\vec{F}_2 \quad (1.1)$$

En projetant l'égalité des forces sur l'axe de translation on obtient :

$$k_{ind}(x - z) = k_{std}z \quad (1.2)$$

D'où

$$k_{ind}x = (k_{std} + k_{ind})z \quad (1.3)$$

Soit :

$$z = \left( \frac{k_{ind}}{k_{ind} + k_{std}} \right) x \quad (1.4)$$

Si nous traçons  $z$  en fonction de  $x$ , nous obtenons une droite de pente  $p = \frac{k_{ind}}{k_{ind} + k_{std}}$  (figure 1.7b page suivante). Nous connaissons  $k_{std}$  et déduisons  $k_{ind}$ . Nous avons utilisé des microindenteurs de raideur  $k_{ind} \sim 0.1 - 0.2 \text{ nN}/\mu\text{m}$ .

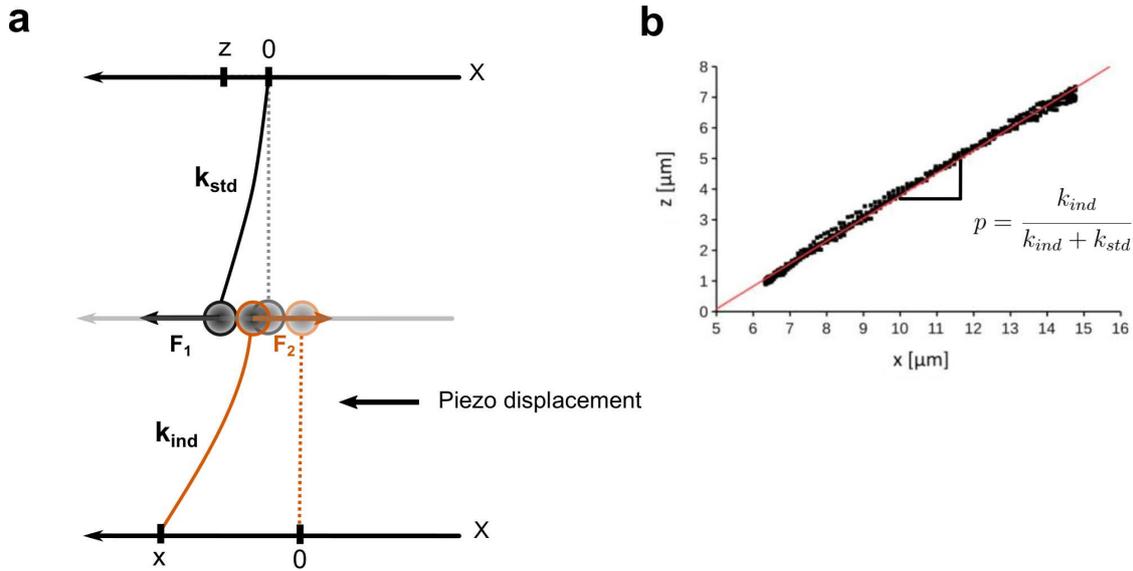


FIGURE 1.7 – Calibration d’un microindenteur. a) Schéma du dispositif. Le microindenteur standard (pipette noire de raideur connue) reste fixe à la position 0 et son extrémité est défléchie de  $z$ . Le microindenteur de raideur (orange) est accolé à la micropipette standard et est translaté d’une distance  $x$  sur l’axe horizontal  $x$  (qui est le même pour les deux microindenteurs). Les positions initiales des deux micropipettes sont représentées en pointillé. La position finale des microindenteurs est représentée en traits pleins. La raideur du microindenteur standard est  $k_{std}$  et celle du microindenteur à calibrer est  $k_{ind}$ . Le schéma est adapté de [Sawicka et al., 2017]. b)  $z$  en fonction  $x$ . La régression linéaire (en rouge) permet de remonter à la raideur du microindenteur à calibrer. Le graphique provient de [Sawicka et al., 2017].

### 3 Quantifier les propriétés viscoélastiques de cellules non adhérentes

#### 3.1 Modèle de Hertz

Nous avons utilisé le modèle de Hertz pour mesurer le module d’Young ( $E_{Young}$ ) de la cellule. Le module d’Young quantifie l’élasticité de la cellule. Le modèle de Hertz décrit dans un cas particulier l’indentation d’une sphère élastique par une sphère infiniment rigide. La sphère indentée est ici la cellule de rayon  $R_{cell}$ . La sphère infiniment rigide est la bille maintenue à l’extrémité de la micropipette flexible ou, dans le cas d’un microindenteur, la bille de verre qui se trouve à son extrémité. Le rayon de la bille qui indente la cellule est  $R_{ind}$ . Le coefficient poisson  $\nu$  est supposé égal à 0.5.

Pour extraire  $E_{Young}$ , une force  $F$  normale à la cellule est exercée par la bille du microindenteur. La cellule est alors indentée d’une profondeur  $\delta$  (figure 1.8 page suivante)

[Guillou et al., 2016a].

Le modèle de Hertz est défini comme [Rosenbluth et al., 2006a, Wu et al., 2018] :

$$F = \frac{4 E_{Young}}{3 (1 - \nu^2)} \sqrt{R_{eff}} \delta^{3/2} \quad (1.5)$$

où le rayon effectif  $R_{eff}$  est égal à :

$$R_{eff} = \frac{1}{\frac{1}{R_{cell}} + \frac{1}{R_{ind}}} \quad (1.6)$$

### 3.1.1 Mesure de la force

Connaissant la raideur du microindenteur ( $k_{ind}$ ), la force  $F$  est quantifiée en mesurant la déflexion ( $x$ ) du microindenteur :

$$F = k_{ind} x \quad (1.7)$$

Quand aucune force n'est exercée sur la cellule, la base du microindenteur se trouve à la position  $x_0$ . A l'aide d'un piezo, le microindenteur avance vers la cellule jusqu'à arriver à la position  $x$  (figure 1.8 de la présente page). La cellule est alors indentée de  $\delta$ .

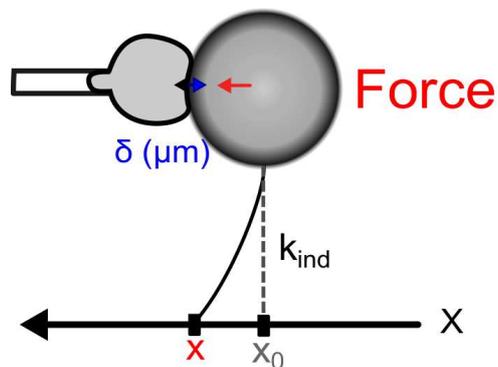


FIGURE 1.8 – Mesure de la force exercée sur la cellule par un microindenteur. Le microindenteur est la bille de  $20 \mu\text{m}$  de diamètre tenue par une micropipette flexible. La cellule est tenue par une micropipette rigide. La position initiale de la base du microindenteur est représentée en pointillé et correspond à la position  $x_0$  sur l'axe de  $x$  (qui est l'axe de la base du microindenteur). Le microindenteur exerce une force normale à la cellule quand la base du microindenteur est à la position  $x$ . Une fois la force exercée, la cellule est indentée de  $\delta$ .

### 3.1.2 Extraction du module d'Young ( $E_{Young}$ )

Pour mesurer  $E_{Young}$  la cellule est progressivement indentée jusqu'à ce que le microindenteur exerce une force de compression de 175 pN sur la cellule. Pendant l'indentation,  $\delta$  augmente progressivement. Pour quantifier  $E_{Young}$ , nous ajustons notre courbe expérimentale force-indentation avec le modèle de Hertz (figure 1.9a page 50).

## 3.2 Mesures des propriétés mécaniques proportionnelles à l'élasticité et à la viscosité cellulaires : $K'$ et $K''$

Après la mesure de  $E_{Young}$ , nous mesurons deux quantités pendant que la cellule phagocyte la bille.  $K'$  est la raideur cellulaire, correspondant à considérer la cellule comme un ressort.  $K''$  en revanche n'est pas une raideur au sens de ressort équivalent, mais reflète les propriétés visqueuses de la cellule. Nous verrons dans les sections suivantes que ces quantités sont respectivement proportionnelles à l'élasticité et à la viscosité de la cellule, les deux aspects des propriétés viscoélastiques cellulaires.

Pour mesurer  $K'$  et  $K''$ , nous imposons une force oscillante d'une amplitude  $\Delta F$  décrite avec une fréquence angulaire  $\omega = 2\pi f$  où la fréquence est  $f = 1$  Hz. Cette force est imposée grâce à une boucle de rétroaction qui ajuste la position de la base de la micropipette flexible en fonction de la position mesurée de son extrémité  $x_{tip}$ , grâce à une analyse d'image en direct.

La force  $F$  qui dépend du temps est égal à  $F(t) = \langle F \rangle + \Delta F \cos(\omega t)$  où  $\langle F \rangle$  est la valeur moyenne de la force (175 pN) et où  $\Delta F$  vaut environ 100 pN.

La force oscillante étant exercée contre la cellule, la cellule oscille en retour. Nous mesurons cette oscillation avec l'amplitude de l'oscillation de la bille à l'extrémité du microindenteur  $x_{tip}$  (figure 1.9b et c page 50). La valeur moyenne de  $x_{tip}$  ( $\langle x_{tip} \rangle$ ) varie car la cellule déplace la bille maintenue par la micropipette flexible quand elle la phagocyte.  $\Delta x_{tip}$  est l'amplitude de la déformation de l'indenteur.  $x_{tip}$  vaut en fonction du temps :  $x_{tip}(t) = \langle x_{tip} \rangle + \Delta x_{tip} \cos(\omega t + \varphi)$  où  $\varphi$  est le retard de phase entre la déformation de la cellule et la phase de la force.

Pour pouvoir calculer  $K'$  et  $K''$ , nous établissons d'abord ce que nous imposons et quelles valeurs expérimentales nous obtenons en sortie. Nous imposons  $F$  (donc  $\langle F \rangle$  et  $\Delta F$ ) ainsi que la phase de la force (i. e.  $\omega t$ ). Nous récupérons en sortie  $x_{tip}$  : donc  $\langle x_{tip} \rangle$ ,  $\Delta x_{tip}$  et le retard de phase  $\varphi$ .

Pour comprendre le rapport de ce l'on impose et ce que nous récupérons en sortie, nous passons à l'espace complexe qui nous permet de quantifier ces rapports :

$$F^*(t) = \langle F \rangle + \Delta F (\cos(\omega t) + i \sin(\omega t)) \quad (1.8)$$

$$x_{tip}^*(t) = \langle x_{tip} \rangle + \Delta x_{tip} (\cos(\omega t + \varphi) + i \sin(\omega t + \varphi)) \quad (1.9)$$

Or,  $e^{i\theta} = \cos\theta + i\sin\theta$ , nous avons alors :

$$F^*(t) = \langle F \rangle + \Delta F e^{i(\omega t)} \quad (1.10)$$

$$x_{tip}^*(t) = \langle x_{tip} \rangle + \Delta x_{tip} e^{i(\omega t + \varphi)} \quad (1.11)$$

Nous introduisons la rigidité complexe  $K^*$  comme étant :

$$K^* = \frac{F^* - \langle F \rangle}{x_{tip}^* - \langle x_{tip} \rangle} \quad (1.12)$$

$$K^* = \frac{\Delta F e^{i\omega t}}{\Delta x_{tip} e^{i\omega t + \varphi}} \quad (1.13)$$

$$K^* = \frac{\Delta F}{\Delta x_{tip}} e^{-i\varphi} \quad (1.14)$$

Avec  $K^* = K' + iK''$ , nous avons alors :

$$K' + iK'' = \frac{\Delta F}{\Delta x_{tip} \cos\varphi + i\sin(-\varphi)} \quad (1.15)$$

En décomposant les termes réels et imaginaires, nous obtenons respectivement :

$$K' = \frac{\Delta F}{\Delta x_{tip}} \cos\varphi \quad (1.16)$$

$$K'' = \frac{\Delta F}{\Delta x_{tip}} \sin(-\varphi) \quad (1.17)$$

Pour calculer, nous passons alors  $\varphi$  en valeur absolue :

$$K'' = \frac{\Delta F}{\Delta x_{tip}} \sin|\varphi| \quad (1.18)$$

### 3.3 Mesures des propriétés viscoélastiques cellulaires intrinsèques :

$E_{Young}^{Eq}$  et  $\mu$

#### 3.3.1 Calculs du module d'Young effectif ( $E_{Young}^{Eq}$ )

Le modèle de Hertz est utilisé pour quantifier  $E_{Young}$  pendant la première compression entre la bille et la cellule. Une fois cette phase terminée et que la force oscillante a commencé à être appliquée, nous mesurons la raideur complexe  $K^*$  décrite plus haut, dont les deux composantes sont  $K'$  et  $K''$ . De ces deux quantités, nous extrayons  $E'$  (le module de

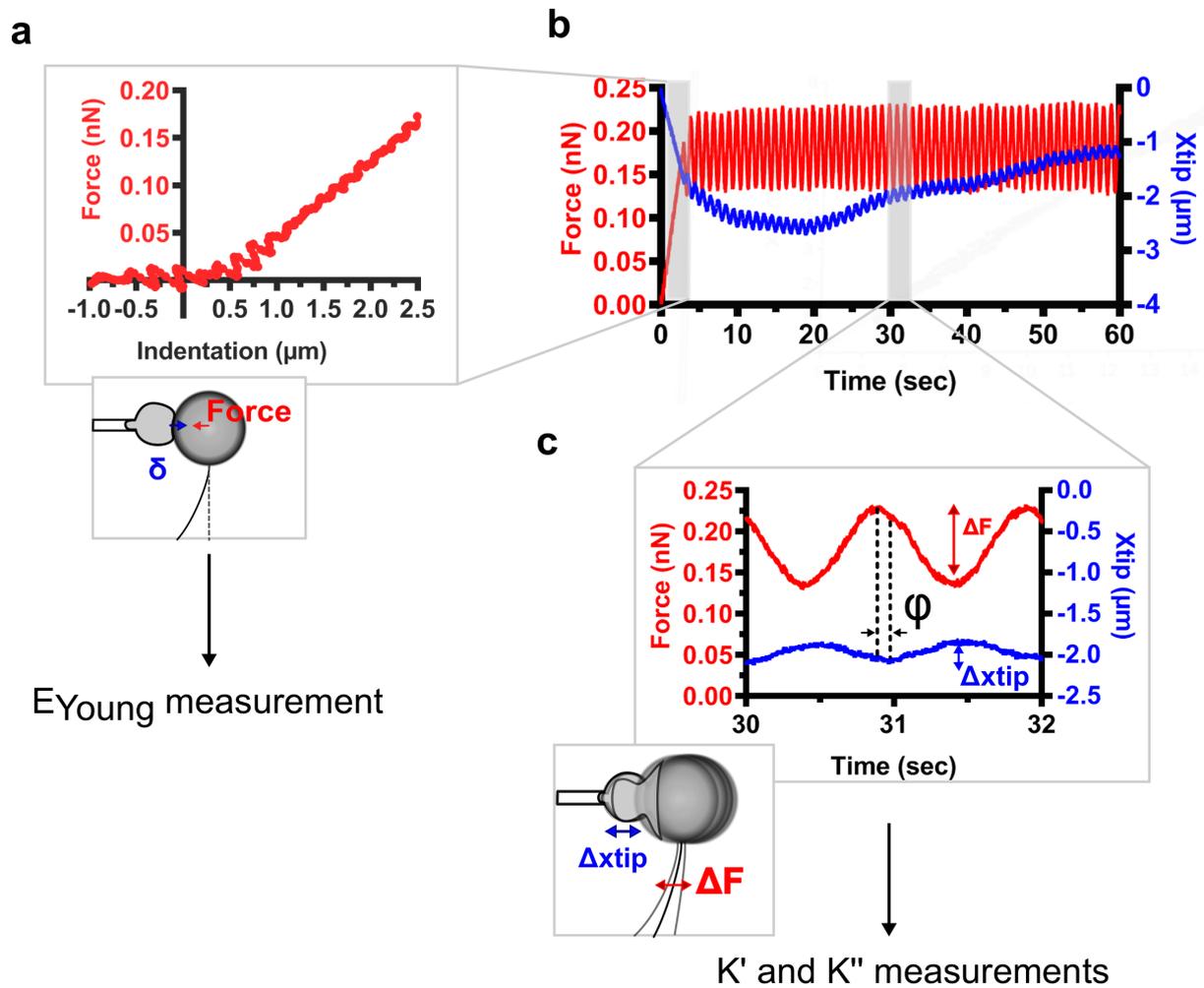


FIGURE 1.9 – Force et indentation. a) Force en fonction de l'indentation au début de l'expérimentation. Courbe utilisée pour extraire  $E_{\text{Young}}$  grâce au modèle de Hertz. b) La force exercée par la micropipette flexible sur la cellule et position de la base de la micropipette flexible ( $x_{\text{tip}}$  en fonction du temps). c) Zoom sur deux secondes de l'expérimentation où la phase  $\varphi$  est montrée avec l'amplitude de la force  $\Delta F$  et l'amplitude de la déformation  $\Delta x_{\text{tip}}$ .

conservation) et  $E''$  (le module de perte) en utilisant une linéarisation du modèle de Hertz [Carmichael et al., 2015, Smith et al., 2005, Cai et al., 2017]. Le modèle de Hertz suppose que nous puissions modéliser le milieu (ici la cellule) indenté par une sphère ou autre géométrie simple. Dans la configuration du rhéomètre décrite précédemment (figure 1.8 page 47) la cellule s'écarte beaucoup de cette condition : la partie indentée de la cellule ne reste pas sphérique tout au long de l'expérience. Pour pouvoir quantifier  $E'$  et  $E''$  avec une cellule qui reste sphérique quand indentée par la bille, nous utilisons une autre configuration du rhéomètre que nous décrivons dans la suite de ce chapitre (section 4.3).

La linéarisation du modèle de Hertz (équation 1.5) permet d'extraire  $E'$  et  $E''$  à partir de, respectivement,  $K'$  et  $K''$  ainsi :

$$E' \sim \frac{1 - \nu^2}{2} \frac{K'}{\sqrt{R_{eff} \langle x_{tip} \rangle}} \quad (1.19)$$

$$E'' \sim \frac{1 - \nu^2}{2} \frac{K''}{\sqrt{R_{eff} \langle x_{tip} \rangle}} \quad (1.20)$$

Remarquons une subtilité dans les formules ci-dessus : nous y supposons que nous puissions mesurer  $\langle x_{tip} \rangle$  au cours du temps. Cependant,  $x_{tip}$  est mesuré quand le microindenteur aborde le bord de la cellule, qui est estimé à l'instant initial de l'expérience grâce à l'ajustement de la courbe force-indentation dont nous extrayons le module d'Young [Guillou et al., 2016a]. Cependant, la cellule se déforme au cours de l'application de la force oscillante, si bien que la position initiale du bord de la cellule évolue au cours du temps, sans que nous puissions le mesurer indépendamment. Notre estimation de  $E'$  et  $E''$  a donc nécessité d'être validée. Pour cela nous avons utilisé une approche empirique, tout d'abord en comparant  $E'$  et  $E_{Young}$  mesuré à l'instant initial de chaque expérience. Cette comparaison a montré que les deux grandeurs sont proportionnelles. Nous introduisons donc une constante  $C$  telle que :

$$E' = CE_{Young} \quad (1.21)$$

Pour aller plus loin et comparer  $E'$  et  $E_{Young}$  au-delà de l'instant initial de chaque expérience, il nous a fallu développer une approche qui nous permettrait de suivre  $E_{Young}$  au cours du temps. Nous voulions mesurer  $E_{Young}$  de manière "propre" en commençant par une situation où le microindenteur ne serait pas en contact avec la cellule. Nous expliquons dans la section 4.3 page 54 cette nouvelle configuration appelée cycle-arrière. Cette approche nous a alors permis de comparer  $E'$  et  $E_{Young}$  pendant un biologique, celui de la phagocytose.  $E'$  et  $E_{Young}$  restent clairement corrélés tout au long du processus. La valeur du coefficient  $C$  est proche de 1 (figure 2.17 page 90).

La constante de proportionnalité  $C$  étant établie, nous l'avons utilisée pour définir un module d'Young équivalent  $E_{Young}^{Eq} = \frac{E'}{C}$ , et en utilisant l'expression (1.20) donnant  $E'$ , nous obtenons pour  $E_{Young}^{Eq}$  l'expression :

$$E_{Young}^{Eq} = \frac{1}{C} \frac{(1 - \nu^2)}{2} \frac{K'}{\sqrt{R_{eff} < x_{tip} >}} \quad (1.22)$$

### 3.3.2 Calculs de la viscosité effective ( $\mu$ )

La viscosité effective ( $\mu$ ) est calculée à partir du module visqueux ( $E''$ ). La fréquence angulaire ( $\omega$ ) est  $\omega = 2\pi f$  où la fréquence est  $f = 1$  Hz. Cela nous donne :

$$\mu = \frac{E''}{\omega} \quad (1.23)$$

## 4 Différentes configurations du rhéomètre

### 4.1 La configuration avant

La configuration avant (figure 1.1 page 39) consiste à maintenir la cellule dans une micropipette rigide et à l'indenter avec une bille maintenue par une micropipette flexible. Une force de compression est exercée sur la cellule nous permettant d'extraire  $E_{Young}$ . Après cette première phase, la micropipette flexible entre dans la phase oscillante et  $K'$  ainsi que  $K''$  sont extraits pendant la durée de l'expérience qui dure environ 7 minutes.

Quand la cellule s'étale sur la bille qui est couverte d'anticorps, elle peut atteindre l'interface entre la micropipette flexible et la bille où une forte pression d'aspiration est exercée. Quand la cellule passe ses protrusions entre la bille et la micropipette, sa membrane est alors aspirée dans la pipette flexible. La membrane perd alors son intégrité et la cellule ne peut plus réaliser sa fonction biologique. Avec cette configuration, nous ne pouvons donc étudier que les premiers moments de la phagocytose. Cette limite est d'autant plus stricte que la bille phagocytée est petite. Donc, dans cette configuration avant, la bille est volontaire large.

### 4.2 La configuration arrière

Avec la configuration arrière, nous pouvons donc faire phagocyter des petites billes ainsi que des plus larges (figure 1.10a et b page suivante). En effet, la bille est maintenue par une micropipette rigide et nous contrôlons la pression d'aspiration qui va maintenir la bille grâce à la pression hydrostatique. La cellule se trouve au centre et le microindenteur exerce une force du côté diamétralement opposé à celui de la coupe phagocytaire.

Comme dans la configuration avant, une première force de compression va indenter la cellule et nous permettre d'extraire  $E_{Young}$  de la courbe force-indentation qui en découle (figure 1.10c de la présente page). Ensuite, le microindenteur commence à osciller faisant osciller à son tour la cellule et nous permet de mesurer  $K'$  et de  $K''$  sur la durée de l'expérimentation qui est aussi d'environ 7 minutes.

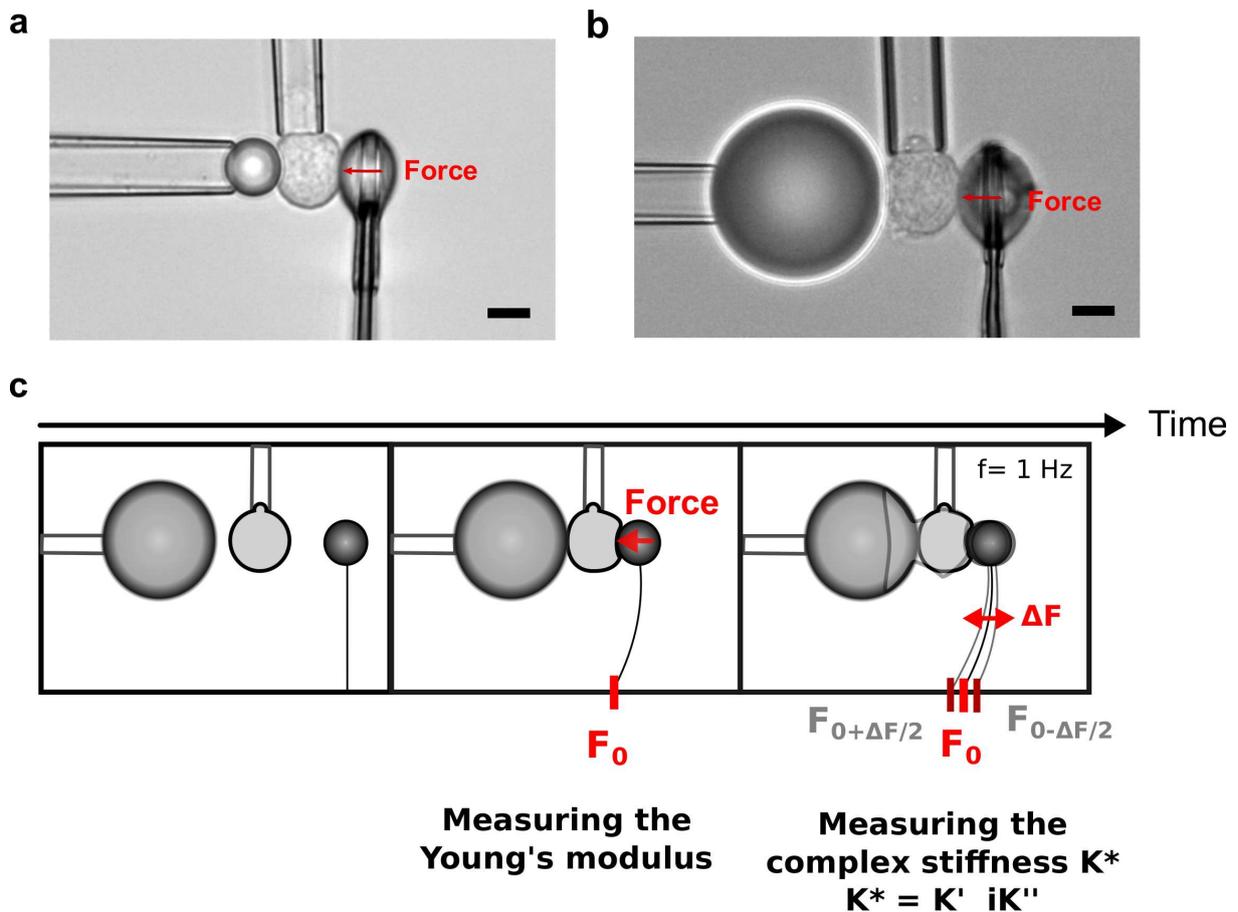


FIGURE 1.10 – Rhéomètre à cellule unique dans la configuration arrière. a) Morphologie d'un neutrophile avant de phagocyter une bille de  $8 \mu\text{m}$  de diamètre ou de b)  $20 \mu\text{m}$  de diamètre. La barre d'échelle est de  $5 \mu\text{m}$ . c) Rhéologie. La force est appliquée à l'arrière de la cellule (côté diamétralement opposé à la coupe phagocytaire). Lors de l'établissement du contact entre la bille et la cellule la force et la déformation cellulaire sont mesurées, ce qui permet d'en extraire le module d'Young  $E_{Young}$  de la cellule à l'instant initial via le modèle de Hertz. Ensuite la force devient oscillante pour une durée d'environ 7 minutes, ce qui permet de mesurer  $K'$  et  $K''$  comme dans la configuration avant.

### 4.3 La configuration cycle-arrière

La configuration que nous appelons "cycle-arrière" a été la première à être développée au laboratoire [Guillou et al., 2016a]. Cette configuration est nommée ainsi car l'expérience se décompose en cycles qui permettent de mesurer le  $E_{Young}$  toutes les 30 secondes. Comme dans la configuration arrière, la force est exercée du côté opposé à celui où la cellule phagocyte. Au début de chaque cycle, une force de compression est exercée sur la cellule comme dans toutes les configurations, pour calculer  $E_{Young}$ . Ensuite, le microindenteur oscille pendant quelques secondes pour extraire  $K'$  et  $K''$  comme dans les autres configurations. Après ces phases d'oscillations, le microindenteur revient à sa position initiale sans contact avec la cellule ; ceci marque la fin d'un cycle (figure 1.11 page suivante). Chaque cycle dure environ 30 secondes, nous en réalisons 15 sur chaque cellule, c'est-à-dire 15 mesures de  $E_{Young}$  pendant que la cellule phagocyte une bille. Notons que la boucle de rétroaction qui permet de contrôler la force appliquée n'était pas encore programmée : ce qui était imposé était l'oscillation de la base du microindenteur d'une amplitude de  $0.50 \mu\text{m}$ . Ainsi, dans cette configuration quand la cellule s'aplatit, le microindenteur n'applique plus le même niveau de force, et l'indentation évolue en conséquence.

Tout comme la configuration arrière, la configuration cycle-arrière permet d'étudier la phagocytose de billes qui peuvent être petites ( $8 \mu\text{m}$  de diamètre) ou grandes ( $20 \mu\text{m}$  de diamètre) (figure 1.11 page ci-contre).

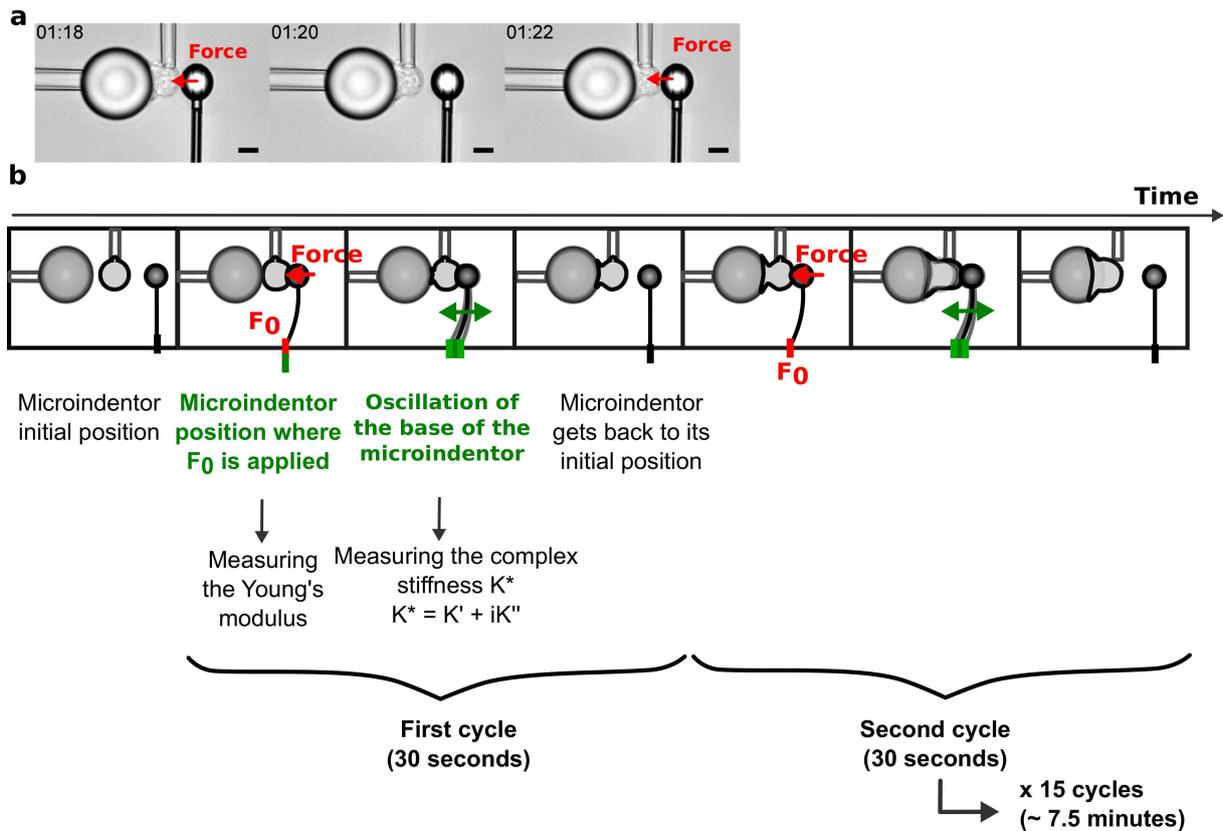


FIGURE 1.11 – Dispositif et rhéologie de la configuration cycle-arrière du rhéomètre. a) Le microindenteur réalise des cycles. Morphologie d'une cellule réalisant une phagocytose frustrée. Le temps est en minutes :secondes, la barre d'échelle est de  $5\mu\text{m}$ . b) Rhéologie de la configuration cycle-arrière. Nous mesurons le module d'Young ( $E_{Young}$ ) du neutrophile toutes les 30 secondes. Une force croissante est appliquée jusqu'à atteindre un seuil  $F_0$ . La force est appliquée au côté diamétralement opposé à celui de la coupe phagocytaire.  $E_{Young}$  est quantifié à partir de cette première phase. Ensuite la base du microindenteur oscille autour de la position fixe où  $F_0$  a été atteinte, ce qui nous permet de mesurer  $K'$  et  $K''$  à partir de la déformation oscillante qui résulte des oscillations du microindenteur. L'amplitude de l'oscillation de la force  $\Delta F$  n'est pas maintenue constante (c'est l'amplitude des oscillations de la base de la micropipette qui est maintenue constante). Contrairement aux configurations précédentes,  $\Delta F$  décroît au cours du temps. Une fois les oscillations terminées (nous imposons le nombre d'oscillations), le microindenteur revient à sa position initiale où il n'y a aucun contact entre celui-ci et la cellule. Un cycle vient alors de se terminer. Un cycle dure 30 secondes. Un nouveau cycle recommence alors, avec la mesure de  $E_{Young}$ , puis de  $K'$  et  $K''$ . Nous réalisons 15 cycles pour une durée d'environ 7.5 minutes.



# Chapitre 2

## Mécanique de la phagocytose

### Sommaire

---

<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>59</b>
1.1	Cadre du chapitre	59
1.2	La tension corticale des cellules pendant la phagocytose	59
1.2.1	Loi de Laplace	59
1.2.2	L'évolution de la tension corticale dépend de la taille de la sphère phagocytée	61
1.3	La tension membranaire des cellules pendant la phagocytose	61
<b>2</b>	<b>Résultats</b>	<b>63</b>
2.1	Variation des propriétés élastiques et visqueuses des neutrophiles pendant la phagocytose frustrée	63
2.1.1	L'évolution de $K'$ et $K''$ des cellules PLB pendant la phagocytose frustrée reflète-t-elle un effet géométrique ?	66
2.1.2	Module d'Young équivalent ( $E_{Young}^{Eq}$ )	72
2.2	Rôle de l'aire cellulaire dans la frustration de la phagocytose	73
2.2.1	L'aire de la coupe phagocytaire est indépendante de la courbure du substrat à phagocyter	73
2.2.2	Les cellules PLB déploient des réserves membranaires pendant la phagocytose frustrée	74
2.2.3	L'aire d'étalement est couplée aux propriétés mécaniques	76
2.3	Les événements morphologiques sont liés aux changements des propriétés viscoélastiques pendant la phagocytose	78
2.3.1	Les changements morphologiques des cellules PLB pendant la phagocytose frustrée	79
2.3.2	De la morphologie à la mécanique	79
2.3.3	Les propriétés mécaniques correspondent aux changements morphologiques	81

2.3.4	Corrélation entre les changements morphologiques et mécaniques des cellules PLB pendant la phagocytose complète . . . . .	83
2.3.5	Une nouvelle étape morphologique pendant la phagocytose complète : la fermeture du phagosome . . . . .	83
2.3.6	Évolution des propriétés viscoélastiques des cellules PLB lors d'une phagocytose complète . . . . .	84
2.4	Comparaison de la phagocytose frustrée et de la phagocytose complète . . . . .	89
2.5	Comparaison entre neutrophiles primaires humains et cellules PLB . . . . .	94
2.5.1	Pendant la phagocytose frustrée . . . . .	94
2.5.2	Pendant la phagocytose complète . . . . .	97
2.6	Conclusion . . . . .	101
<b>3</b>	<b>Discussion . . . . .</b>	<b>101</b>
3.1	Comportement des propriétés viscoélastiques des neutrophiles pendant la phagocytose complète et frustrée . . . . .	101
3.2	Mesure des stocks membranaires des cellules PLB . . . . .	104
<b>4</b>	<b>Matériel et Méthodes . . . . .</b>	<b>105</b>
4.1	Les cellules . . . . .	105
4.1.1	Les cellules PLB . . . . .	105
4.1.2	Préparation des neutrophiles primaires . . . . .	106
4.2	Opsonisation des billes et des surfaces planes . . . . .	107
4.2.1	Opsonisation des billes . . . . .	107
4.2.2	Opsonisation des surfaces planes . . . . .	107
4.3	Mesures d'aires . . . . .	108
4.3.1	Calcul de l'aire de la coupe phagocytaire . . . . .	108
4.3.2	Mesure de l'aire totale finale lorsque la cellule a arrêté de s'étaler . . . . .	110
4.3.3	Calculs de la dynamique de la phagocytose frustrée sur surface plane . . . . .	110
4.3.4	Discretisation de la géométrie cellulaire . . . . .	110
4.4	Mesurer l'aire de la cellule au moment de la rupture membranaire pendant un étirement passif par aspiration dans une micropipette . . . . .	110

---

# 1 Introduction

## 1.1 Cadre du chapitre

La phagocytose est un processus cellulaire qui consiste à détecter, à internaliser et à détruire une particule d'un diamètre supérieur à  $0.5 \mu\text{m}$ . Cette particule peut être de nature diverse, par exemple une bactérie, un champignon ou une cellule morte [Flannagan et al., 2012].

La phagocytose est décrite comme étant un processus modifiant la tension corticale [Herant et al., 2005, Herant et al., 2006, Lee et al., 2011b] et la tension membranaire [Masters et al., 2013a, Pontes et al., 2017]. La tension corticale est l'état mécanique en tension du cortex d'acto-myosine qui se trouve sous la membrane cellulaire. La tension cellulaire est une grandeur globale qui comprend la tension corticale (avec une forte contribution), la tension membranaire (avec une plus faible contribution), ainsi que des interactions cortex-membrane [Sens and Plastino, 2015].

Une cellule est un matériau viscoélastique. Pour comprendre l'état mécanique la cellule pendant la phagocytose, nous avons besoin de quantifier sa rigidité par la mesure d'un module d'Young ( $E_{Young}$ ) ainsi que sa viscosité ( $\mu$ ). Pour cela, nous avons utilisé le rhéomètre décrit précédemment.

Nous décrirons tout d'abord l'état de l'art quant à l'évolution de la tension corticale et la tension membranaire pendant la phagocytose. Ensuite, nous exposerons nos résultats qui mettent en lumière l'évolution de propriétés viscoélastiques des neutrophiles pendant qu'ils réalisent une phagocytose frustrée ou complète. Enfin, nous discuterons nos résultats au regard de la littérature. Ces résultats sont l'objet d'un article en cours de préparation dont je serai premier auteur.

## 1.2 La tension corticale des cellules pendant la phagocytose

### 1.2.1 Loi de Laplace

La loi de Laplace décrit comment la pression évolue de part et d'autre d'une interface entre deux fluides en présence d'une tension de surface ( $\gamma$ ). Pour expliquer l'application de cette loi dans le cas d'une cellule, nous nous basons sur le cas de l'aspiration dans une micropipette (figure 2.1a page 61) comme utilisé par Herant et al. [Herant et al., 2005]. Un neutrophile est ici maintenu avec une longueur  $L_p$  dans une micropipette grâce à une pression d'aspiration ( $\Delta P$ ) exercée dans la micropipette. Le neutrophile n'est pas entièrement aspiré et adopte une forme sphérique de rayon  $R$  à l'extérieur de la micropipette où la pression qui s'applique sur cette sphère est celle présente dans la chambre expérimentale ( $P_{room}$ ) (figure 2.1b page 61). La loi de Laplace implique que la différence de part et d'autre de la paroi cellulaire à l'intérieur de la

pipette est :

$$P_{cell} - P_p = \frac{2\gamma}{R_p} \quad (2.1)$$

$$P_{cell} - P_{room} = \frac{2\gamma}{R_{cell}} \quad (2.2)$$

Où ( $P_p$ ) est la pression à l'intérieur de la pipette. Nous ne connaissons pas  $P_{cell}$  qui s'écrit d'après les deux équations précédentes :

$$P_{cell} = \frac{2\gamma}{R_p} + P_p \quad (2.3)$$

$$P_{cell} = \frac{2\gamma}{R} + P_{room} \quad (2.4)$$

$$(2.5)$$

Nous notons alors comme précédemment la pression d'aspiration :  $\Delta P = P_{room} - P_p$  où  $P_{room} > P_p$  :

$$P_{room} - P_p = \frac{2\gamma}{R_p} - \frac{2\gamma}{R} \quad (2.6)$$

$$\Delta P = 2\gamma \left( \frac{1}{R_p} - \frac{1}{R} \right) \quad (2.7)$$

$$\gamma = \frac{\Delta P}{2 \left( \frac{1}{R_p} - \frac{1}{R} \right)} \quad (2.8)$$

Pour mesurer  $\gamma$  pendant que la cellule phagocyte, M. Herant et ses collègues ajustent  $\Delta P$  au cours du temps de sorte que la longueur ( $L_p$ ) de la cellule reste constante pendant la phagocytose. Augmenter  $\Delta P$  est effectivement nécessaire, sinon la cellule sortirait de la micropipette pendant la phagocytose.

Pendant nos expériences, c'est effectivement ce que nous observons : pendant la phagocytose, la cellule sort de la micropipette, c'est-à-dire que l'équilibre mécanique décrit par la loi de Laplace n'est plus respecté car la tension cellulaire a augmenté. À noter qu'une expérience d'aspiration par micropipette ne permet de mesurer que la tension cellulaire, sans distinguer la tension corticale et membranaire. Les auteurs utilisent en général un raccourci en mentionnant

la tension corticale, sachant que la tension membranaire n'a qu'une petite contribution dans la tension cellulaire.

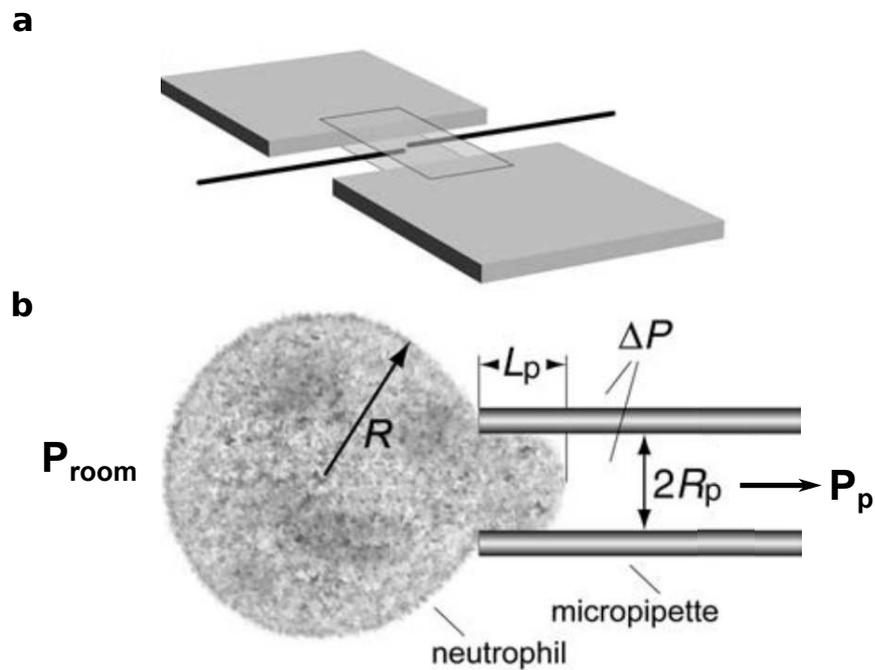


FIGURE 2.1 – Dispositif basé sur des micropipettes utilisé pour mesurer la tension corticale d'une cellule unique. a) Les deux micropipettes sont placées l'une en face de l'autre à travers des plaques de verre. Le diamètre de l'extrémité d'une micropipette est d'environ  $4 \mu\text{m}$  de diamètre. b) Un neutrophile est aspiré dans une micropipette. Les variables utilisées pour quantifier la tension corticale sont écrites. Les schémas proviennent et b) est adapté de [Herant et al., 2005].

### 1.2.2 L'évolution de la tension corticale dépend de la taille de la sphère phagocytée

L'aire des cellules augmente pendant que celles-ci phagocytent [Lam et al., 2009]. M. Herant et ses collègues ont fait phagocyter des billes de différentes tailles par des neutrophiles humains [Herant et al., 2005] (figure 2.2a page suivante). Les auteurs ont montré que l'augmentation de la tension corticale correspondait à l'aire déployée par la cellule (figure 2.2b page suivante).

### 1.3 La tension membranaire des cellules pendant la phagocytose

L'évolution de la tension membranaire a été mesurée avec des pinces optiques lors de la phagocytose frustrée de macrophages sur des surfaces planes opsonisées avec des IgG

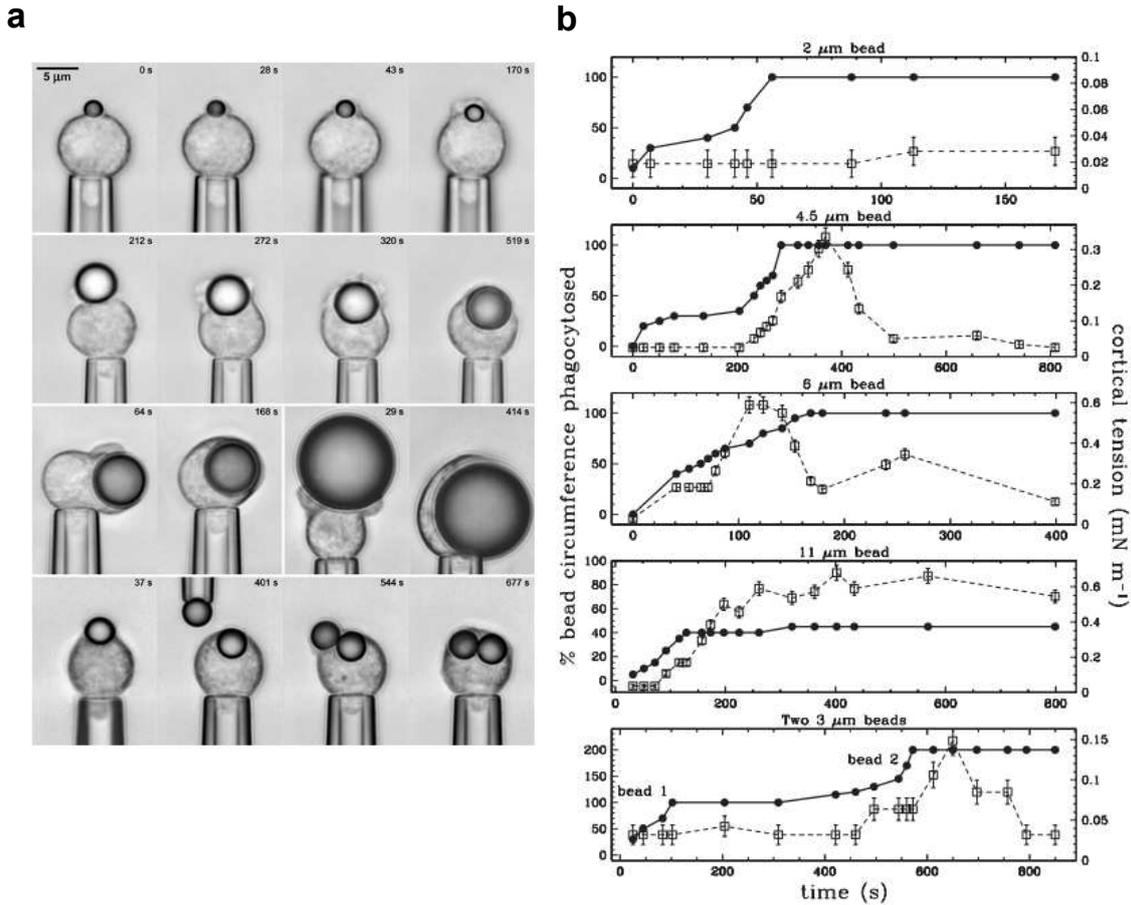


FIGURE 2.2 – Évolution de la tension corticale et du pourcentage de la bille cible phagocytée par le neutrophile. a) Phagocytoses de différentes tailles de billes de polystyrène opsonisées avec des IgG. b) Pourcentage de la circonférence de la bille phagocytée (cercles noirs) et évolution de la tension corticale (carrés blancs) en fonction du temps pour les phagocytoses représentées en a). Les figures proviennent de [Herant et al., 2005].

[Masters et al., 2013a, Pontes et al., 2017]. Quand une cellule s'étale sur une surface plane, elle consomme ses microvillosités [Hallett and Dewitt, 2007] puis recrute de la membrane supplémentaire par exocytose [Gauthier et al., 2011, Masters et al., 2013a]. Un modèle développé par les auteurs qui lie la tension membranaire à l'aire déployée par la cellule explique que la tension membranaire est maximale quand le stock de microvillosités est totalement consommé. Cette tension diminue ensuite, après que la membrane ait augmentée en surface via le recrutement de vésicules par exocytose (figure 2.3 page suivante).

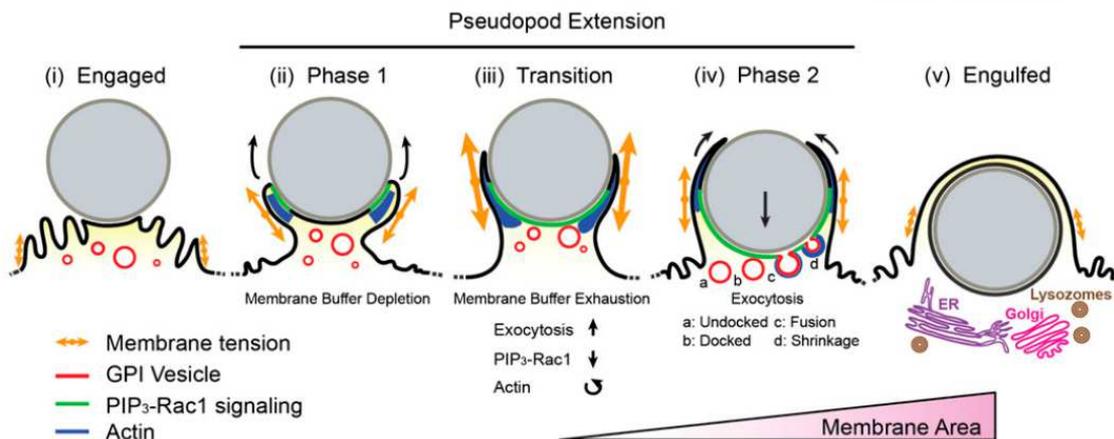


FIGURE 2.3 – Comportement de la tension membranaire en fonction de l’aire membranaire pendant la phagocytose. Après l’engagement de la cellule, la cellule polymérise l’actine et pousse ses pseudopodes autour de la bille (i). La tension membranaire augmente (ii) et est maximale quand le stock de microvillus disponible a été consommé (iii). L’aire membranaire augmente par exocytose de vésicules positives pour les ancrés GPI (iv). L’internalisation de la particule est ensuite réalisée (v). La figure provient de [Masters et al., 2013a].

## 2 Résultats

### 2.1 Variation des propriétés élastiques et visqueuses des neutrophiles pendant la phagocytose frustrée

Nous avons utilisé notre rhéomètre à cellule unique pour mesurer les propriétés viscoélastiques des neutrophiles. Nous rappellerons d’abord brièvement comment sont réalisées les mesures mécaniques (qui sont décrites plus en détail dans le chapitre 1).

Le rhéomètre est un outil basé sur une utilisation particulière de micropipettes (figure 2.4 page 65). Le principe est d’appliquer une force contrôlée sur une cellule non-adhérente et de mesurer la déformation qui en résulte. De cette déformation nous mesurons son module d’Young ( $E_{Young}$ ),  $K'$  et  $K''$ . Ces derniers sont respectivement proportionnels à l’élasticité (grandeur mesurée par le module d’Young) et à la viscosité de la cellule, les deux aspects de ses propriétés viscoélastiques.  $K'$  peut par ailleurs être relié à la tension cellulaire, la grandeur mesurée par d’autres techniques comme l’aspiration dans une micropipette.

Comment mesure-t-on ces quantités et comment peut-on les suivre pendant qu’un neutrophile phagocyte ? La cellule, tenue par une micropipette rigide est déformée par une bille qui est également l’objet à phagocyter. La bille est elle-même maintenue par une micropipette flexible dont nous connaissons la raideur en flexion. Nous pouvons alors mesurer et imposer la force

que la bille va appliquer sur la cellule pour la déformer. Lors du premier contact entre la bille et la cellule, une force croissante est exercée jusqu'à atteindre une force seuil de 175 pN. Pendant cette phase de premier contact nous mesurons simultanément la force exercée ainsi que la déformation de la cellule. Nous pouvons alors mesurer  $E_{Young}$  de la cellule à l'instant initial de l'expérience en utilisant le modèle de Hertz [Rosenbluth et al., 2006a, Wu et al., 2018]. Une fois  $E_{Young}$  mesuré, le dispositif passe automatiquement à une seconde phase pendant laquelle la bille exerce une force oscillante sur la cellule. Cette force oscillante va mener à une déformation la cellule qui est également oscillante. Grâce à la mesure simultanée de la force imposée et de sa déformation, nous pouvons mesurer  $K'$  et  $K''$ . Par ailleurs, notre rhéomètre à cellule unique nous permet de combiner des mesures morphologiques à ces mesures mécaniques grâce à l'acquisition à haute résolution (objectif de grossissement 100x) de la forme cellulaire pendant la phagocytose.

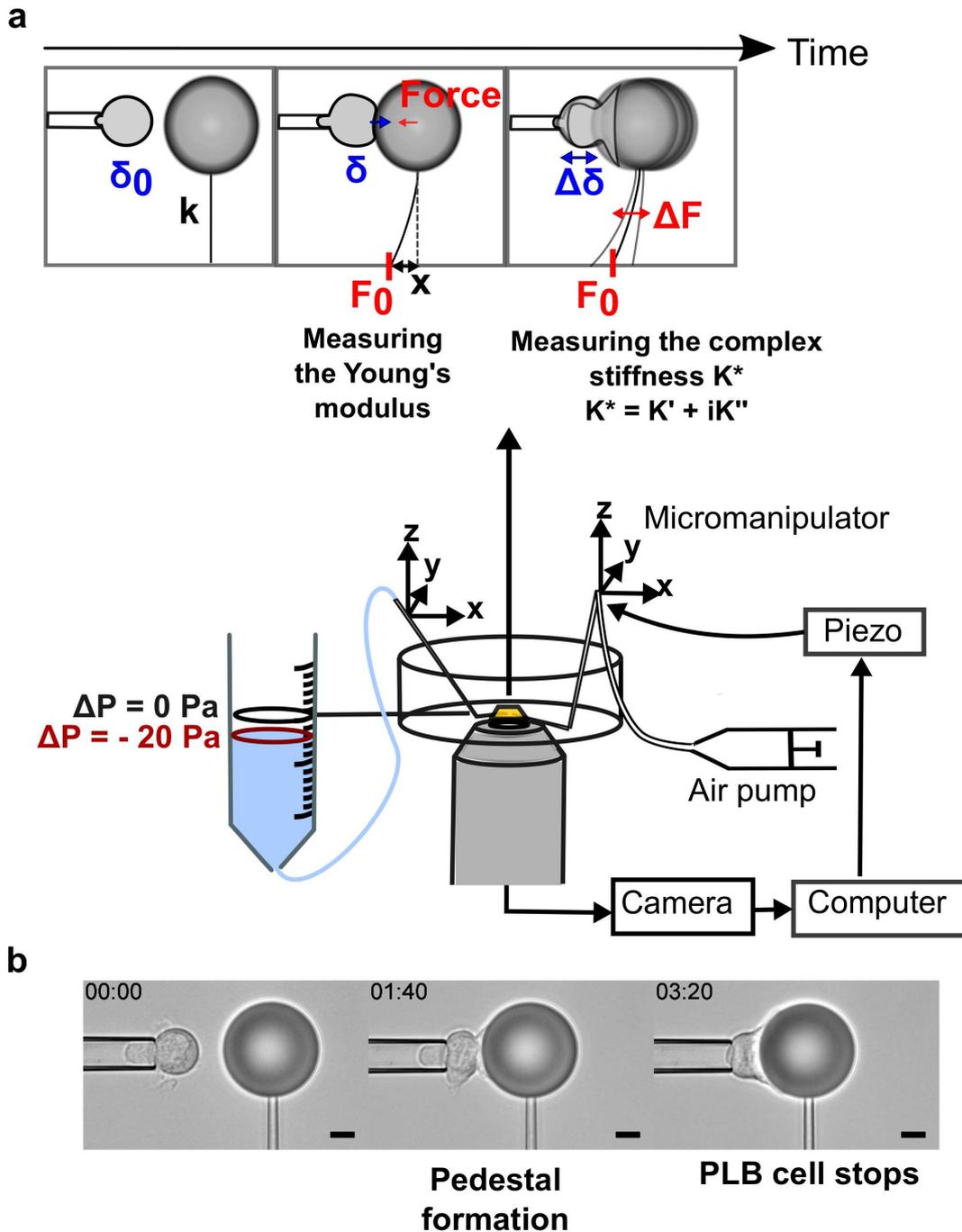


FIGURE 2.4 – Schéma du dispositif et rhéologie. Les panneaux montrent qu'une force est imposée à la cellule pour en extraire le module d'Young ( $E_{Young}$ ), et qu'une force oscillante est imposée pour extraire  $K'$  et  $K''$ . Ces deux quantités permettent de relier la force et la déformation. b) Morphologie d'une cellule PLB pendant la phagocytose, ici frustrée, d'une bille de  $20 \mu\text{m}$  de diamètre opsonisée avec des IgG. La cellule est maintenue par la pipette rigide horizontale et la bille est maintenue par la pipette flexible verticale. Dans l'image de gauche, il n'y a pas encore eu de contact entre la cellule et la bille. Dans l'image au centre, la cellule a commencé à former sa coupe phagocytaire (aussi appelée piédestal). Dans l'image de droite, la cellule a arrêté de s'étaler. Le temps est en minutes :secondes, la barre d'échelle est de  $5 \mu\text{m}$ .

Nous avons quantifié l'évolution de  $K'$  et de  $K''$  pendant la phagocytose frustrée par une cellule PLB d'une bille opsonisée avec des IgG (figure 2.5a et b page suivante). Ces cellules sont différenciées en neutrophiles et proviennent de la lignée cellulaire PLB-985. Pendant la phagocytose frustrée réalisée par ces cellules,  $K'$  augmente d'un facteur  $8,3 \pm 3,2$  et  $K''$  augmente d'un facteur  $3,2 \pm 1,3$  (figure 2.5 c et d page ci-contre). Dans des expériences contrôles où la bille n'est pas recouverte d'anticorps, la bille n'est pas phagocytée, et  $K'$  et  $K''$  évoluent peu, n'augmentant que d'un facteur 1,6. Cette augmentation est significative ( $p < 0.0001$ ) et correspond à une augmentation précoce de  $K'$  et  $K''$  (au cours des 50 premières secondes),  $K'$  et  $K''$  diminuent ensuite. Ces expériences contrôles suggèrent qu'une stimulation mécanique avec une pression exercée par une bille suffit à provoquer une légère augmentation de  $K'$  et  $K''$  (figure 2.5a et b page suivante).

L'augmentation de  $K'$  et  $K''$  pendant la phagocytose est sans commune mesure avec le cas contrôle (8.3 fois contre 1.6 fois,  $p < 0.0001$ ). Les valeurs maximales de  $K'$  et de  $K''$  sont observées en fin d'expérience, c'est-à-dire plusieurs minutes après le contact entre la cellule et la bille activatrice.

Pendant que la bille indente le neutrophile alors qu'il phagocyte, la cellule change drastiquement de géométrie. Elle est initialement sphérique, puis s'étale sur la bille, prenant la forme d'une calotte sphérique bombée au centre (figure 2.4b page précédente). La cellule s'aplatissant beaucoup au cours du temps, nous nous sommes demandé si la variation de  $K'$  et  $K''$  pouvait être due à ce changement de géométrie et non à un changement des propriétés mécaniques intrinsèques de la cellule. En effet, à module d'Young ( $E_{Young}$ ) constant, une cellule plus plate aura un  $K'$  plus élevé que celui d'une cellule plus épaisse. Il nous fallait, pour dissocier les effets géométriques des effets du changement de propriétés mécaniques intrinsèques, soit un modèle tenant compte de la géométrie complexe de la cellule pendant la phagocytose, soit faire appel au modèle de Hertz, qui décrit l'indentation d'une sphère par une autre sphère, et pour lequel nous disposons d'expressions analytiques simples. Utiliser ce modèle nécessite donc de pouvoir indenter une cellule conservant une forme sphérique au moins localement. Nous avons retenu la seconde option en modifiant la configuration du rhéomètre à cellule unique.

### **2.1.1 L'évolution de $K'$ et $K''$ des cellules PLB pendant la phagocytose frustrée reflète-t-elle un effet géométrique ?**

Pour répondre à cette question, nous avons modifié la configuration du rhéomètre (figure 1.10 page 53) en rajoutant une troisième micropipette : nous avons utilisé la configuration arrière décrite dans le chapitre 1 (figure 1.10 page 53). Dans cette configuration, la partie indentée de la cellule reste sphérique tout au long de la phagocytose, ce qui nous permet d'appliquer le modèle de Hertz pour extraire  $E_{Young}$  de la cellule qui est indépendant de sa géométrie. En

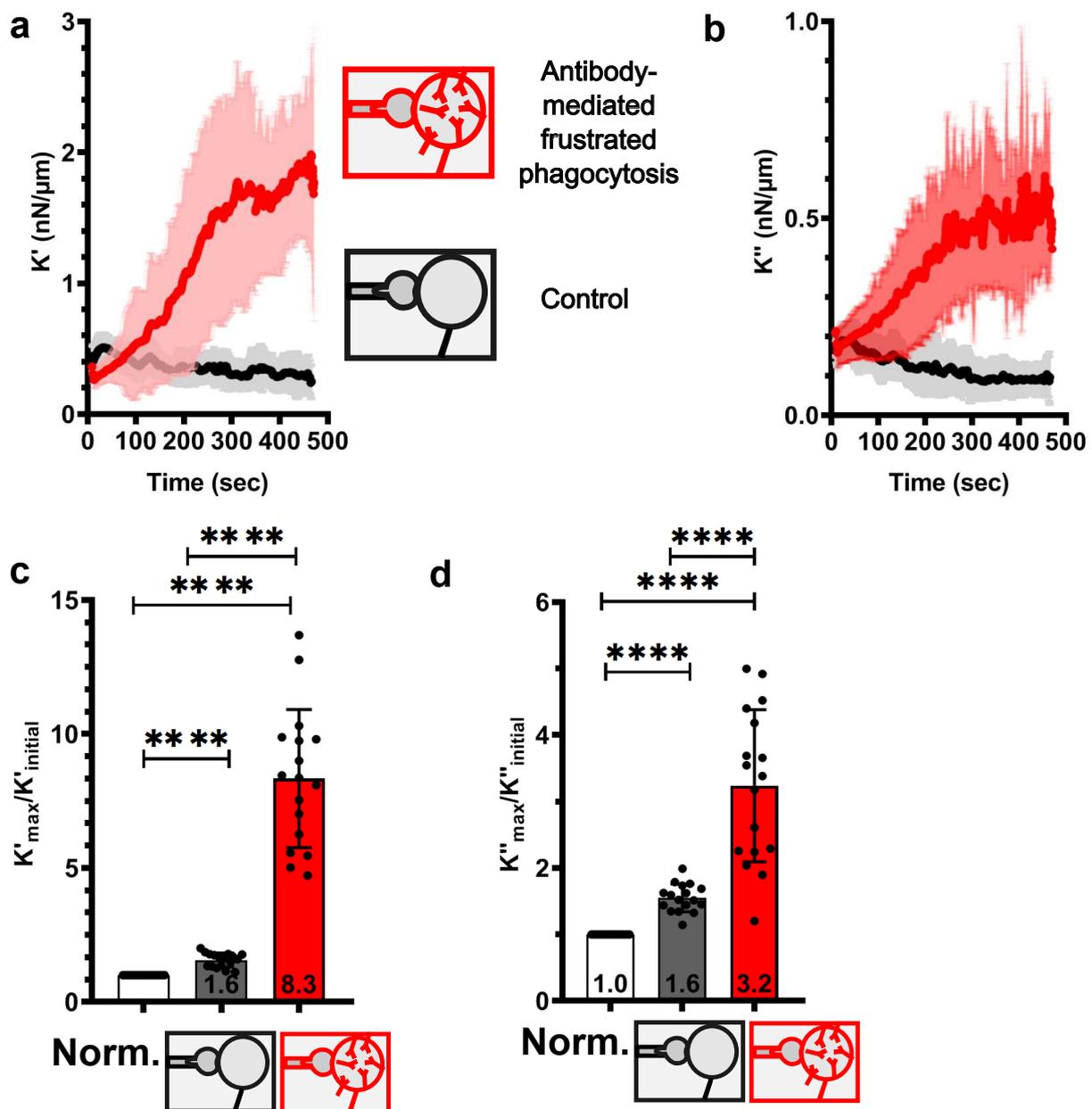


FIGURE 2.5 – Comportement mécanique des cellules PLB pendant la phagocytose frustrée. a-b) Évolution de  $K'$  et de  $K''$  avec les billes couvertes d'IgG (rouge) et les billes contrôles (noir). c-d) Normalisation des valeurs maximales de  $K'$  et de  $K''$  par les valeurs initiales pour les billes contrôle (gris) ou couvertes d'IgG (rouge). La première colonne à gauche (norm.) représente la normalisation des valeurs initiales (d'où la valeur 1). Les histogrammes représentent les moyennes et les barres d'erreurs sont les écarts types. Les tests statistiques sont des tests Kolmogorov-Smirnov pour la comparaison des moyennes deux à deux, et des one-way ANOVA pour les comparaisons entre trois moyennes. N= 3 expériences, n= 17 cellules pour la phagocytose frustrée et N= 3 expériences, n= 18 cellules pour la condition contrôle.

montrant que  $E_{Young}$  lui-même augmente pendant la phagocytose, nous pourrions ainsi exclure le fait que  $K'$  augmente simplement parce que la cellule s'étale et devient plus fine sans devenir plus rigide.

En utilisant la configuration arrière, nous mesurons une augmentation de  $K'$  et  $K''$  très similaire au cas mesuré en configuration avant :  $K'$  augmente  $7,2 \pm 3,4$  fois contre  $8,3 \pm 3,2$  en configuration avant,  $K''$  augmente  $3,0 \pm 1,3$  fois contre  $3,2 \pm 1,3$  en configuration avant (figure 2.6a page suivante).

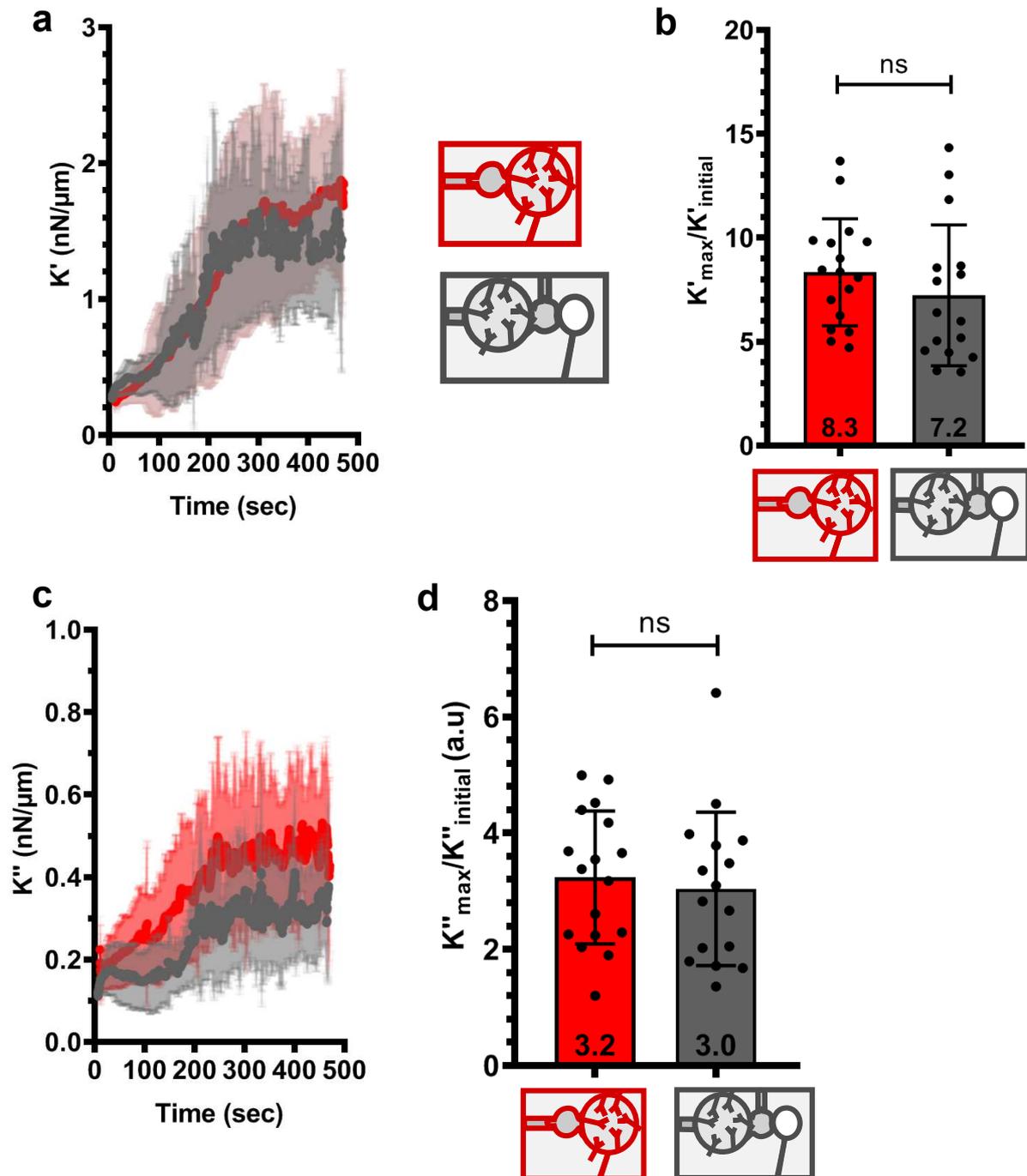


FIGURE 2.6 – Évolution de  $K'$  et de  $K''$  pour des neutrophiles dans la configuration avant et arrière du rhéomètre. a) Évolution  $K'$  en configuration avant (rouge) ou arrière (gris). b) Valeur maximale de  $K'$  normalisée par la valeur initiale de chaque cellule en configuration avant (rouge) ou arrière (gris). c) Évolution de  $K''$  en configuration avant (rouge) ou arrière (gris). d) Valeur maximale de  $K''$  normalisée par la valeur initiale de chaque cellule en configuration avant (rouge) ou arrière (gris). Les données de la configuration avant ont été réutilisées. Les tests statistiques sont des tests Kolmogorov-Smirnov. Pour la configuration arrière :  $N=3$  expériences,  $n=18$  cellules.

Grâce à la configuration cycle-arrière (figure 1.11 page 55), nous pouvons extraire les modules de conservation ( $E'$ ) et de perte et ( $E''$ ) (décrits à la section 3.3). Cependant comme précisé dans le chapitre 1, l'expression de  $E'$  et  $E''$  est une approximation (nous ne mesurons pas directement l'évolution de l'indentation au cours du temps). Nous avons donc fait appel à la configuration cycle-arrière pour montrer directement et sans ambiguïté que l'augmentation de  $K'$  est le reflet direct d'une augmentation de  $E_{Young}$  (mesuré directement et non pas un  $E_{Young}$  équivalent tiré de  $E'$ ). Cette approche nous permet de montrer que  $E_{Young}$  augmente aussi presque autant que  $K'$  pendant la phagocytose :  $E_{Young}$  augmente  $10.7 \pm 8.0$ , contre  $7.2 \pm 3.9$  fois pour  $K'$  dans la configuration arrière du rhéomètre. Nous savons déjà que  $K'$  suit la même évolution dans la configuration avant et arrière du rhéomètre (figure 2.6a page précédente). L'évolution de  $K'$  dans la configuration cycle-arrière est donc cohérente avec celle observée dans la configuration avant et arrière ( $p=0.31$ ) (figure 2.7 page ci-contre). L'évolution de  $K'$  et notre comparaison avec l'évolution de  $E_{Young}$  confirment que la cellule devient bien plus rigide pendant la phagocytose frustrée.

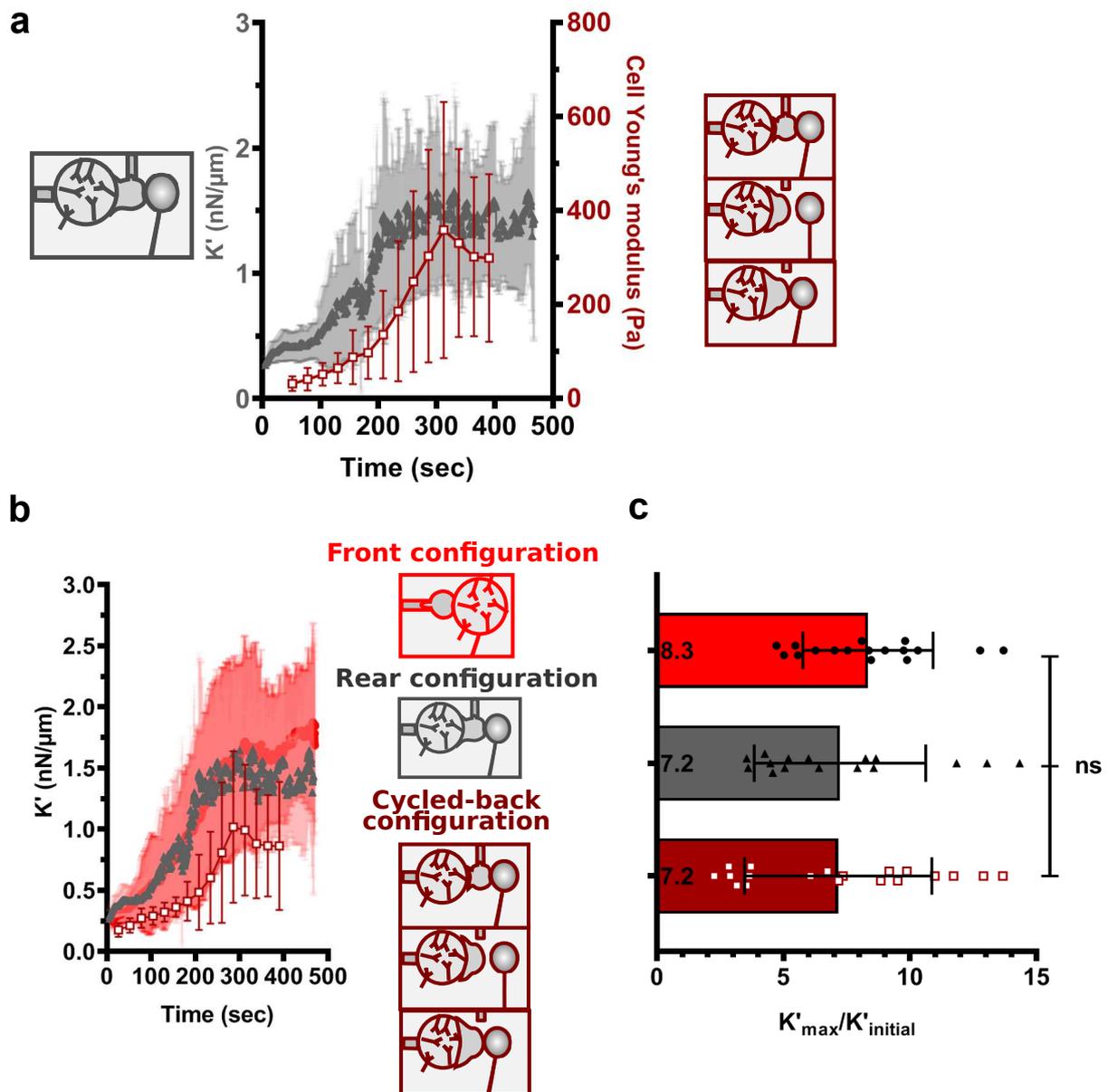


FIGURE 2.7 – Évolution de  $K'$  et de l'élasticité des neutrophiles augmente pendant la phagocytose. a) L'augmentation de  $K'$  dans la configuration arrière (triangles gris) et du module d'Young ( $E_{Young}$ ) avec la configuration cycle-arrière (carrés blancs). Chaque point correspond à une mesure de  $E_{Young}$  au début d'un cycle. b)  $K'$  mesuré avec la configuration cycle-arrière (carrés blancs) augmente aussi comparativement à la valeur mesurée avec la configuration arrière du rhéomètre (triangles gris) et à la configuration avant (rouge). c) Normalisation de la valeur maximale de  $K'$  par la valeur initiale pour chaque cellule et pour chaque configuration. Le test statistique est une one-way ANOVA ( $p=0.31$ ). Les lignes épaisses représentent les moyennes et les barres d'erreur les écarts types. Les données des deux autres configurations du rhéomètre ont été réutilisées de la figure 2.6 page 69. Pour la configuration cycle-arrière :  $N=3$  expériences,  $n=19$  cellules.

Comme décrit précédemment, pendant la phagocytose frustrée,  $K''$  mesuré dans la configuration arrière augmente grandement (figure 2.6c page 69). Cependant, dans la configuration cycle-arrière, nous mesurons une évolution qualitativement différente :  $K''$  évolue très peu (2.8), et n'augmente que d'un facteur  $1.8 \pm 0.7$  (contre  $3.2 \pm 1.3$  dans la configuration avant et  $3.0 \pm 1.3$  dans la configuration arrière,  $p=0.0044$ ). Nous exposerons les explications possibles pour cette différence qualitative dans la discussion de ce chapitre.

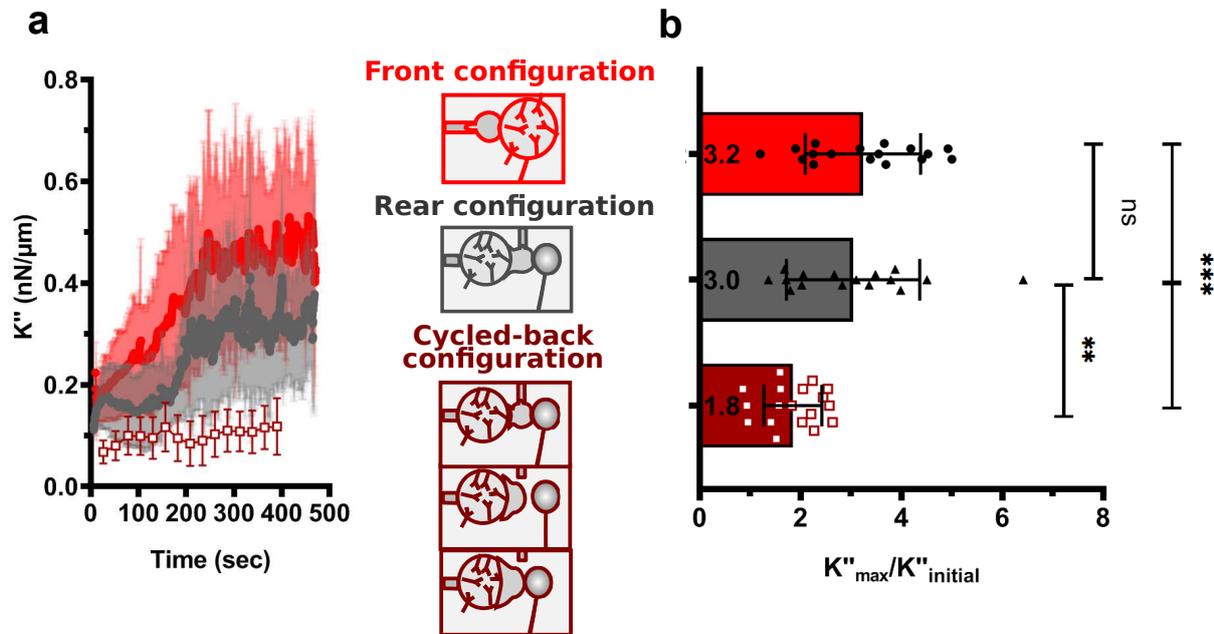


FIGURE 2.8 –  $K''$  dans la configuration cycle-arrière comparée aux autres configurations du rhéomètre. a) Évolution de  $K''$  dans les trois configurations du rhéomètre : avant (rouge), arrière (gris), cycle-arrière (carrés). b) Normalisation de  $K''$  avec la valeur initiale pour chaque cellule et chaque configuration. Le test statistique est une one-way ANOVA ( $p=0.0005$ ). Les tests deux-à-deux sont des tests non paires de types Kolmogorov-Smirnov. Les lignes épaisses représentent la moyenne et les barres d'erreurs les déviations standards. Les données de la configuration avant et arrière du rhéomètre ont été reprises de la figure 2.6 page 69. Pour la configuration cycle-arrière  $N=3$  expériences,  $n=24$  cellules.

### 2.1.2 Module d'Young équivalent ( $E_{Young}^{Eq}$ )

Comme indiqué dans le chapitre 1, la configuration arrière nous permet de mesurer (toutes les  $\sim 30$  secondes) à la fois  $E_{Young}$  et le module de conservation  $E'$ . Cela nous a permis de quantifier la constante  $C$  qui définit leur rapport de proportionnalité (équation 1.21),  $C=1,12$  pendant la phagocytose frustrée (figure 2.17c page 90). La valeur de  $E_{Young}^{Eq}$  (équation 1.22) augmente d'un facteur  $24.3 \pm 17.5$  pendant la phagocytose frustrée. La viscosité ( $\mu$ ) augmente, quant à elle, d'un facteur  $6.6 \pm 5.8$  (figure 2.17 page 90).

## 2.2 Rôle de l'aire cellulaire dans la frustration de la phagocytose

Quand un neutrophile réalise une phagocytose frustrée, il ne réussit pas à fermer le phagosome ; la cellule se trouve limitée dans sa capacité à s'étaler sur l'objet pour ensuite l'internaliser. Qu'est-ce qui limite l'étalement de la cellule sur sa cible ? Nous formulons plusieurs hypothèses. La première est que la cellule ne peut plus s'étaler car sa membrane ne peut davantage se développer. La deuxième est que les propriétés mécaniques limitent son expansion sur l'objet : la cellule ne peut plus assez se déformer (car trop rigide) ou trop visqueuse (vitesse de déformation trop faible) pour continuer à s'étaler. Est-ce l'aire de la cellule, ses propriétés mécaniques ou les deux qui limitent son expansion ? Dans cette section, nous répondons à cette question en comparant les aires des cellules PLB sur différents substrats afin de comprendre ce qui frustre la phagocytose. Les techniques de mesures d'aires sont décrites dans la section 4 de ce chapitre.

### 2.2.1 L'aire de la coupe phagocytaire est indépendante de la courbure du substrat à phagocyter

Quand la cellule PLB phagocyte une bille, elle étend sa coupe phagocytaire. Cette coupe a la géométrie d'une calotte sphérique, ce qui nous permet de mesurer simplement l'aire de la coupe phagocytaire en fonction du temps. L'aire de cette coupe augmente jusqu'à s'arrêter en atteignant un plateau de  $283 \pm 46 \mu\text{m}^2$  (figure 2.9a page 75), ce qui représente 22% de la surface d'une sphère de  $20 \mu\text{m}$  de diamètre. Au regard de résultats dans la littérature montrant un effet possible de la courbure d'une cible sur l'efficacité de la phagocytose [Champion and Mitragotri, 2006], nous avons étudié si la courbure des billes données à phagocyter aux cellules PLB pouvait influencer la phagocytose. Pour tester un cas extrême, nous avons opsonisé avec des IgG des surfaces planes. Quand les cellules PLB s'étalent sur ces surfaces planes, leur coupe phagocytaire a la forme d'un disque (figure 2.9b page 75), ce qui nous permet de quantifier simplement l'aire de ces coupes. Les cellules PLB s'étalent en moyenne sur une surface de  $277 \pm 82 \mu\text{m}^2$  sur ces surfaces planes. Cette valeur est presque identique ( $p=0.98$ ) à celle obtenue sur une sphère (figure 2.9a page 75). Nous avons aussi vérifié que l'aire totale finale des cellules (aire de la coupe phagocytaire et celle du corps cellulaire) est la même sur bille et sur plan : nous mesurons  $625 \pm 256 \mu\text{m}^2$  sur les billes et  $645 \pm 257 \mu\text{m}^2$  sur les plans, sans différence significative ( $p=0.37$ ). Sur les sphères de  $20 \mu\text{m}$  comme sur plan, la cellule atteint donc pendant une phagocytose frustrée une aire totale finale égale environ au double de sa surface initiale (figure 2.9e page 75).

## 2.2.2 Les cellules PLB déploient des réserves membranaires pendant la phagocytose frustrée

Une cellule possède des stocks membranaires qu'elle peut mobiliser pour étendre sa surface [Shao and Hochmuth, 1996, Shao et al., 1998]. Si les cellules PLB mobilisent leurs stocks pendant la phagocytose frustrée, dans quelle mesure le font-elles ? Pour répondre à cette question, nous avons tout d'abord mesuré la capacité *passive* d'extension membranaire, c'est-à-dire l'aire d'extension possible en absence de phagocytose.

Pour mesurer ces réserves membranaires nous avons réalisé des expériences d'aspiration par micropipette. Pour cela, nous avons maintenu une cellule dans une micropipette rigide et l'avons étirée jusqu'à ce que sa membrane soit rompue. Pour étirer la cellule, nous avons imposé une pression d'aspiration dans la micropipette rigide (pression hydrostatique  $\Delta P = \rho g \Delta h$ , où  $\rho$  est la masse volumique de l'eau,  $g$  est l'accélération de la pesanteur et  $\Delta h$  est la différence de niveau entre l'échantillon et le niveau d'eau dans un réservoir connecté à la micropipette ; pour une différence de 2mm la différence de pression est d'environ 20 Pa moyennant  $\sim 10 \text{ m.s}^{-2}$ ). En augmentant la différence de niveau  $\Delta h$  (en passant de  $\Delta h=2 \text{ mm}$  à  $\Delta h=500 \text{ mm}$ ), nous faisons varier  $\Delta P$  de 20 à 500 Pa environ. Sous cette pression de 500 Pa, la cellule s'étend continûment dans la pipette, jusqu'à ce que la membrane rompe (figure 2.9b page ci-contre). Pour pouvoir mesurer le moment où la membrane s'est rompue, nous avons réalisé des expériences en présence d'iodure de propidium, un intercalant des acides nucléiques, qui se trouve dans le milieu extracellulaire. Une fois que la membrane est rompue, l'iodure de propidium va entrer dans la cellule et se complexer aux acides nucléiques présents à l'intérieur de celle-ci. Les propriétés fluorescentes de l'iodure de propidium changent une fois complexé à un acide nucléique. En présence d'une longueur d'onde excitatrice adaptée, le changement de spectre lumineux se traduit par une émission de fluorescence à une longueur d'émission de 635 nm que nous observons avec un jeu de filtres adaptés. La fluorescence détectée indique alors une rupture membranaire (figure 2.9c page suivante) . En modélisant la géométrie cellulaire en la décomposant en formes géométriques simples, nous avons quantifié l'aire à laquelle les cellules PLB rompent leur membrane. L'aire initiale des cellules PLB est de  $286 \pm 84 \mu\text{m}^2$  et l'aire de rupture est en de  $461 \pm 129 \mu\text{m}^2$ , soit une extension en moyenne de 70% par rapport à leur valeur initiale avant de casser leur membrane (figure 2.9d page ci-contre). Pendant la phagocytose frustrée, ces cellules s'étendent de 100% (ce qui correspond à doubler l'aire initiale). Les cellules PLB déploient donc 30% de membrane supplémentaire pendant la phagocytose comparativement à un étirement passif ( $p=0.031$ ).

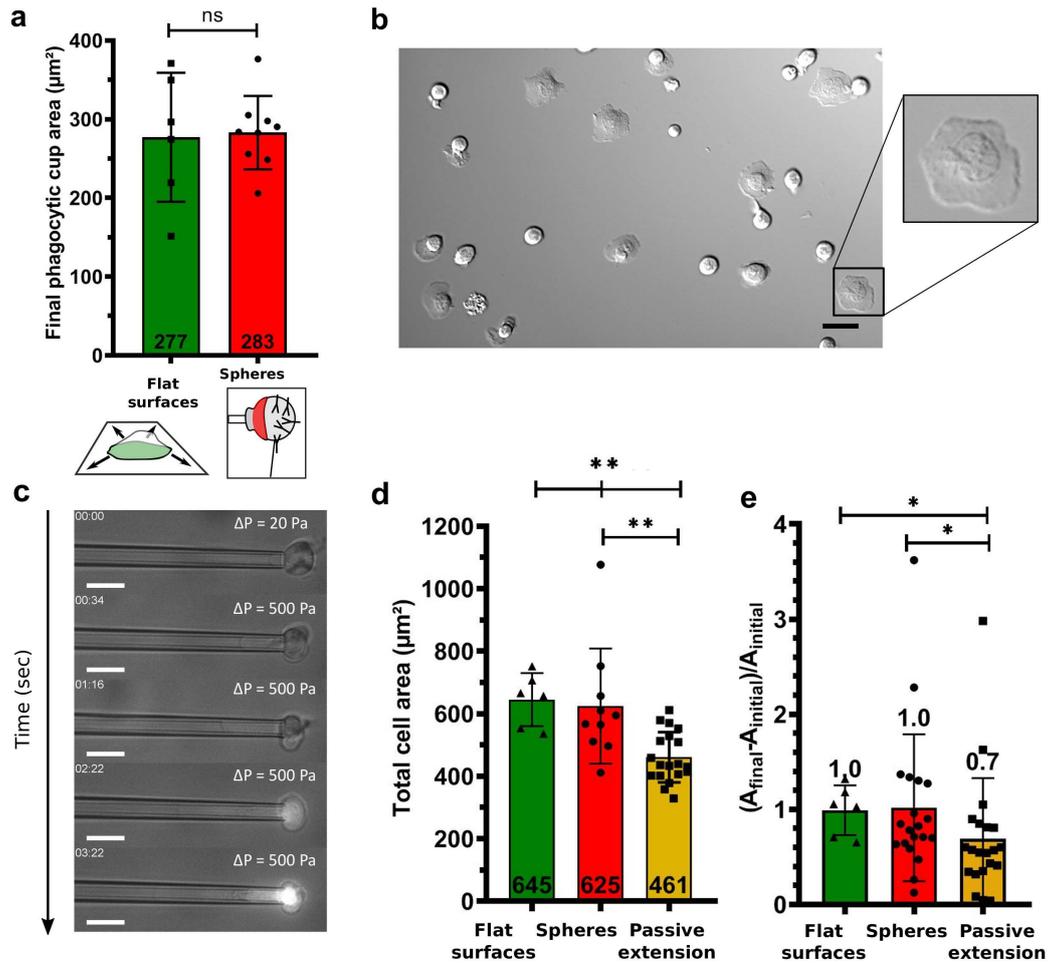


FIGURE 2.9 – Aire cellulaire pendant la phagocytose frustrée. a) Aires finales de la coupe phagocytaire d'étalement sur bille (rouge) et sur surface plane (vert). b) Morphologie cellulaire d'une cellule PLB s'étalant sur une surface plane en verre opsonisée avec des IgG. La géométrie de la coupe phagocytaire peut être approximée par un disque (panneau de droite). La barre d'échelle est de  $20\ \mu\text{m}$ . c) Expérience d'étirement passif en présence d'iodure de propidium. La pression d'aspiration ( $\Delta P$ ) appliquée est indiquée en haut à droite. La fluorescence émise lorsque l'iodure de propidium se complexe aux acides nucléiques est rouge ( $\lambda_{ex}=635\ \text{nm}$ ) et apparaît par un accroissement local d'intensité (nous utilisons un fond de lumière transmise, auquel se superpose le signal dû au propidium, le tout capturé avec une caméra monochrome). Cette fluorescence indique la rupture de la membrane. Le temps est en minutes :secondes, la barre d'échelle est de  $5\ \mu\text{m}$ . d) Aires totales des cellules en phagocytose frustrée sur bille (rouge), sur une surface plane (vert) ou lors d'une extension passive par aspiration dans une micropipette (jaune). e) Normalisation de l'aire de déploiement par sa valeur initiale. L'extension cellulaire est exprimée selon un ratio entre l'aire maximale dont on retranche l'aire initiale, dans le cas des surfaces planes (vert), des sphères (rouge), et par aspiration dans une micropipette (jaune). Des tests one-way ANOVA ont été réalisés pour la comparaison de trois groupes. Les tests sont des tests Kolmogorov-Smirnov réalisés entre deux populations. Pour les cellules sur sphères :  $N=3$  expériences,  $n=11$  cellules. Pour les surfaces planes :  $N=2$  expériences,  $n=6$  cellules. Pour l'aspiration par micropipette :  $N=3$  expériences,  $n=19$  cellules.

### 2.2.3 L'aire d'étalement est couplée aux propriétés mécaniques

Nous venons de voir que les cellules PLB recrutent davantage de membrane pendant la phagocytose frustrée que pendant un étirement passif. Pendant qu'une cellule s'étale sur la surface plane, la cellule consomme la surface membranaire présente dans ses microvillosités, c'est-à-dire qu'elle consomme ses stocks membranaires [Herant et al., 2005, Hallett and Dewitt, 2007, Lam et al., 2009]. Quand la cellule s'étale, et donc quand la membrane s'étale aussi, la tension membranaire augmente [Masters et al., 2013a, Pontes et al., 2017]. Ces études montrent que le comportement de la tension membranaire dépend de l'étalement cellulaire. La contribution de la tension membranaire a une faible contribution dans la tension cellulaire comparativement à celle du cortex d'actomyosine. [Sens and Plastino, 2015]. Nous mesurons une tension cellulaire ( $K'$ ) qui est donc dominée par la tension du cortex d'actomyosine (tension corticale) présent sous la membrane. Dans quelle mesure les quantités  $K'$  (donc la tension cellulaire) et de  $K''$  (lié à la viscosité cellulaire) sont-elles liées à l'aire déployée par la cellule ?

Dans la figure 2.10a page suivante, nous voyons sur une cellule unique que l'augmentation de l'aire de la coupe phagocytaire correspond à une augmentation de  $K'$  et  $K''$ . L'exemple de la figure 2.10a page ci-contre est représentatif du comportement observé sur l'ensemble des cellules qui phagocytent : l'aire de la coupe (et par extension l'aire totale de la cellule) augmente, ainsi que  $K'$  et  $K''$  comme nous l'avons vu précédemment. Pour corrélérer l'évolution de  $K'$  et de  $K''$  à l'aire totale déployée, nous avons mesuré l'aire totale des cellules PLB dans la configuration avant du rhéomètre (en discrétisant la géométrie cellulaire, méthode détaillée dans la section 4) (figure 2.10b page suivante). En moyenne, l'aire des cellules PLB augmente avec  $K'$  et  $K''$  (figure 2.10c page ci-contre). L'évolution de  $K'$  et de  $K''$  en fonction de l'aire totale diffère :  $K'$  augmente plus rapidement ( $K' = 0.01t - 3.9$  où  $t$  est le temps) que  $K''$  ( $K'' = 0.001t - 0.04$ ). La différence des taux de croissance de  $K'$  est 10 fois supérieur à celui de  $K''$  en fonction de l'aire totale ( $p = 0.0043$ ).

$K'$  atteint son maximum avant que la cellule atteigne sa surface maximale (figure 2.10c).  $K'$  a déjà rediminué quand la cellule atteint sa surface maximale. Cette courbe suggère que c'est l'aire qui limite la progression cellulaire, et non l'évolution de  $K'$ . Pour mieux comprendre si c'est soit l'aire, soit la valeur finale de  $K'$  ou les deux qui limitent l'expansion cellulaire pendant la phagocytose frustrée, nous avons quantifié les valeurs maximales et finales de chacune de ces quantités (aire,  $K'$  et  $K''$ ) (figure 2.11 page 78). L'aire maximale et celle finale sont identiques : l'aire finale correspond à l'aire maximale ( $p = 0.12$ ). Cependant, les valeurs maximales de  $K'$  et  $K''$  ne correspondent pas aux valeurs finales :  $K'$  et de  $K''$  diminuent après avoir atteint un pic. Les valeurs finales de  $K'$  sont 20 % plus faibles après les valeurs maximales ( $p = 0.036$ ). Les

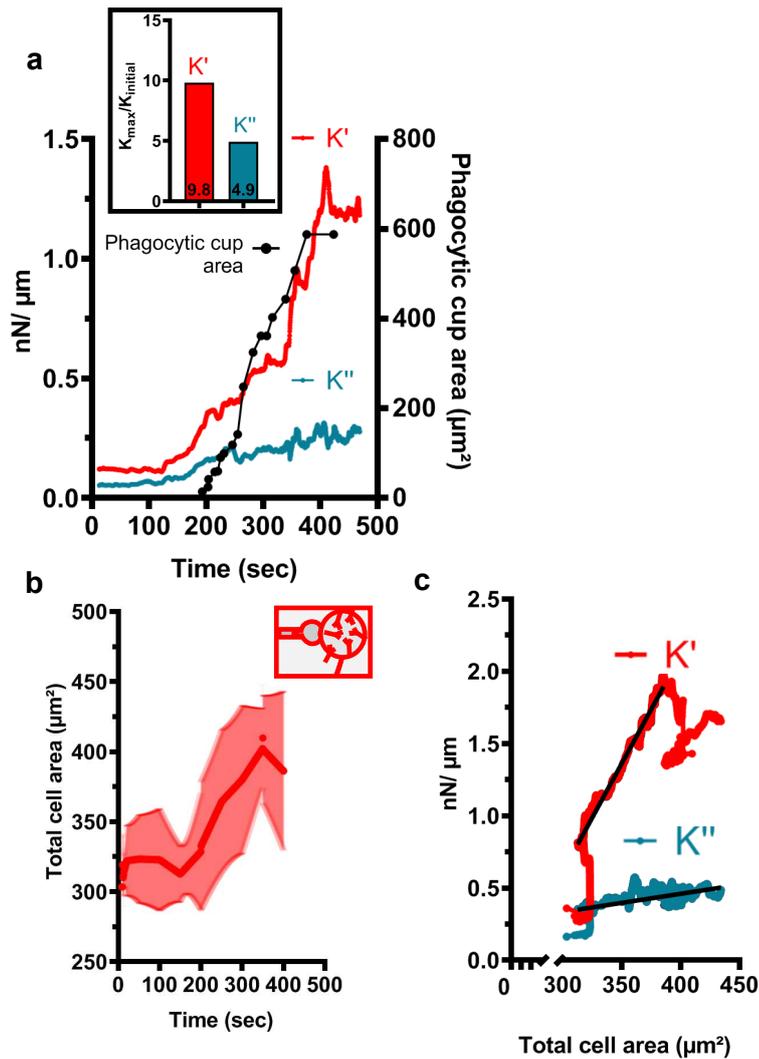


FIGURE 2.10 –  $K'$  et  $K''$  sont corrélés à l'aire cellulaire. a) Évolution de l'aire de la coupe phagocytaire (noir), de  $K'$  (rouge) et de  $K''$  (bleu) pour un exemple de cellule. Le panneau du haut montre les valeurs maximales de  $K'$  et de  $K''$  normalisées par leur valeur initiale. b) Évolution temporelle de l'aire totale moyenne de cellules PLB s'étalant sur bille. Les barres d'erreur représentent l'écart type. c) Moyennes de  $K'$  (rouge) et de  $K''$  (bleu) en fonction de l'aire moyenne totale dans la configuration avant du rhéomètre. Les droites sont des régressions linéaires. Pour les mesures des aires et de  $K'$  dans la configuration avant du rhéomètre :  $N=3$  expériences,  $n=6$  cellules.

valeurs finales de  $K''$  sont environ 35 % plus faibles que les valeurs maximales ( $p=0.041$ ).

En conclusion de cette section, nous savons que l'aire finale totale atteinte par les cellules PLB lors de la phagocytose frustrée n'est pas affectée par la courbure de la bille de  $20\mu\text{m}$ . La phagocytose frustrée est un processus actif qui requiert 30% de membrane en plus par rapport à une extension passive réalisée par une pression d'aspiration (figure 2.9 page 75). L'évolution

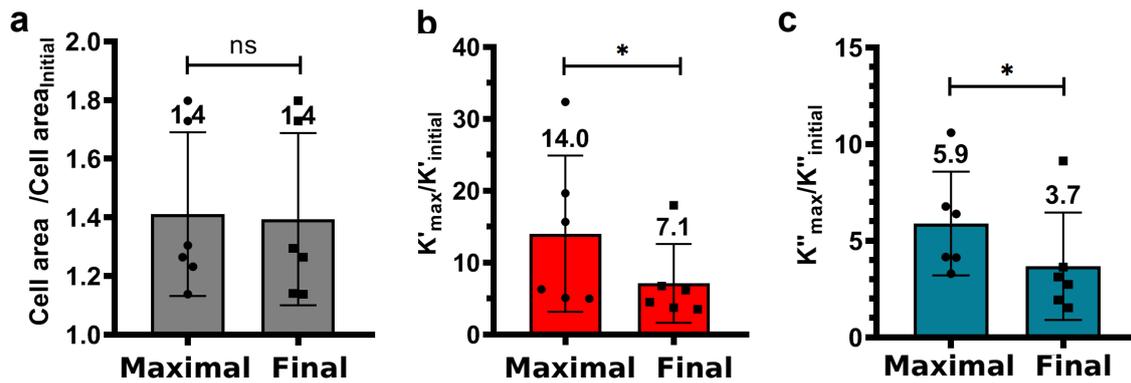


FIGURE 2.11 – Comparaison des valeurs maximales des aires, de  $K'$  et de  $K''$  des cellules PLB dans la configuration avant du rhéomètre. a) Normalisation des valeurs des aires maximales et finales totales cellulaires avec leur valeur initiale. b) Normalisation des valeurs de  $K'$  maximales et finales avec leur valeur initiale. c) Normalisation des valeurs de  $K''$  maximales et finales avec leur valeur initiale. Les t-tests pairés sont réalisés entre les normalisations des valeurs maximales et finales.  $N=3$  expériences dans la configuration avant du rhéomètre,  $n=6$  cellules.

de  $K'$  ainsi que de  $K''$  est corrélée à l'aire totale de la cellule.

Nous montrons que  $K'$  et  $K''$  ont déjà augmenté avant que la coupe phagocytaire ne commence à se former (figure 2.10a page précédente). Cette augmentation précoce de  $K'$  et de  $K''$  avant que la coupe ne commence à être formée nous indique que l'évolution de ces quantités annonce sa formation. Nous pouvons alors lier l'évolution de  $K'$  et de  $K''$  à un événement morphologique.

### 2.3 Les événements morphologiques sont liés aux changements des propriétés viscoélastiques pendant la phagocytose

Nous avons précédemment vu que l'état mécanique de la cellule PLB est corrélé à sa morphologie :  $K'$  et  $K''$  ont déjà augmenté quand la cellule commence à former sa coupe phagocytaire (figure 2.10a page précédente). Peut-on prédire les morphologies à partir de la valeur de  $K'$  et de  $K''$ ? Pour répondre à cette question, il faut d'abord identifier les différentes morphologies qu'un neutrophile adopte pendant la phagocytose frustrée, puis quantifier l'évolution des propriétés viscoélastiques qui sont corrélées à ces morphologies.

### 2.3.1 Les changements morphologiques des cellules PLB pendant la phagocytose frustrée

La morphologie des cellules PLB change drastiquement pendant la réalisation d'une phagocytose frustrée. Nous avons identifié trois changements morphologiques distincts pendant la phagocytose frustrée (figure 2.12a page 81). Quand la cellule est maintenue dans la micropipette, une partie de son corps cellulaire est aspirée dans la micropipette en formant un cylindre. Le reste de son corps qui est en-dehors de la micropipette adopte une forme sphérique. Le premier changement morphologique est la rétraction du corps cellulaire se trouvant à l'intérieur de la micropipette. Le second changement morphologique est celui où la cellule commence à former sa coupe phagocytaire. Une fois que la cellule a commencé à former sa coupe, elle s'étale progressivement sur la bille. Pendant cet étalement, la cellule crée un angle entre la coupe phagocytaire et la partie sphérique de son corps. Cet angle s'annule (passant de concave à convexe) une fois que la cellule a atteint sa surface maximale (figure 2.12a page 81). La perte de cet angle est le troisième changement morphologique.

### 2.3.2 De la morphologie à la mécanique

Nous avons essayé de comprendre si une corrélation existait entre les changements morphologiques et l'évolution des propriétés mécaniques cellulaires des cellules PLB pendant la phagocytose frustrée. Pour cela, nous avons mesuré les temps correspondant aux changements morphologiques pour chaque cellule. Ensuite, en faisant une analyse à l'aveugle (sans aucune interaction avec les analyses réalisées pour les changements morphologiques), nous avons mesuré  $K'$ ,  $K''$ , le rapport  $\eta = \frac{K''}{K'}$  sur lequel nous reviendrons plus en détail dans le chapitre 3, et  $x_{tip}$  (qui représente la position de la micropipette flexible). Chacune de ces quantités évolue dans le temps jusqu'à atteindre un plateau. Comme pour les changements morphologiques, nous avons identifié des changements mécaniques (tels que les valeurs maximales de  $K'$  et de  $K''$  par exemple). Ces changements mécaniques sont détaillés dans la section 2.3.2. Nous avons ensuite croisé ces deux analyses, pour éventuellement mettre à jour une corrélation entre les changements morphologiques et ceux mécaniques. Nous avons nommé cette analyse « en double aveugle » car l'analyse morphologique et celle mécanique sont faites de manière indépendante l'une de l'autre.

**L'analyse morphologique** Le temps où le changement mécanique survient est noté pour chaque cellule. Le temps 0 ( $t_0$ ) (figure 2.12 page 81) correspond au moment où la micropipette flexible commence à exercer une force oscillante ; c'est là où  $K'$  et  $K''$  commencent à être mesurés. Nous avons mesuré les temps de chaque changement morphologique qui sont :

1. Début de rétraction du corps cellulaire de la micropipette,
2. Début de formation de la coupe phagocytaire,
3. Disparition de l'angle entre la coupe phagocytaire et le corps cellulaire.

En mesurant les temps où les cellules commencent à se rétracter à l'intérieur de la micropipette et celui où elles commencent à former leur coupe, nous avons observé que ces temps étaient fortement corrélés (figure 2.14b page 85). La cellule commence à se rétracter de la micropipette et forme sa coupe phagocytaire simultanément. Si l'on trace les temps mesurés où la cellule commence à former sa coupe en fonction de ceux où elle commence à se rétracter ; on obtient la relation ( $y=0.99x$ ) où  $y$  est le temps de formation de la coupe et  $x$  celui de rétraction. Cette corrélation nous indique la simultanéité des deux changements morphologiques : quand la cellule commence à former sa coupe phagocytaire, elle commence à rétracter son corps cellulaire présent à l'intérieur de la pipette. La cellule met en moyenne  $81 \pm 38$  secondes pour former la coupe et à initier la sortie de la micropipette. Puis,  $97 \pm 38$  secondes après la formation de la coupe, la cellule perd l'angle présent entre la coupe phagocytaire et le corps cellulaire.

**L'analyse mécanique** Comme pour les analyses morphologiques, nous avons caractérisé des changements mécaniques. Les valeurs de  $K'$ ,  $K''$  et  $\eta$  (qui est égal au ratio  $\eta = \frac{K''}{K'}$ ) des cellules ne restent pas constantes pendant la phagocytose frustrée. Ces quantités mécaniques nous renseignent sur l'état viscoélastique de la cellule. Ces quantités évoluent et atteignent un plateau en fin d'expérience. Comme pour les changements morphologiques, chaque temps de chaque changement mécanique est enregistré

La position ( $x_{tip}$ ) de la micropipette flexible qui exerce la force nous renseigne sur un autre paramètre morphologique : l'allongement de la cellule (figure 2.13d page 82 et 2.18d page 92). Au début, la cellule est sphérique, et pendant son étalement sur la bille, celle-ci devient plus épaisse ( $x_{tip}$  augmente) pour ensuite s'aplatir ( $x_{tip}$  diminue). Quand la cellule s'aplatit, la micropipette flexible suit la cellule pour continuer à exercer la force oscillante. La position de la micropipette flexible ( $x_{tip}$ ) se déplace alors en fonction de l'épaisseur de la cellule. Ce déplacement correspond au changement d'épaisseur de la cellule.

Les mesures nous indiquent que les cellules commencent à s'allonger  $69 \pm 47$  s en moyenne après le contact avec la bille activatrice, et qu'elles atteignent leur épaisseur maximale après  $108 \pm 53$  s en moyenne. Elles se sont épaissies de  $1,83 \pm 0,92 \mu\text{m}$  (soit 20% du diamètre initial de la cellule) à la vitesse de  $0,5 \pm 0,2 \mu\text{m/s}$  par rapport à leur forme initiale, pour ensuite s'aplatir (figure 2.18c page 92).

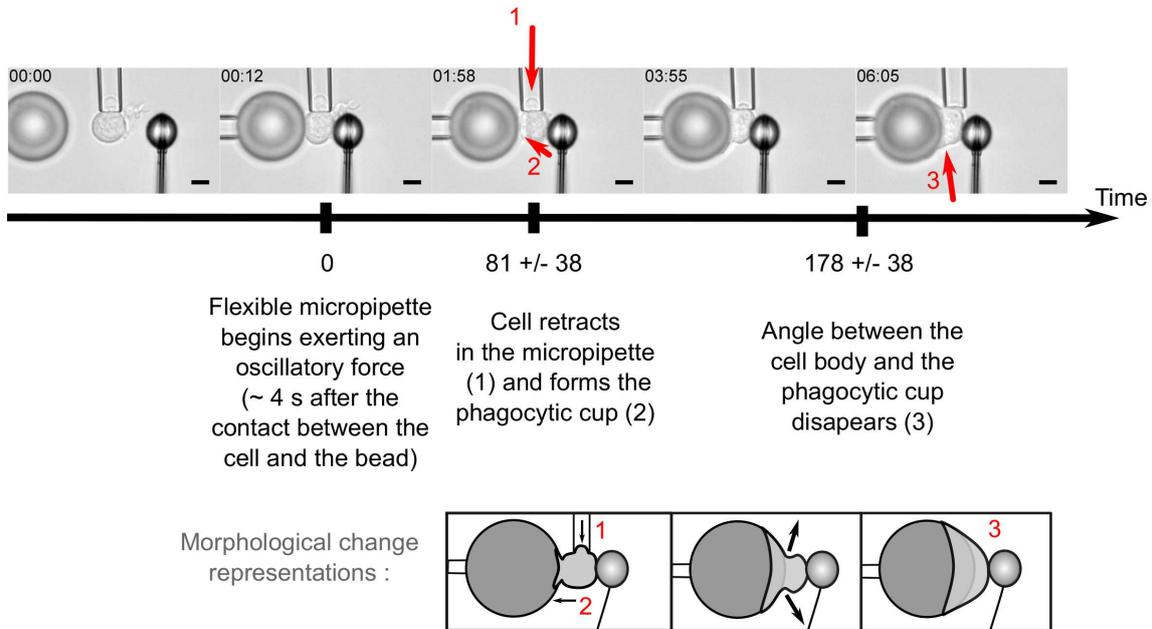


FIGURE 2.12 – Description des événements morphologiques au cours de la phagocytose frustrée. Morphologie des neutrophiles (panneau du haut). Les flèches rouges numérotées indiquent (1) le début de la rétraction de la cellule à l'intérieur de la pipette, (2) le début de la formation de la coupe phagocytaire, (3) la perte de l'angle entre le corps cellulaire et la coupe phagocytaire. Le temps 0 correspond au moment où la micropipette flexible commence à exercer une force oscillante. La barre d'échelle est de  $5 \mu\text{m}$ . Les changements morphologiques décrits sont schématisés et les changements morphologiques numérotés sont représentés dans le panneau du bas.

### 2.3.3 Les propriétés mécaniques correspondent aux changements morphologiques

Nous avons montré précédemment pour les cellules PLB,  $K'$  et  $K''$  ont déjà augmenté avant que la coupe phagocytaire ne commence à se former. Nous avons montré par ailleurs que la cellule commence à former sa coupe phagocytaire en même temps qu'elle commence se rétracter dans la micropipette. Au moment où ces deux changements morphologiques simultanés ont lieu,  $K'$  et  $K''$  sont déjà 1,6 fois supérieures à leur valeur initiale (figure 2.18a page 92). Nous mesurons des changements mécaniques qui précèdent un changement morphologique de la cellule.

Comme remarqué par l'équipe de V. Heinrich, le ratio entre la tension corticale et la viscosité de différents leucocytes (macrophages et neutrophiles) semble une grandeur conservée [Lam et al., 2009, Heinrich, 2015], malgré des rigidités dix fois supérieures d'un type cellulaire à l'autre. Cela nous a mené à nous interroger sur le fait que ce rapport pourrait être aussi conservé au cours du temps pendant un processus actif comme la phagocytose. Pour répondre

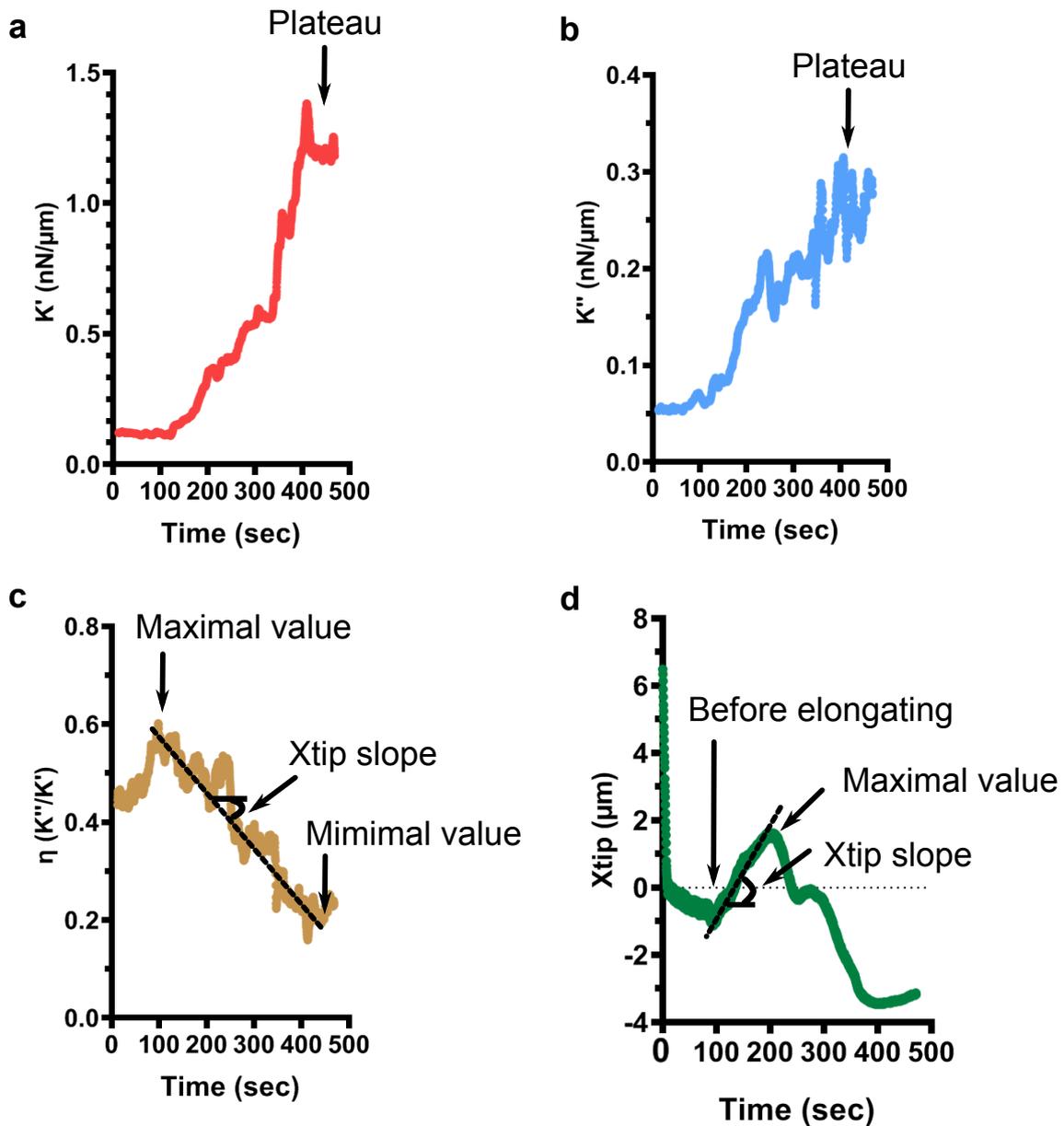


FIGURE 2.13 – Caractérisation des changements mécaniques, exemples de mesures pour une cellule. a) Évolution de  $K'$  avec le plateau qui est pris comme changement mécanique. b) Évolution de  $K''$  avec le plateau qui est pris comme premier changement mécanique. c) Évolution de  $\eta$  avec la valeur maximale, la pente et la valeur minimale qui sont caractérisées comme changement mécanique. d) Évolution de  $x_{tip}$  qui représente la position du microindenteur. La position du microindenteur se déplace en fonction de l'épaisseur de la cellule. Quand  $x_{tip}$  augmente, la cellule s'épaissit.

à cette question, nous avons quantifié le rapport  $\eta = \frac{K''}{K'}$ . En effet, nous pouvons montrer que  $K'$  est proportionnel à la tension cellulaire  $\gamma$  :  $K' = \pi\gamma$  [Cartagena-Rivera et al., 2016]; nous avons par ailleurs montré que  $K''$  est proportionnel à la viscosité cellulaire via  $E''$  (équation 1.23). Nous attendons donc  $\eta$  soit inversement proportionnel au rapport entre la tension et de la viscosité cellulaires.

Quatre événements arrivent simultanément : (i) la cellule commence à former sa coupe phagocytaire, (ii) la cellule commence à se rétracter dans la micropipette, (iii)  $\eta$  commence à chuter, et (iv) la cellule commence à s'allonger dans la direction normale à la bille (figure 2.18 page 92). À ce moment là, des changements mécaniques ont déjà été mesurés, car  $K'$  et  $K''$  ont déjà augmenté d'un facteur 1.6.

Nous avons vu dans cette section une description de l'évolution morphologique et mécanique des cellules PLB pendant la phagocytose frustrée. Cette description est-elle encore valable pendant la phagocytose complète ?

### **2.3.4 Corrélation entre les changements morphologiques et mécaniques des cellules PLB pendant la phagocytose complète**

La phagocytose frustrée et celle complète sont distinguées par la capacité du phagocyte à fermer la coupe phagocytaire, et donc à fermer le phagosome qui va servir à dégrader la cible ingérée. Nous utiliserons le terme de phagocytose complète pour spécifier que nous parlons bien d'une phagocytose non frustrée, où la fermeture du phagosome a lieu.

Pour étudier la corrélation entre les changements morphologiques et ceux mécaniques pendant la phagocytose complète, nous avons remplacé les billes de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre par des billes de 8  $\mu\text{m}$  de diamètre. Ces petites billes sont aussi opsonisées avec des IgG. Nous avons réalisé la même analyse en double aveugle que précédemment : une analyse des temps correspondant aux changements morphologiques d'une part, et d'autre part, une analyse des changements mécaniques de  $K'$ ,  $K''$ ,  $\eta$  et de  $x_{tip}$ .

### **2.3.5 Une nouvelle étape morphologique pendant la phagocytose complète : la fermeture du phagosome**

Nous avons d'abord détecté les changements morphologiques majeurs des cellules PLB réalisant une phagocytose complète. Ces changements sont les mêmes que pendant la phagocytose frustrée, cependant ici, la cellule ferme le phagosome. Nous avons donc un changement morphologique supplémentaire comparativement à la phagocytose frustrée où la cellule ne ferme pas son phagosome. Nous avons ensuite noté le temps au bout duquel chaque changement mor-

phologique est observé (figure 2.14a page 92). Le temps 0 ( $t_0$ ) est comme précédemment le moment où le microindenteur commence à exercer une force oscillante sur la cellule.

De façon très intéressante la cellule se comporte de la même façon entre la bille de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre et la bille de 8  $\mu\text{m}$  : les temps de rétraction de la micropipette et la formation de la coupe phagocytaire sont les mêmes que lors de la phagocytose frustrée. Pendant la phagocytose complète, la cellule commence à former sa coupe toujours simultanément au début de la rétraction dans la micropipette (figure 2.14b page 92). Les temps de début de la formation de la coupe sont donc égaux ( $p= 0.97$ ) entre la phagocytose frustrée et complète indiquant que la cellule n'est pas impactée par la taille de la bille lorsqu'elle commence à former sa coupe. La cellule met  $198 \pm 53$  sec à former le phagosome.

Pour connaître la séquence d'événements morphologiques et mécaniques pendant la phagocytose complète, il nous faut tout d'abord quantifier l'évolution des propriétés viscoélastiques des neutrophiles.

### **2.3.6 Évolution des propriétés viscoélastiques des cellules PLB lors d'une phagocytose complète**

Pour connaître l'évolution de  $K'$  et de  $K''$  des neutrophiles pendant la phagocytose complète, nous n'avons pas pu utiliser la configuration avant du rhéomètre car elle ne nous permet pas de réaliser une expérience où la cellule ferme son phagosome. Pour contourner ce problème technique (exposé dans la section 4.1), nous avons utilisé la configuration arrière du rhéomètre pour mesurer  $K'$  et  $K''$  lors de la phagocytose complète. Cette configuration permet à la cellule de fermer le phagosome sans que la cellule ne perde l'intégrité de sa membrane. Nous pouvons alors quantifier les propriétés viscoélastiques des neutrophiles pendant la phagocytose complète et frustrée (figure 2.15a page 86).

Pendant la phagocytose complète des billes de 8  $\mu\text{m}$ , l'évolution des propriétés viscoélastiques des cellules PLB présentent des différences par rapport à la phagocytose frustrée sur billes de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre. Sur les billes de 8  $\mu\text{m}$ ,  $K'$  augmente  $4,1 \pm 1,3$  fois contre  $7.2 \pm 3.4$  fois sur les billes de 20  $\mu\text{m}$ ; tandis que  $K''$  augmente  $1,9 \pm 0,8$  fois (billes de 8  $\mu\text{m}$ ) contre  $3.0 \pm 1.3$  (billes de 20  $\mu\text{m}$ ) (figure 2.15c et d page 86).  $K'$  et  $K''$  atteignent donc des valeurs plus élevées sur les billes de 20  $\mu\text{m}$  que sur celles de 8  $\mu\text{m}$ . Ce comportement différent de  $K'$  et de  $K''$  pourrait être dû à la phagocytose complète ou frustrée et non à une différence de courbure entre les deux tailles de billes. En effet, nous avons rejeté un effet de courbure sur la dynamique d'étalement des cellules PLB quand celles-ci s'étalent sur une surface plane ou sur les billes de 20  $\mu\text{m}$ .

Pour mesurer l'évolution de  $E_{Y_{oung}}$  pendant la phagocytose, nous avons utilisé la configuration cycle-arrière qui nous permet de quantifier l'évolution de  $E_{Y_{oung}}$  pendant la phagocytose

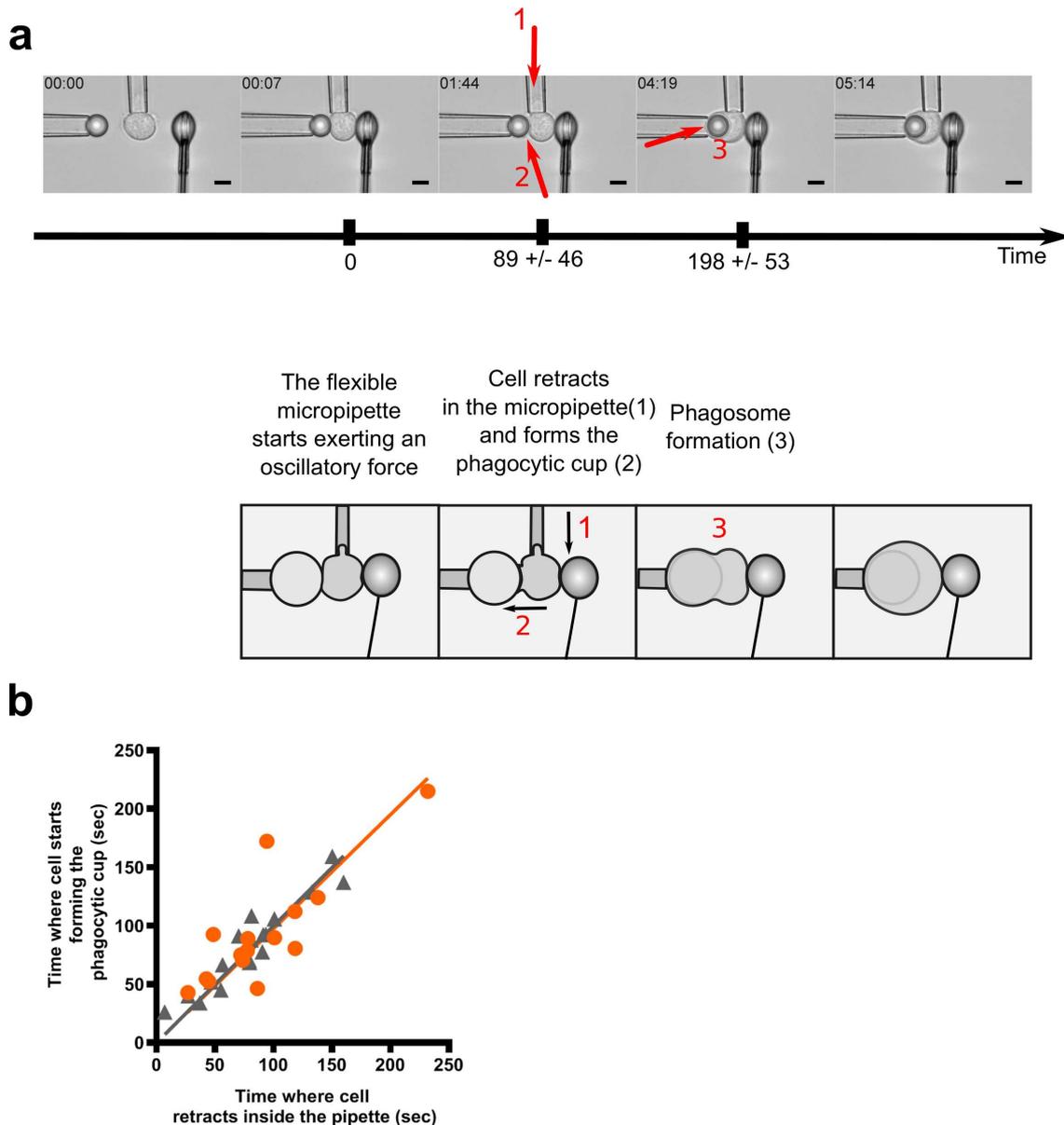


FIGURE 2.14 – Descriptions morphologiques de la phagocytose complète. a) Morphologies des neutrophiles (panneau du haut). Les flèches rouges numérotées indiquent (1) le début de la rétraction de la cellule à l'intérieur de la pipette, (2) le début de la formation de la coupe phagocytaire, (3) la fermeture du phagosome et (4) la perte d'angle entre le corps cellulaire et la coupe phagocytaire. La barre d'échelle est de  $5 \mu\text{m}$ . Les changements morphologiques décrits sont schématisés et les changements morphologiques numérotés sont représentés dans le panneau du bas. b) Corrélation entre les temps de début rétraction de la cellule à l'intérieur de la micropipette et celui où la cellule commence à former sa coupe phagocytaire. Les temps sont identiques pour la phagocytose complète (cercles orange) et la phagocytose frustrée (triangles gris). Les droites sont les régressions linéaires des données des temps de début de rétraction de la cellule dans la pipette et le début de la formation de la coupe phagocytaire.

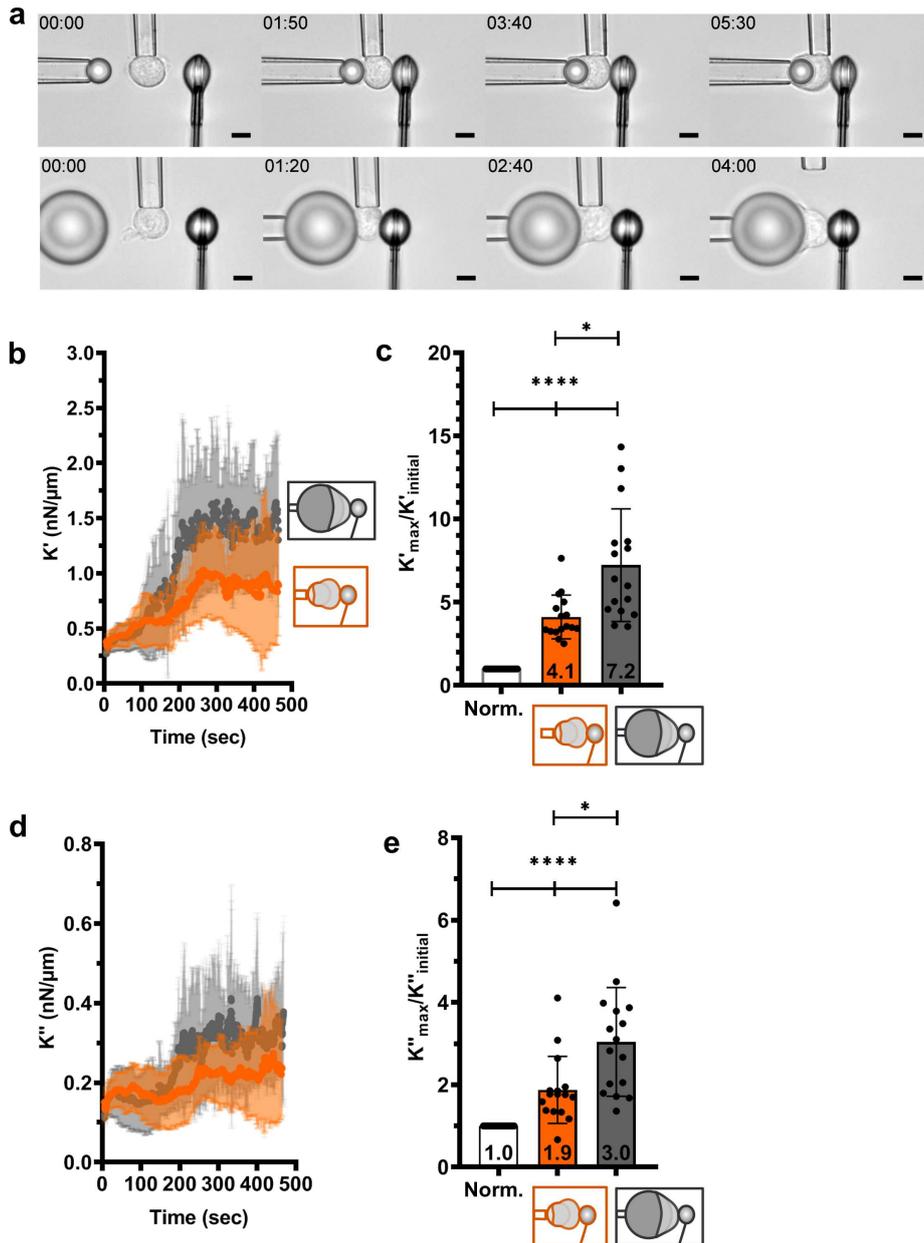


FIGURE 2.15 – Comparaison de l'évolution temporelle de  $K'$  et de  $K''$  des cellules PLB mesurés avec la configuration arrière du rhéomètre pendant la phagocytose frustrée et complète. a) Morphologie pendant la phagocytose complète (panneau du haut) comparée à la morphologie pendant la phagocytose frustrée (panneau du bas). La configuration du rhéomètre est la même dans les deux expériences, seule la taille de bille est modifiée. Le temps est en minutes :secondes, la barre d'échelle est de  $5 \mu\text{m}$ . b) Évolution de  $K'$  pendant la phagocytose complète (orange) et frustrée (gris). c) Ratio entre la valeur maximale de  $K'$  par la valeur initiale de chaque cellule pendant la phagocytose complète (orange) et frustrée (gris). d) Évolution de  $K''$  pendant la phagocytose complète (orange) et frustrée (gris). e) Normalisation de  $K''$  par la valeur initiale de chaque cellule pendant la phagocytose complète (orange) et frustrée (gris). Des tests one-way ANOVA ont été réalisés pour la comparaison de trois groupes ( $p < 0.001$ ). Les tests statistiques sont des tests Kolmogorov-Smirnov réalisés entre deux populations ( $p = 0.01$ ). Pour les billes de  $\phi = 20 \mu\text{m}$  :  $N = 3$  expériences,  $n = 18$  cellules. Pour les billes de  $\phi = 8 \mu\text{m}$  :  $N = 3$  expériences,  $n = 18$  cellules.

frustrée ainsi que pendant la phagocytose complète (figure 22.16a page suivante). Dans cette configuration,  $K'$  augmente  $5.3 \pm 2,8$  fois pendant la phagocytose complète et  $7,2 \pm 3.9$  fois pendant la phagocytose frustrée. Rappelons que nous avons observé la même tendance avec la configuration arrière : une augmentation de  $K'$  et  $K''$  plus importante pendant la phagocytose frustrée que pendant la phagocytose complète. Ici la tendance est la même, mais la différence n'est cependant pas statistiquement significative ( $p=0.21$ ). Remarquons cependant qu'il y a plus de variabilité dans  $\frac{K'_{max}}{K'_{init}}$  sur les petites billes en configuration cycle-arrière (figure 2.16d page suivante) qu'en configuration arrière (figure 2.15c). Si cette dispersion plus grande n'a pas de cause évidente pour nous, elle peut expliquer l'absence de différence significative entre petites et grandes billes en configuration cycle-arrière.

En revanche, la différence est notable pour l'évolution de  $K''$  entre les configurations arrière et cycle-arrière. Dans la configuration arrière du rhéomètre nous avons mesuré une augmentation de  $K''$  significativement plus élevée pendant la phagocytose frustrée que pendant la phagocytose complète ( $p=0.047$ ) (figure 2.15c et e page ci-contre). Cette tendance est maintenant différente en configuration cycle-arrière :  $K''$  ne semble pas être influencé par la nature frustrée ou complète de la phagocytose (figure 2.16c page suivante). En regardant l'augmentation de  $K''$ , nous trouvons même une augmentation significativement plus forte de  $K''$  pendant la phagocytose complète que pendant celle frustrée ( $p=0.017$ , donc un résultat inverse que précédemment en configuration arrière). Le comportement de  $K''$  est donc différent quand il est mesuré avec la configuration cycle-arrière que quand il est quantifié avec la configuration arrière.

Pour récapituler, les mesures de  $K'$  sont cohérentes entre les trois configurations :  $K'$  augmente d'autant plus que la bille phagocytée est large. Les mesures de  $E_{Young}$  réalisées toutes les 30 secondes avec la configuration cycle-arrière (figure 2.16a page suivante) confirment cette tendance. En revanche, l'évolution de  $K''$  est radicalement différente entre la configuration arrière et celle cycle-arrière.  $K''$  évolue peu dans le temps avec la configuration cycle-arrière et la tendance de  $K''$  s'inverse en exhibant une augmentation plus élevée de  $K''$  pendant la phagocytose complète. Nous n'avons pas d'explication simple pour ce comportement différent de  $K''$  lors de sa mesure avec la configuration cycle-arrière. Dans cette configuration, la cellule n'est pas constamment sous compression, et le traitement mécanique de la cellule qui phagocyte diffère donc de la configuration arrière où la cellule est en permanence indentée. L'explication du comportement de  $K''$  dans la configuration cycle-arrière n'est pas claire pour nous et sera examiné dans la discussion de ce chapitre.

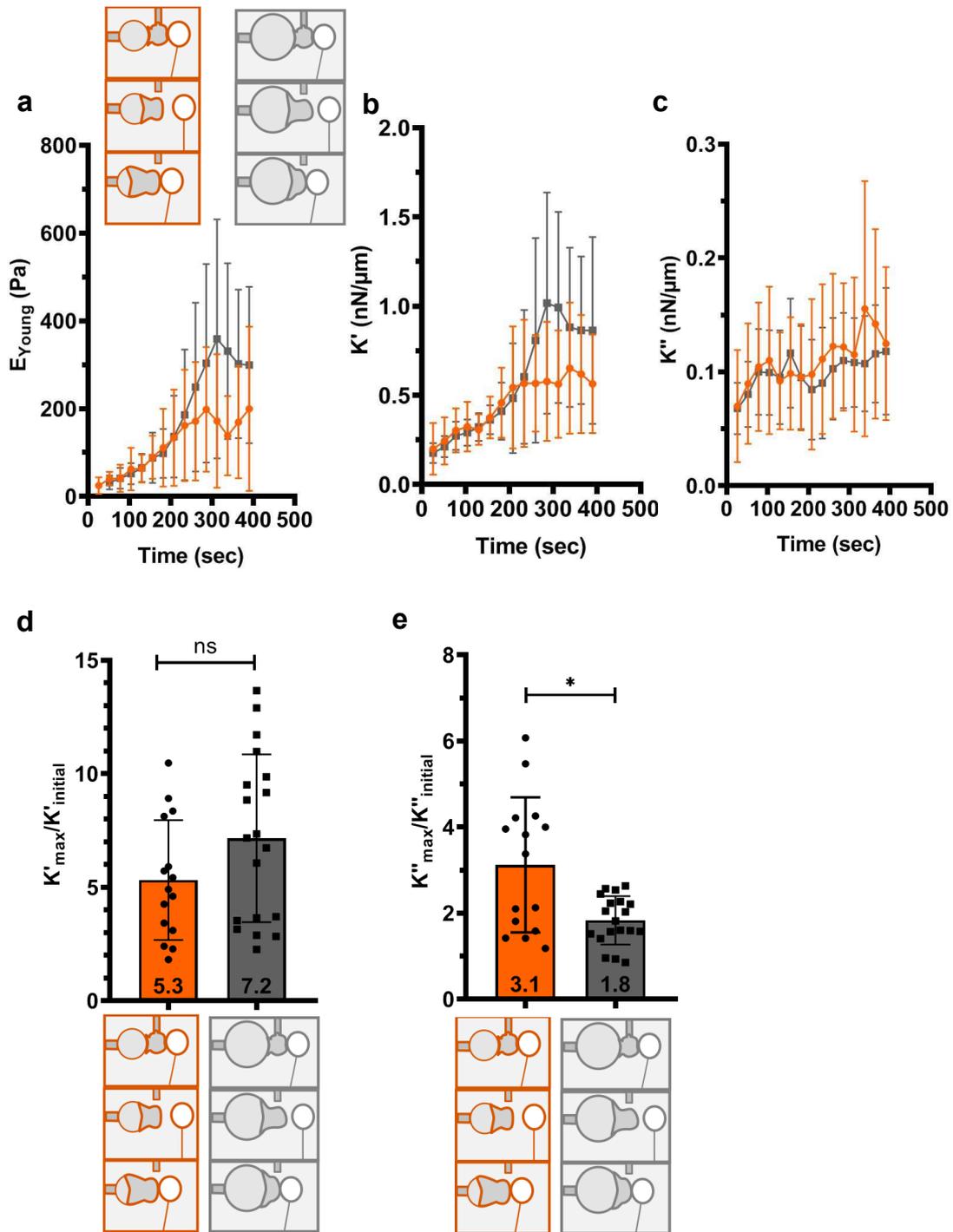


FIGURE 2.16 – Comparaison de l'évolution du module d'Young ( $E_{Young}$ ) et de  $K'$  et  $K''$  mesurés en configuration cycle-arrière du rhéomètre lors de la phagocytose frustrée et complète. a)  $E_{Young}$  augmente pendant la phagocytose complète (orange) et frustrée (gris). b-c) Augmentation de  $K'$  et  $K''$  pendant la phagocytose complète (orange) et frustrée (gris) d-e) Normalisation de valeur maximale de  $K'$  et  $K''$  par la valeur initiale pour chaque cellule. Les lignes épaisses représentent les moyennes et les barres d'erreur l'écart type. Les tests statistiques sont des tests Kolmogorov-Smirnov. Les données des billes de  $20 \mu\text{m}$  ont été réutilisées. Pour les billes de  $\phi = 20 \mu\text{m}$  :  $N=3$  expériences,  $n=19$  cellules. Pour les billes de  $\phi = 8 \mu\text{m}$  :  $N=3$  expériences,  $n=15$  cellules.

Comme lors de la réalisation de la phagocytose frustrée, nous pouvons quantifier le module de conservation ( $E'$ ) et le module de perte ( $E''$ ) pendant que la cellule réalise une phagocytose complète (figure 2.17a et b page suivante).  $E'$  et  $E''$  nous permettent de respectivement remonter à un module d'Young effectif ( $E_{Y_{oung}}^{Eq}$ ) et à une viscosité effective ( $\mu$ ).

Pour mesurer  $E_{Y_{oung}}^{Eq}$ , nous traçons  $E' = f(E_{Y_{oung}})$  et quantifions la pente  $C$  telle que  $E' = CE_{Y_{oung}}$  (figure 2.17c page suivante). Cette constante  $C$  est égal à 1,12 pendant la phagocytose frustrée et à 1,13 pendant la phagocytose complète. La relation entre  $E_{Y_{oung}}$  et  $E_{Y_{oung}}^{Eq}$  est alors similaire dans les expériences de phagocytose complète et frustrée dans la configuration arrière. Dans ces deux expériences, seule la taille de la bille est modifiée.  $E_{Y_{oung}}^{Eq}$  augmente davantage pendant la phagocytose frustrée que pendant la phagocytose complète (figure 2.17d page suivante), confirmant à nouveau la tendance observée avec  $K'$  et  $E_{Y_{oung}}$  :  $E_{Y_{oung}}^{Eq}$  augmente de  $11.2 \pm 4.5$  fois pendant la phagocytose complète et  $24.3 \pm 17.5$  fois pendant la phagocytose frustrée ( $p= 0.03$ ). Les cellules PLB deviennent donc plus rigides pendant la phagocytose frustrée que pendant la phagocytose complète.

$E''$  est utilisé pour quantifier une viscosité  $\mu$  (figure 2.17e et f page suivante). Comme attendu, nos conclusions sur  $K''$  avec la configuration cycle-arrière,  $\mu$  reste avec cette configuration très faible aussi bien pendant la phagocytose frustrée que celle totale. Ce comportement lié à la configuration cycle-arrière.

$E_{Y_{oung}}^{Eq}$  augmente davantage pendant la phagocytose frustrée que pendant la phagocytose complète (figure 2.17d et e page suivante). En effet,  $E_{Y_{oung}}^{Eq}$  augmente d'un facteur  $11.2 \pm 4.5$  pendant la phagocytose complète et d'un facteur  $24.3 \pm 17.5$  pendant la phagocytose frustrée ( $p= 0.03$ ). Les cellules PLB deviennent donc plus rigides pendant la phagocytose frustrée que pendant la phagocytose complète.

Cela confirme le résultat quantifié avec  $K'$  dans la configuration arrière : les cellules deviennent d'autant plus rigides que la bille à phagocyter est large.  $E''$  est utilisé pour quantifier une viscosité  $\mu$  (figure 2.17f et g page suivante). Dans la configuration cycle-arrière  $\mu$  reste très faible aussi bien pendant la phagocytose frustrée que celle totale. Ce comportement est relié à la configuration cycle-arrière et sera examiné dans la discussion.

## 2.4 Comparaison de la phagocytose frustrée et de la phagocytose complète

Les cellules PLB se comportent de manière indiscernable lorsqu'on leur présente des billes de 8 ou  $20\mu\text{m}$  entre le contact avec ces billes et le moment où elles commencent à former leur coupe. À ce moment, quelque soit le type de billes,  $K'$  et  $K''$  ont déjà augmenté par rapport à leur valeur initiale d'un facteur  $\sim 1.6$  (figure 2.18a et b page 92) . Jusqu'à ce point, le rapport  $\eta$  reste

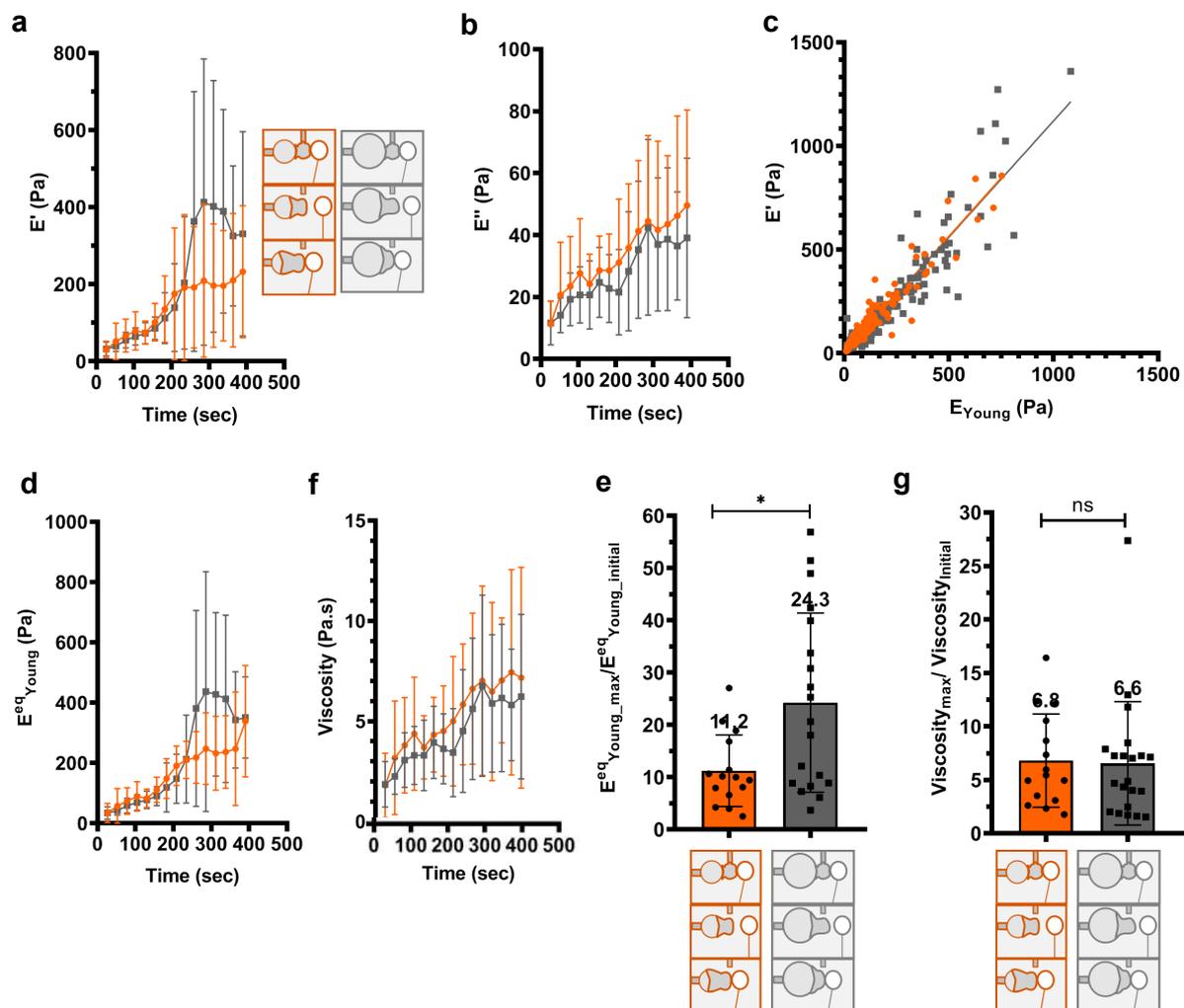


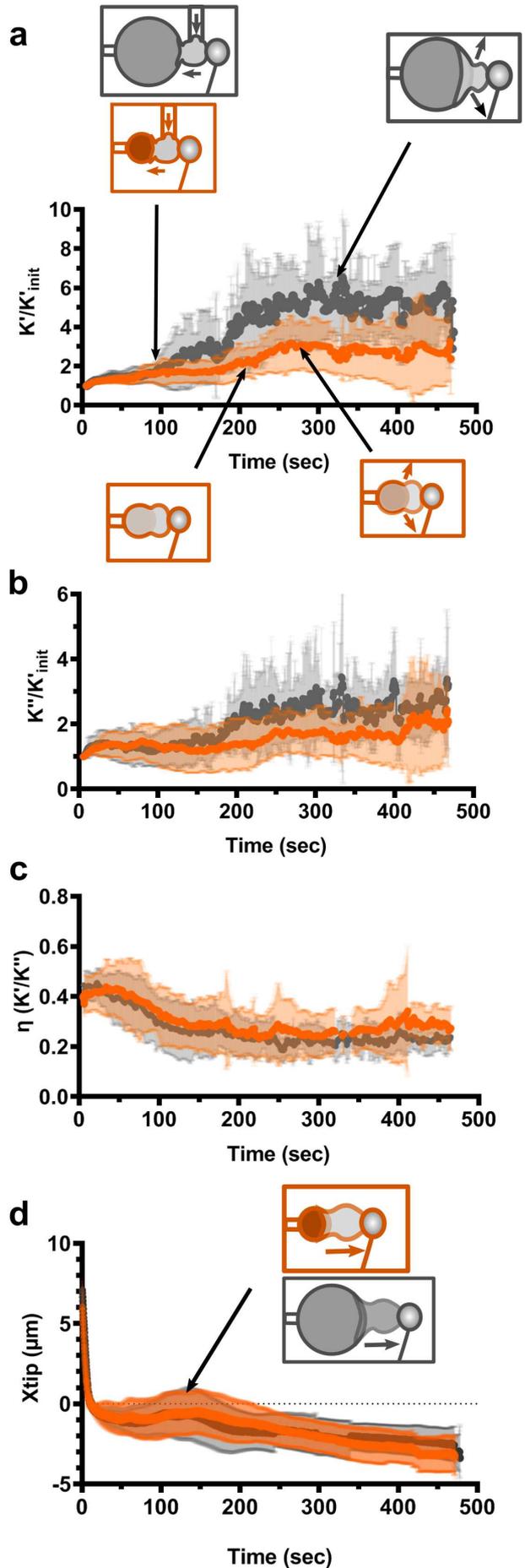
FIGURE 2.17 – Mesures du module d'Young effectif ( $E_{Young}^{Eq}$ ) et de la viscosité ( $\mu$ ). a-b) Évolution du module de conservation ( $E'$ ) et du module de perte ( $E''$ ) pendant la phagocytose complète (orange) et frustrée (gris).  $E'$  est utilisé pour c), la quantification de la constante C du module élastique ( $E'$ ) en fonction du module d'Young ( $E_{Young}$ ). C est calculé à l'aide des régressions linéaires des données de phagocytose complète (orange) ou frustrée (gris). d) Évolution de  $E_{Young}^{Eq}$  calculé grâce à C. e) Normalisation de  $E_{Young}^{Eq}$  avec les valeurs initiales. f) Évolution de la viscosité effective ( $\mu$ ) et g) normalisation des valeurs de  $\mu$  avec les valeurs initiales.

constant à  $\sim 0.4$  (figure 2.18c page suivante). Par ailleurs, ce moment où la coupe commence à se former est simultané avec (figure 2.14 page 85) : le début de la rétraction des cellules dans la micropipette, le début de l'allongement de la cellule (mesuré grâce à une variation de  $x_{tip}$ ), et le début d'une décroissance de  $\eta$ .

Pendant que la cellule s'étale sur la bille,  $K'$  et  $K''$  augmentent et leurs valeurs moyennes commencent à varier selon la taille de la bille.  $\eta$  qui, comme indiqué précédemment a commencé à diminuer, a la même valeur au cours du temps que ce soit sur bille de 8 ou 20  $\mu\text{m}$ . Les cellules s'allongent de la même manière sur les deux types de billes. Elles arrêtent de s'allonger au moment où  $\eta$  a atteint sa valeur minimale.

À partir de cette valeur minimale de  $\eta$ , le comportement des cellules peut être différencié selon la taille de la bille. Sur les billes de 8  $\mu\text{m}$ , la cellule ferme son phagosome, et  $K'$  comme  $K''$  continuent d'augmenter après cette fermeture.  $K'$  et  $K''$  atteignent leur maximum au moment où l'angle entre le corps cellulaire et la coupe phagocytaire disparaît pendant la phagocytose complète et frustrée. Le maximum atteint par  $K'$  et  $K''$  est plus élevé sur les billes de 20  $\mu\text{m}$  que sur les billes de 8  $\mu\text{m}$ .

FIGURE 2.18 – Comportements morphologiques et mécaniques entre phagocytose complète et frustrée. a-b) Évolution des valeurs de  $K'$  et de  $K''$  normalisées par la valeur initiale pendant la phagocytose complète (orange) et frustrée (gris). Les dessins représentent les morphologies décrites précédemment et les flèches indiquent le temps moyen où cet événement a lieu. c) Évolution de  $\eta$  ( $\frac{K''}{K'}$ ) pour la phagocytose complète (orange) et frustrée (gris). d) Évolution de  $x_{tip}$  pour la phagocytose complète (orange) et frustrée (gris). La valeur initiale de  $x_{tip}$  à  $6 \mu\text{m}$  est la position initiale du microindenteur où aucune contrainte n'est exercée à la cellule, le microindenteur avance ensuite vers la cellule. La valeur de  $x_{tip}$  est nulle quand celle-ci est en contact avec la cellule et commence à exercer une force de compression. Les dessins représentent l'allongement de la cellule qui est maximal là où  $x_{tip}$  est le plus important. Les lignes épaisses représentent les moyennes et les barres d'erreur l'écart type. Pour les billes de  $\phi = 8 \mu\text{m}$  (phagocytose complète) :  $N = 3$  expériences,  $n = 16$  cellules. Pour les billes de  $\phi = 20 \mu\text{m}$  (phagocytose frustrée) :  $N = 3$  expériences,  $n = 24$  cellules.



Nous avons vu que la phagocytose frustrée était limitée par la capacité de la cellule à s'étaler. Les dynamiques moyennes d'étalement de la phagocytose frustrée et complète (figure 2.19 de la présente page) décrivent une phase de croissance suivie d'un plateau : l'aire  $A$  est décrite par une évolution temporelle du type  $A_t = (A_0 - A_{max}) \times e^{(-t/\tau)} + A_{max}$  où  $A_{max}$  est la valeur de l'aire maximale (et donc finale);  $A_0$  est l'aire initiale correspondant au moment où la cellule n'a pas encore commencé à former le phagosome.  $\tau$  est le temps caractéristique d'étalement, nécessaire pour que les cellules atteignent 63 % de leur surface ajoutée (i.e.  $63\% \times (A_{max} - A_0)$ ) (figure 2.19b de la présente page). Nous avons mesuré  $\tau$  pour chacune des cellules pour lesquelles nous avons suivi d'étalement en fonction du temps. Le temps caractéristique  $\tau$  mesuré pendant la phagocytose frustrée et le même que celui mesuré pendant la phagocytose complète ( $p=0.59$ ) (figure 2.19b de la présente page).

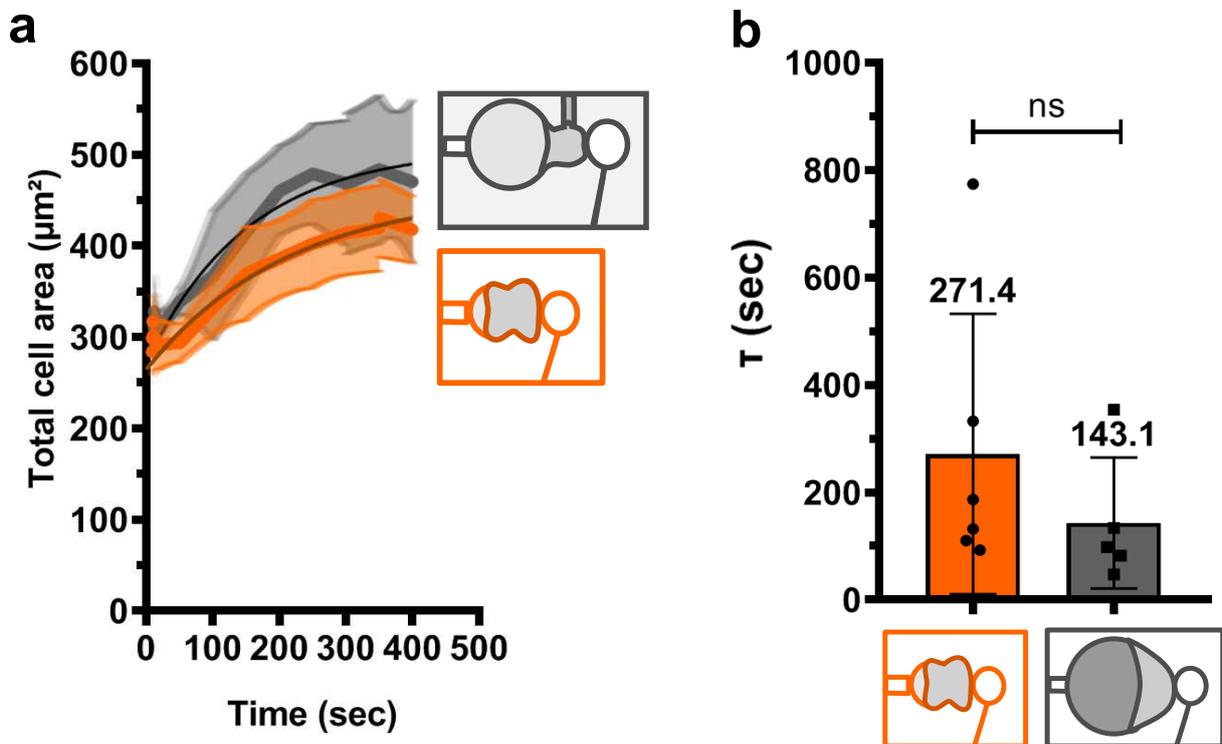


FIGURE 2.19 – Comparaison des aires totales des cellules PLB pendant la phagocytose complète et frustrée. a) Aire totale des cellules pendant la phagocytose complète (orange) ou frustrée (gris) en fonction du temps. Les courbes sont les régressions non linéaires de type  $A_t = (A_0 - A_{max}) \times e^{(-t/\tau)} + A_{max}$ . b)  $\tau$  est le temps caractéristique pour atteindre 63 % de  $A_{max}$  dans les courbes de l'aire totale en fonction du temps. Le test statistique est un test Kolmogorov-Smirnov. Pour les billes de  $\phi = 8 \mu\text{m}$  :  $N= 3$  expériences,  $n= 6$  cellules (a,b). Pour les billes de  $\phi = 20 \mu\text{m}$  :  $N= 3$  expériences,  $n= 6$  cellules (a,b).

## 2.5 Comparaison entre neutrophiles primaires humains et cellules PLB

Les résultats sur les cellules PLB nous indiquent un comportement mécanique de la lignée cellulaire PLB-985 que l'on différencie dans un phénotype de neutrophile. Nous avons voulu savoir si ces comportements mécaniques étaient retrouvés chez des neutrophiles primaires humains. Ces neutrophiles primaires ont été extraits du sang humain provenant de deux donneurs sains différents. L'extraction de ces cellules est détaillée dans la section 4. Avec ces cellules primaires, et pour tester notre hypothèse que ces cellules modifient aussi leurs propriétés visco-élastiques pendant la phagocytose frustrée ou complète, nous avons réalisé des expériences en utilisant deux configurations du rhéomètre. La configuration avant a été utilisée pour comparer le comportement mécanique des neutrophiles primaires avec celui des cellules PLB pendant la phagocytose frustrée. Pour la phagocytose complète, nous avons utilisé la configuration arrière du rhéomètre. Les expériences suivantes nous ont permis de décrire les similitudes et les différences de comportement mécanique pendant la phagocytose frustrée et complète de ces deux types cellulaires. Pour comparer les types cellulaires toutes choses égales par ailleurs, les billes utilisées sont les mêmes que celles utilisées dans la section des cellules PLB.

### 2.5.1 Pendant la phagocytose frustrée

Les neutrophiles primaires présentent une différence morphologique évidente : ils sont plus petits que les cellules PLB ( $232 \pm 35 \mu\text{m}^2$  contre  $314 \pm 31 \mu\text{m}^2$  pour les cellules PLB). Pendant la phagocytose frustrée, et comme les cellules PLB, les neutrophiles primaires augmentent leur aire. Les cellules PLB ont une phase latente où l'aire est stable puis augmente une fois que ces cellules commencent à former leur phagosome. Nous avons comparé le taux de croissance de l'aire totale qui est proche entre les deux types de neutrophiles : la régression linéaire suit  $A=0.3t+295.3$  pour les cellules PLB et  $A=0.4t+182.2$  pour les neutrophiles primaires où est A l'aire cellulaire (figure 2.20a page 96). La différence des pentes moyenne est non significative ( $p=0.47$ ).

Pendant la phagocytose frustrée, et à même configuration du rhéomètre donnée, les neutrophiles primaires modifient leurs propriétés mécaniques ; ils augmentent leur  $K'$  d'un facteur de  $8.1 \pm 4.6$  (contre  $8,3 \pm 3,2$  pour les cellules PLB) et  $K''$  d'un facteur de  $3.0 \pm 1.7$  (contre  $3,2 \pm 1,3$  pour les cellules PLB). L'évolution de  $K'$  et de  $K''$  des neutrophiles primaires est donc remarquablement proche de l'évolution des cellules PLB ( $p=0.14$ ) (figure 2.20b et c).

$\eta$  diffère entre les neutrophiles primaires et les cellules PLB :  $\eta$  a une valeur initiale  $\eta_{initial} = 0.63 \pm 0.06$  qui est significativement plus élevée ( $p=0.012$ ) pour les PLB que pour les neutrophiles primaires pour lesquels  $\eta_{initial} = 0.46 \pm 0.08$ . La valeur finale  $\eta_{final}$  pour les cellules PLB est aussi deux fois plus élevée ( $p=0.017$ ) que pour les neutrophiles primaires ( $\eta_{final} = 0.32$

$\pm 0.09$  contre  $0.17 \pm 0.08$ ). Nous avons comparé le taux de décroissance de la valeur moyenne de  $\eta$ . Malgré des niveaux absolus différents, les taux de décroissance  $\eta$  pendant la phagocytose frustrée sont identiques ( $p=0.21$ ) entre les deux types de neutrophiles, indiquant que la diminution de  $\eta$  suit la même décroissance dans les deux cas ( $\eta=-0.0008t+0.59$  pour les cellules PLB et  $\eta=-0.0011t+0.48$  pour les neutrophiles primaires).

Lorsque les neutrophiles et les cellules PLB réalisent une phagocytose frustrée,  $K'$  ainsi que  $K''$  augmentent en fonction de l'aire totale déployée. Cette augmentation est linéaire jusqu'à atteindre un plateau puis décroît dans le cas des neutrophiles primaires et se stabilise dans le cas des cellules PLB (figure 2.21 page 97). Pour  $K'$  comme pour  $K''$ , le taux de croissance en fonction de l'aire est plus élevé pour les neutrophiles primaires que pour les cellules PLB :  $K'=0.07A-14.32$  et  $K''=0.011A-2.1$  pour neutrophiles primaires et  $K'=0.02A-5.4$  et  $K''=0.004A-0.96$  pour les cellules PLB où  $A$  est l'aire totale de la cellule. Les différences ne sont pas significatives, et nécessitent des statistiques plus fournies.

Lorsque les neutrophiles et cellules PLB réalisent une phagocytose frustrée,  $K'$  et  $K''$  augmentent linéairement avec l'aire totale déployée jusqu'à atteindre un maximum et décroître dans le cas des neutrophiles primaires, ou atteindre un plateau dans le cas des cellules PLB (figure 2.21 page 97). Pour  $K'$  comme pour  $K''$ , le taux de croissance en fonction de l'aire pendant la phase linéaire est plus élevé pour les neutrophiles primaires que pour les cellules PLB :  $K'=0.07A-14.32$  et  $K''=0.011A-2.1$  pour neutrophiles primaires et  $K'=0.02A-5.4$  et  $K''=0.004A-0.96$  pour les cellules PLB où  $A$  est l'aire totale de la cellule. Si la différence semble notable (figure 2.21 page 97), les différences ne sont pourtant pas statistiquement significatives, et nécessiteraient des statistiques plus fournies pour confirmer cette différence.

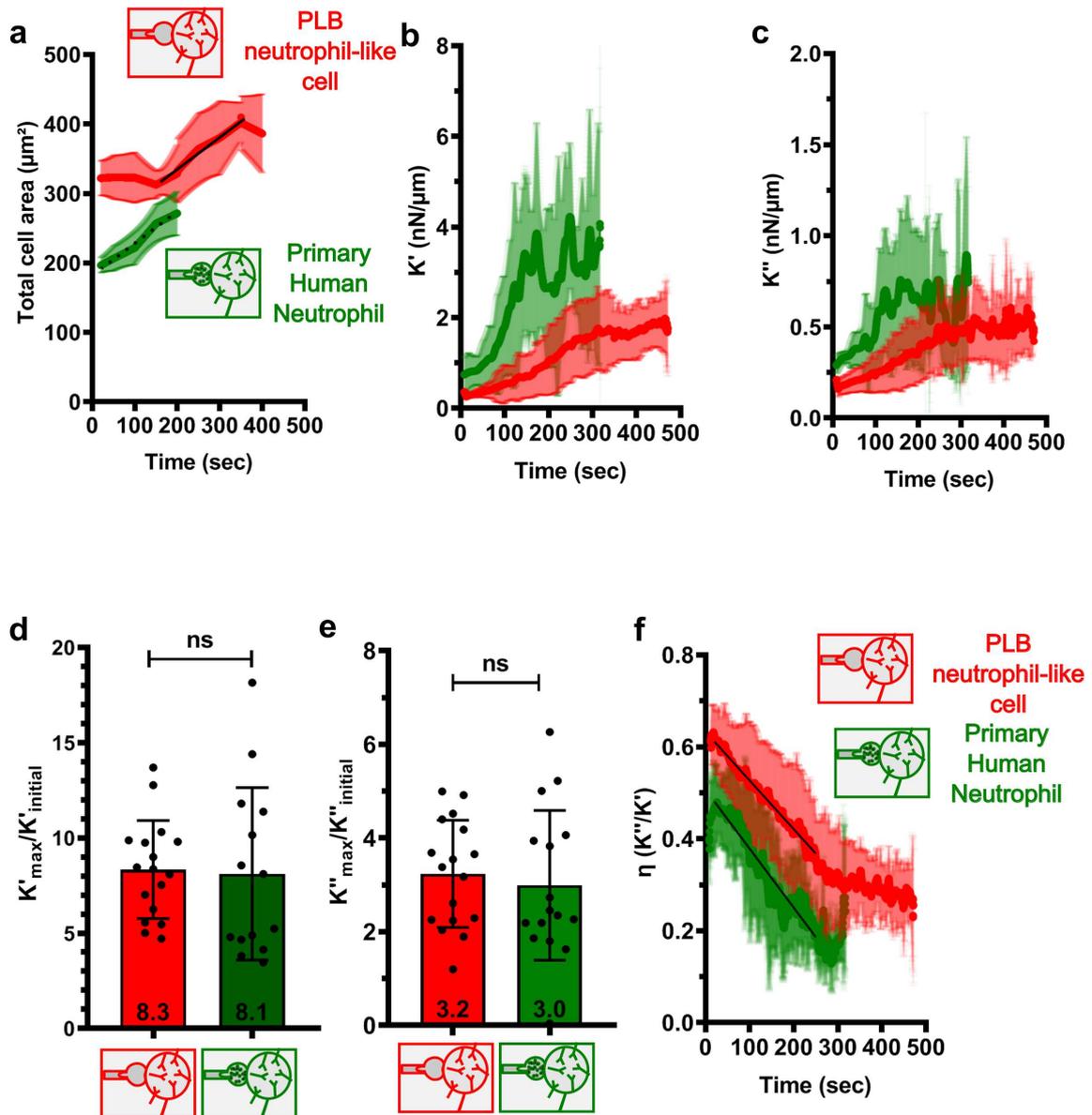


FIGURE 2.20 – Comparaison mécanique entre les cellules PLB et les neutrophiles primaires humains pendant la phagocytose frustrée. Les lignes noires (en pointillé pour les neutrophiles primaires et en trait plein pour les cellules PLB) sont les régressions linéaires des moyennes. a) Évolution des aires totales des neutrophiles primaires (vert) et des cellules PLB (rouge). b) Évolution de  $K'$  avec les billes couvertes d'IgG pour les cellules PLB (rouge) et pour les neutrophiles primaires humains (vert). c) Évolution de  $K''$  pendant la phagocytose frustrée pour les cellules PLB (rouge) et pour les neutrophiles primaires humains (vert). d) Normalisation de la valeur maximale de  $K'$  par la valeur initiale de chaque cellule. e) Normalisation de la valeur maximale de  $K''$  par la valeur initiale de chaque cellule. Les lignes épaisses des normalisations représentent les moyennes et les barres d'erreurs sont la déviation standard. f) Évolution temporelle de  $\eta$  pour les cellules PLB (rouge) et pour les neutrophiles primaires humains (vert). Les lignes noires sont les régressions linéaires des moyennes. Les données des cellules PLB ont été réutilisées de la figure 2.6 page 69. Pour les cellules PLB : N= 3 expériences, n= 17 cellules. Pour les neutrophiles primaires : N= 2 expériences, n=15 cellules.

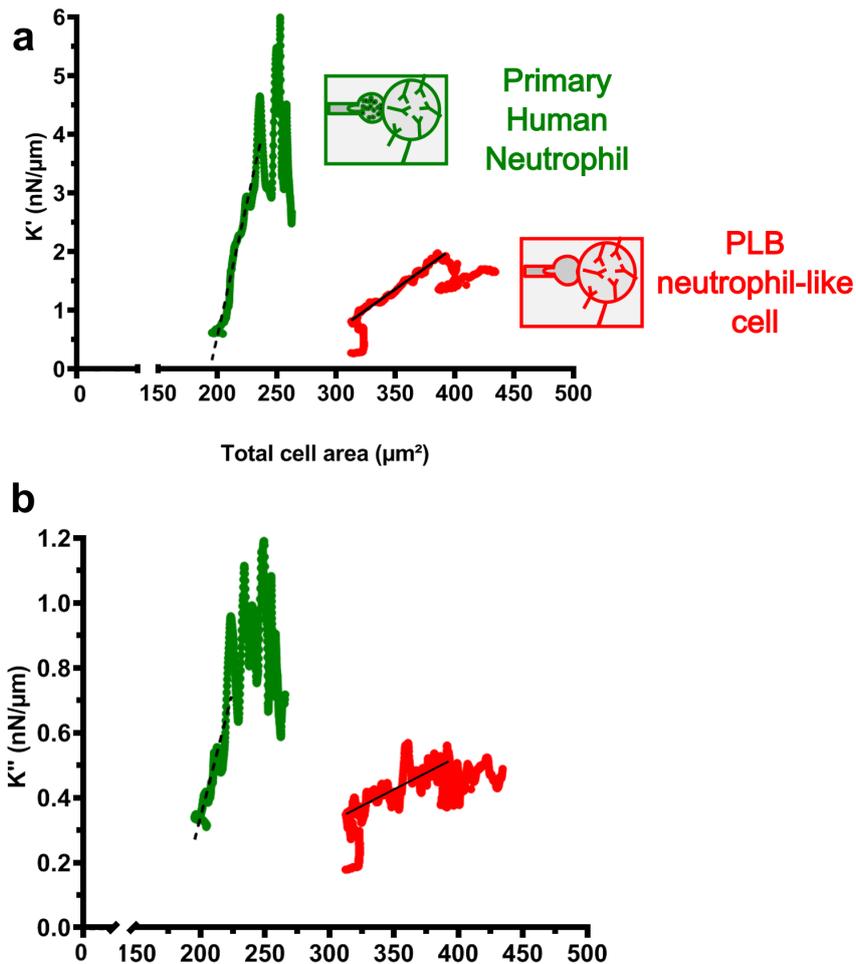


FIGURE 2.21 – Évolution de  $K'$  et de  $K''$  en fonction des aires totales pendant la phagocytose frustrée. a) Moyenne de  $K'$  en fonction de l'aire totale moyenne des neutrophiles primaires (vert) et des cellules PLB (rouge). Les droites noires sont les régressions linéaires. b) Moyenne de  $K''$  en fonction de l'aire totale moyenne des neutrophiles primaires (vert) et des cellules PLB (rouge). Les droites noires sont les régressions linéaires pour les neutrophiles primaires (en pointillé) et pour les cellules PLB (droite pleine). Pour les neutrophiles primaires ainsi que pour les cellules PLB :  $N=3$  expériences,  $n=6$  cellules.

## 2.5.2 Pendant la phagocytose complète

Pendant la phagocytose totale, les neutrophiles primaires et les cellules PLB s'étalent à la même vitesse en fonction du temps (figure 2.22a page 99). Comme pour les cellules PLB,  $K'$  et  $K''$  augmentent pendant la phagocytose complète, mais dans le cas des neutrophiles primaires,  $K'$  et  $K''$  atteignent des valeurs en moyenne 1.4 fois plus élevées (figure 2.22b et c page 99). Une différence notable entre les neutrophiles primaires et les cellules PLB apparaît pendant la

phagocytose complète : les valeurs maximales des neutrophiles primaires de  $K'$  et de  $K''$  correspondent au moment où les cellules ferment leur phagosome alors que pour les cellules PLB,  $K'$  et  $K''$  continue à augmenter après cette fermeture. Pour les neutrophiles primaires,  $K'$  et  $K''$  diminuent fortement après avoir atteint ce maximum (figure 2.22b page suivante).

Comme dans la phagocytose complète,  $\eta$  diminue en fonction du temps. Cependant, ici les neutrophiles primaires ont une valeur absolue plus élevée que les cellules PLB ; ce qui est l'opposé que ce nous observons pendant la phagocytose frustrée. Même si  $\eta$  diminue avec le temps, nous n'avons pas établi de relation claire sur le taux de décroissance de cette quantité.

Pour les neutrophiles primaires et les cellules PLB réalisant une phagocytose complète,  $K'$  ainsi que  $K''$  augmentent en fonction de l'aire totale de la cellule. Les taux de croissance de  $K'$  et  $K''$  augmentent de manière identique dans les deux types de neutrophiles :  $K' = 0.018A - 4.1$  et  $K'' = 0.003A - 0.65$  pour les neutrophiles primaires et  $K' = 0.018A - 6.4$  et  $K'' = 0.003A + 1.03$  pour les cellules PLB où  $A$  est l'aire totale de la cellule (figure 2.23 page 100). Ces taux sont identiques ( $p = 0.47$ ). Ce résultat semble contredire le taux de croissance de  $K'$  et de  $K''$  en fonction de l'aire totale pendant la phagocytose frustrée où les neutrophiles primaires ont une tendance à davantage augmenter leur  $K'$  en fonction de l'aire comparativement aux cellules PLB.

Pour les neutrophiles primaires et les cellules PLB réalisant une phagocytose complète,  $K'$  et  $K''$  augmentent linéairement avec l'aire totale de la cellule, avec un taux identique ( $p = 0.47$ ) pour les deux types de neutrophiles :  $K' = 0.018A - 4.1$  et  $K'' = 0.003A - 0.65$  pour les neutrophiles primaires et  $K' = 0.018A - 6.4$  et  $K'' = 0.003A + 1.03$  pour les cellules PLB, où  $A$  est l'aire totale de la cellule (figure 2.23 page 100). Ce résultat semble contredire le résultat obtenu pour la phagocytose frustrée, pendant laquelle  $K'$  et  $K''$  ont tendance à augmenter plus fortement en fonction de l'aire pour les neutrophiles primaires que pour les cellules PLB (en rappelant cependant que cette différence n'était pas statistiquement significative étant donné nos petites statistiques).

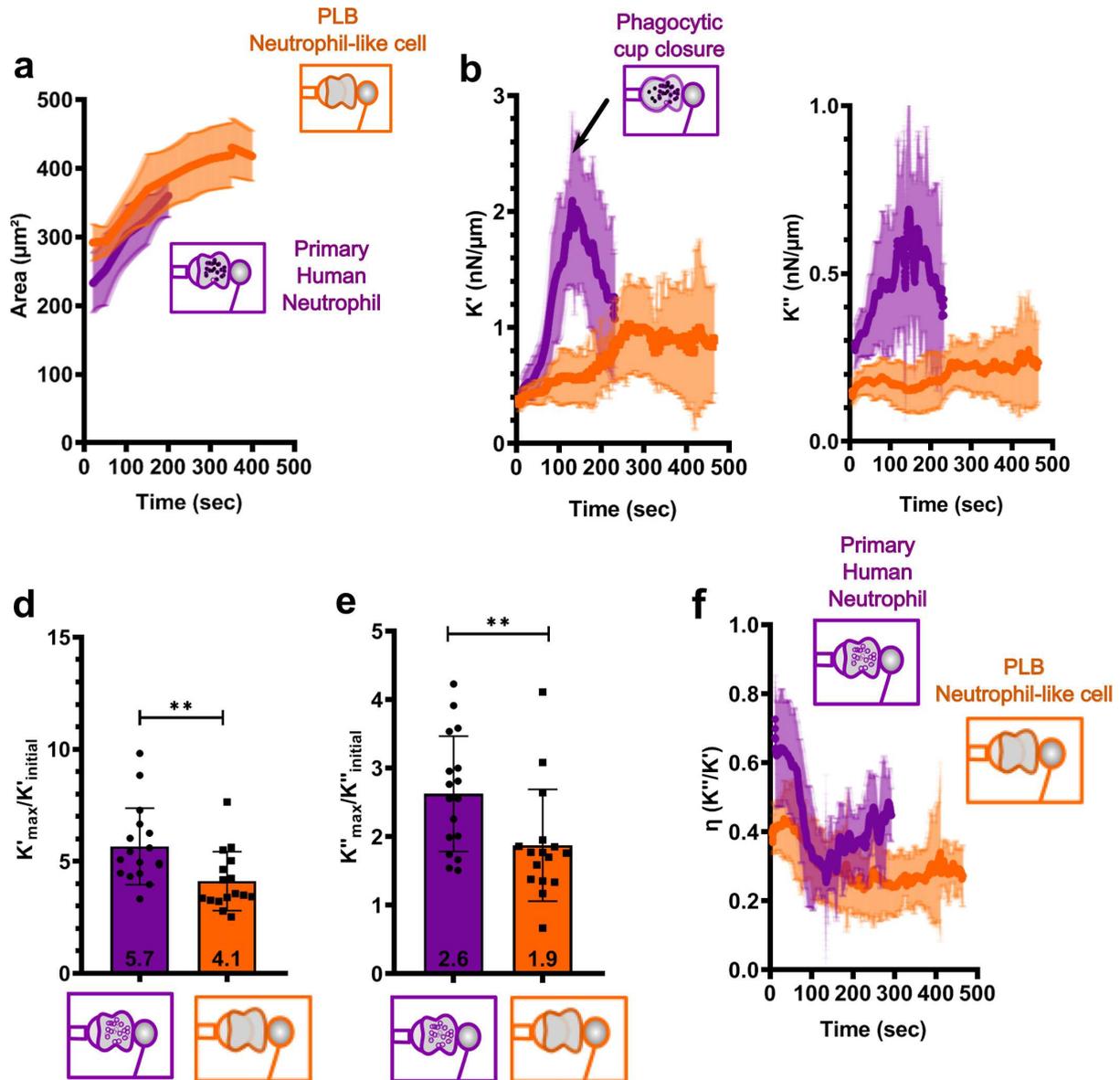


FIGURE 2.22 – Comparaison mécanique entre les cellules PLB et les neutrophiles primaires humains pendant la phagocytose frustrée. a) Évolution des aires totales des neutrophiles primaires (violet) et des cellules PLB (orange). b) Évolution de  $K'$  avec les billes couvertes d'IgG pour les cellules PLB (rouge) et pour les neutrophiles primaires humains (vert). c) Évolution de  $K''$  pendant la phagocytose frustrée pour les cellules PLB (rouge) et pour les neutrophiles primaires humains (vert). d) Normalisation de la valeur maximale de  $K'$  par la valeur initiale de chaque cellule. e) Normalisation de la valeur maximale de  $K''$  par la valeur initiale de chaque cellule. Les lignes épaisses des normalisations représentent les moyennes et les barres d'erreurs sont la déviation standard. Les données des cellules PLB ont été réutilisées de la figure 2.6. f) Évolution temporelle de  $\eta$  pour les cellules PLB (rouge) et pour les neutrophiles primaires humains (vert). Pour les cellules PLB :  $N=3$  expériences,  $n=17$ . Pour les neutrophiles primaires :  $N=2$  expériences,  $n=15$  cellules.

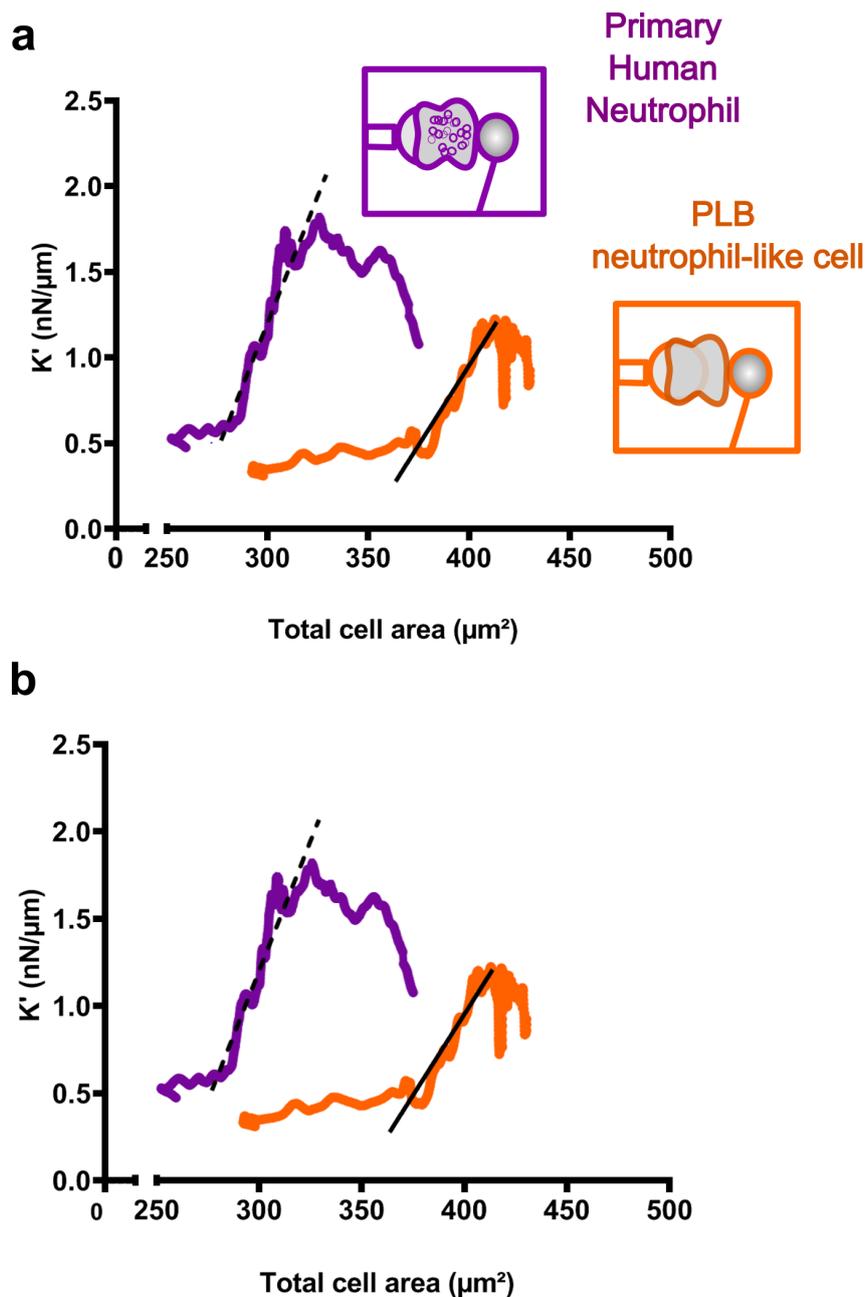


FIGURE 2.23 – Évolution de  $K'$  et de  $K''$  en fonction des aires totales pendant la phagocytose complète. a) Moyenne de  $K'$  en fonction de l'aire totale moyenne des neutrophiles primaires (violet) et des cellules PLB (orange). b) Moyenne de  $K''$  en fonction de l'aire totale moyenne des neutrophiles primaires (violet) et des cellules PLB (orange). Les droites noires sont les régressions linéaires pour les neutrophiles primaires (en pointillé) et pour les cellules PLB (droite pleine). Pour les neutrophiles primaires ainsi que pour les cellules PLB :  $N=3$  expériences,  $n=6$  cellules.

## 2.6 Conclusion

Nous proposons ici un petit résumé de nos résultats de ce chapitre 2.

Pendant la phagocytose frustrée ainsi que pendant celle complète, les neutrophiles deviennent plus rigides et plus visqueux. Ils modifient d'autant plus leurs propriétés viscoélastiques que la bille à phagocyter opsonisée avec des IgG a diamètre plus grand. La phagocytose frustrée requiert le déploiement de 30% d'aire supplémentaire par rapport à un étirement passif. La taille de la bille n'impacte pas le temps que les cellules mettent à former leur coupe phagocytaire, et l'évolution de  $K'$  et de  $K''$  pour ce changement morphologique est la même sur les petites ou les billes plus larges. Les changements morphologiques sont corrélés aux évolutions de  $K'$  et de  $K''$ . Les valeurs maximales de  $K'$  et de  $K''$  correspondent à la disparition de l'angle entre la coupe phagocytaire et le corps cellulaire. Ceci est vrai à une exception près : la valeur maximale des neutrophiles primaires pendant la phagocytose correspond à la fermeture du phagosome.

Pour les cellules PLB,  $\eta$  reste stable et suit la même évolution pendant la phagocytose frustrée et celle complète indiquant que le rapport de  $K''$  et de  $K'$  n'est pas impacté par la taille de la bille.

Même si la différence est non significative étant donné nos faibles statistiques, le taux de croissance de  $K'$  et  $K''$  en fonction de l'aire totale semble plus élevé pour les neutrophiles primaires que pour les cellules PLB pendant la phagocytose frustrée. Ce résultat semble contradictoire avec le comportement observé lors de la phagocytose complète où  $K'$  et  $K''$  augmentent selon le même taux en fonction de l'aire totale. Lever cette contradiction nécessiterait probablement un nombre de cellules plus élevé.

## 3 Discussion

### 3.1 Comportement des propriétés viscoélastiques des neutrophiles pendant la phagocytose complète et frustrée

Nous observons une augmentation de  $K'$  et de  $K''$  pendant la phagocytose complète et frustrée. Nous avons montré que l'évolution de ces quantités reflète des changements de module d'Young ( $E_{Young}$ ) et de viscosité ( $\mu$ ), c'est-à-dire que les propriétés viscoélastiques intrinsèques des neutrophiles (indépendantes de leur géométrie) évoluent pendant la phagocytose. D'autres équipes ont réalisé des observations auxquelles nous pouvons comparer nos résultats.

L'équipe de V. Heinrich a utilisé un dispositif basé sur l'utilisation de micropipettes qui permet de maintenir un neutrophile et de lui présenter une cible à phagocyter [Herant et al., 2005, Lee et al., 2011b]. Ces auteurs utilisent la loi de Laplace qui décrit comment la pression évo-

lue de part et d'autre d'une interface entre deux fluides en présence d'une tension de surface (technique expliquée en détails dans l'introduction de ce chapitre). V. Heinrich et ses collaborateurs mesurent ainsi une tension cellulaire (qu'ils dénomment tension corticale  $\gamma$ ). Une relation simple peut être établie entre  $K'$  et la tension cellulaire [Cartagena-Rivera et al., 2016] :  $K' = \pi\gamma_{cell}$ . La tension cellulaire maximale mesurée par l'équipe de V. Heinrich est de  $\sim 0.3$  nN/ $\mu\text{m}$  pour les neutrophiles humains qui ont phagocyté une bille de  $5 \mu\text{m}$  de diamètre en polystyrène opsonisée avec des IgG. Cette valeur revient à une valeur de  $K'$  de  $0.9$  nN/ $\mu\text{m}$ , cohérente avec nos mesures où  $K'_{max}=1.3$  nN/ $\mu\text{m}$  pour les cellules PLB et  $K'_{max}=2.3$  nN/ $\mu\text{m}$  pour les neutrophiles primaires qui ont phagocyté une bille de  $8 \mu\text{m}$ .

Irmsher et ses collaborateurs ont étudié la rigidité de la coupe phagocytaire de macrophages pendant la phagocytose [Irmsher et al., 2013] de billes magnétiques de  $4,5 \mu\text{m}$  de diamètre opsonisées avec des IgG. Les auteurs ont déposé ces billes sur des macrophages THP-1 adhérents à une surface de verre. En appliquant un champ magnétique oscillant, les auteurs provoquent une oscillation des billes magnétiques en translation et en rotation pendant que la cellule phagocyte. Les oscillations sont mesurées pendant que la cellule phagocyte la bille grâce au suivi de nanoparticules fluorescentes présentes à la surface de la bille. En mesurant le couple magnétique exercé sur ces billes et le mouvement résultant, les auteurs mesurent une rigidité de torsion (en Nm/rad) et une rigidité de translation (en Pa/m). Les auteurs ont normalisé l'évolution de la rigidité de translation par sa valeur initiale et ont conclu que cette rigidité augmentait avec un taux de  $0,005 s^{-1}$ . Si nous normalisons de même l'évolution de  $E_{Young}$  pendant la phagocytose complète, nous retrouvons le même ordre de grandeur :  $E_{Young}$  évolue de  $0,004s^{-1}$ . Si nous normalisons de même l'évolution de  $E_{Young}$  pendant la phagocytose complète, nous retrouvons un taux très proche :  $E_{Young}$  évolue de  $0,004s^{-1}$ .

L'équipe de V. Heinrich a également étudié l'effet de la taille de la cible sur l'évolution de la tension corticale d'un phagocyte [Lee et al., 2011b]. Les auteurs ont opsonisé des billes de polystyrène de  $3$  et de  $5 \mu\text{m}$  de diamètre avec des IgG et étudié leur phagocytose par des neutrophiles humains primaires. Les auteurs ont mesuré un pic de tension cellulaire pendant la phagocytose. Ce pic est plus important pour des billes de  $5 \mu\text{m}$  que pour des billes de  $3 \mu\text{m}$ . Dans une autre étude de cette équipe [Herant et al., 2005], des courbes individuelles montrent que dans les neutrophiles qui phagocytent une bille (toujours en polystyrène et opsonisée avec des IgG) de  $11 \mu\text{m}$  de diamètre, l'augmentation de tension cellulaire est plus élevée ( $\gamma_{cellmax}=0,3$  mN/m) que dans les neutrophiles qui phagocytent une bille de  $2 \mu\text{m}$  de diamètre ( $\gamma_{cellmax}=0,002$  mN/m). Si l'évolution temporelle de la tension corticale selon la taille de la bille n'est pas le centre de cet article, les résultats montrés suggèrent néanmoins que l'évolution de la tension cellulaire dépend effectivement de la taille de la bille. Nos mesures d'augmentation de  $K'$  sont cohérentes avec ces mesures :  $K'$  a une valeur maximale d'autant plus élevée que la bille est

large.

Un point délicat nous est apparu quand nous avons observé que l'évolution des propriétés viscoélastiques des neutrophiles dépendait de la taille de la bille phagocytée. Les billes que nous avons utilisées sont opsonisées avec des IgG. Nous ne pouvons pas affirmer que la concentration des IgG à la surface des billes est identique entre les billes de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre et celles de 8  $\mu\text{m}$ . Si la concentration d'IgG à la surface est différente entre les deux tailles de billes : nous mesurons alors l'effet de la taille de la bille et celui de la concentration en IgG à la surface des billes sur l'évolution des propriétés viscoélastiques des neutrophiles. D. Kovari et ses collaborateurs ont montré que la densité d'IgG n'influe pas sur la vitesse d'étalement ni sur l'aire maximale de macrophages pendant la phagocytose frustrée sur des surfaces planes [Kovari et al., 2016a]. La différence de densité des IgG n'influe que sur la rapidité des macrophages à débiter une coupe phagocytaire. Si la densité d'IgG est différente sur nos deux tailles de billes, le délai de début de formation de la coupe phagocytaire devrait être différent sur les billes de 20 et de 8  $\mu\text{m}$  de diamètre, or il est identique : nous obtenons un délai de  $82 \pm 36$  s sur les billes de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre et de  $88 \pm 44$  s sur les billes de 8  $\mu\text{m}$  de diamètre ( $p=0.99$ ). Nous avons utilisé une concentration de 7  $\mu\text{g/mL}$  d'anticorps anti-BSA pour opsoniser nos billes. Cette concentration se trouve dans la gamme de densité d'IgG mesurée dans l'article de D.T. Kovari et ses collègues (leur gamme va de 0.15, 1.5, 15 à 150  $\mu\text{g/mL}$ ). Selon cette étude [Kovari et al., 2016a], nous pouvons faire l'hypothèse que la simultanéité de création de la coupe phagocytaire des neutrophiles suggère que la densité des IgG est identique sur les deux tailles de billes. Si cette hypothèse est valable, c'est bien la taille (et/ou la courbure) de la bille qui fait évoluer les propriétés viscoélastiques des neutrophiles.

Les cellules PLB atteignent la même aire finale sur les surfaces planes que sur les billes de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre, suggérant que la courbure de ces billes n'a pas d'effet sur l'aire finale d'étalement de ces cellules. Cependant, nous n'avons pas mesuré l'évolution des propriétés viscoélastiques des cellules s'étalant sur les surfaces planes. Nous ne pouvons alors pas exclure que la courbure du substrat n'influe pas sur l'évolution des propriétés viscoélastiques des cellules.

Dans notre étude, la valeur maximale de  $K'$  correspond à la fois à la perte de l'angle entre la coupe phagocytaire et le corps cellulaire et ce pendant la phagocytose complète comme frustrée ; à l'exception près des neutrophiles primaires pour qui  $K'$  est maximal lors de la fermeture du phagosome. Comme discuté précédemment, cette augmentation de  $K'$  traduit une augmentation de tension cellulaire. Nous n'avons pas mesuré directement les forces générées par la cellule mais spéculons que ce pic de tension cellulaire se traduit par une traction maximale de la cellule sur sa cible. D'autres études ont directement quantifié la traction exercée par des phagocytes sur leur substrat grâce à la technique de Traction Force Microscopy TFM : D. Kovari et al. [Kovari et al., 2016a] ont mesuré les contraintes exercées par des macrophages

THP-1 sur un substrat plan recouvert d'IgG.

Ces contraintes sont maximales peu de temps avant que la cellule n'atteigne son étalement maximal. Ce comportement cohérent avec nos mesures suggère qu'atteindre la valeur maximale de la tension cellulaire signifie que l'étalement cellulaire va s'arrêter. La tension cellulaire ( $K'$ ) ainsi que  $K''$  diminuent ensuite de 40% une minute après le pic de ces quantités.

L'équipe de V. Heinrich prouve que la tension cellulaire est maximale juste avant que le phagosome ne se ferme [Herant et al., 2005, Herant et al., 2006]. Ce résultat est cohérent avec nos quantifications de  $K'$  des neutrophiles primaires pendant la phagocytose complète. Cependant, pour les cellules PLB, nous observons que  $K'$  est maximal quand l'angle entre le lamellipode et le corps cellulaire a disparu, donc après que la cellule n'ait formé la coupe phagocytaire.

Un changement d'angle entre le lamellipode et le corps cellulaire est aussi expliqué comme étant lié à un changement de tension corticale dans une étude de Fouchard et al. [Fouchard et al., 2014] où des fibroblastes adhérant s'étalent entre deux microplaques de verre. Les fibroblastes forment alors un angle  $\theta$  caractéristique entre le corps cellulaire et le lamellipode qui est d'abord inférieur à  $90^\circ$ . Quand la cellule s'étale davantage,  $\theta$  dépasse  $90^\circ$  et à partir de cet angle la cellule exerce une force de traction sur les microplaques [Fouchard et al., 2014].

Ce comportement pourrait qualitativement être le même dans le cas de la phagocytose : la force exercée par la cellule sur sa cible est faible et augmente brusquement au moment où cet angle entre corps cellulaire et lamellipode disparaît.

$K''$  évolue pendant la phagocytose frustrée. Nous avons quantifié l'augmentation de  $K''$  pour les cellules PLB comme étant identique entre la configuration arrière et avant. L'évolution de  $K''$  montre une dépendance à la taille de la bille. Ceci est vrai dans la configuration arrière et ce comportement n'est pas observé dans la configuration cycle-arrière. En effet, l'évolution de  $K''$  et, par extension, du module de perte  $E''$  et de la viscosité effective  $\mu$ , restent stables et leurs évolutions sont identiques pendant la phagocytose frustrée et complète. Dans la configuration arrière, la cellule n'est pas continûment indentée. La perte de compression de la cellule est, à notre sens, la seule différence entre la configuration arrière et celle cycle-arrière qui pourrait expliquer la stabilité de  $K''$ . Pour comprendre ce phénomène, nous proposons de réduire la durée entre chaque cycle. Ceci pourrait éventuellement mettre en lumière une dépendance de la viscosité au temps que la cellule a entre la perte de contact avec le microindenteur et la force compressive qui lui sera imposée au cycle suivant.

### **3.2 Mesure des stocks membranaires des cellules PLB**

Nous avons mesuré la surface maximale que les cellules PLB peuvent déployer par aspiration passive des neutrophiles en utilisant l'iodure de propidium comme indicateur de rupture

membranaire. Ces cellules s'étirent de 70% par rapport à leur surface initiale avant de rompre leur membrane. Shao et al. ont mesuré la densité de microvillis à la surface de neutrophiles par microscopie électronique à balayage, obtenant une estimation de 4 à 6 microvillis par  $\mu\text{m}$ . Les auteurs ont par ailleurs estimé que chaque microvilli a une surface moyenne de  $0.25\mu\text{m}^2$  [Shao et al., 1998], d'où une surface apparente pour un neutrophile au repos de  $227\mu\text{m}^2$ , ce qui est très cohérent avec nos mesures des aires initiales des neutrophiles primaires de  $232 \pm 35\mu\text{m}^2$ . En considérant une densité de 4 à 6 microvillis par  $\mu\text{m}^2$ , nous obtenons des réservoirs de surface contenus dans les microvillosités correspondant à une surface de 227 à  $340\mu\text{m}^2$ , soit entre 100% et 150 % de la surface apparente d'un neutrophile au repos. Une capacitance de 2.96 pF a été mesurée sur des neutrophiles primaires, ce qui correspond à une surface de  $296\mu\text{m}^2$  [Nusse and Lindau, 1988], soit 78 % de surface en plus de surface que l'aire que nous avons mesurée. Les neutrophiles primaires contiennent dans leurs microvillosités une surface similaire à leur surface initiale. Cela veut dire qu'ils peuvent presque doubler leur surface en consommant ces repliements membranaires. Nous avons mesurés que les cellules PLB peuvent déployer 70 % de leur surface initiale. Cette extension passive pourrait coïncider avec le déploiement des microvillosités.

## 4 Matériel et Méthodes

### 4.1 Les cellules

#### 4.1.1 Les cellules PLB

La lignée cellulaire de leucémie myéloïde aigüe (PLB985) est une lignée non adhérente. Cette lignée provient d'une femme de 38 ans qui a développé une leucémie aigüe non lymphocytaire. Elle a été cultivée dans le milieu de culture RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 1X GlutaMAX (Gibco) supplémenté avec 10 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF) décomplémenté à  $56^\circ\text{C}$  pendant 30 min et 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco). Le milieu de culture a ensuite été filtré avec un filtre présentant des pores de  $0.22\mu\text{m}$  de diamètre (MerckMillipore). Le milieu de culture a été conservé à  $4^\circ\text{C}$ . Les cellules ont été passées deux fois par semaine en les ramenant à une concentration de  $2.10^6$  cellules/mL. Une fois le passage réalisé, nous les avons différenciées en phénotype de neutrophiles en ajoutant 1.25% (v/v) de Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) à la suspension cellulaire. Les 1.25% de DMSO ont été ajoutés le premier jour après le passage et une seconde fois trois jours après le passage. Les cellules ont un phénotype proche des neutrophiles 5 à 6 jours après le premier ajout de DMSO. Vingt-quatre heures avant chaque expérience,  $2000\text{U/mL}$  d'interféron  $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) (Immuno Tools) ont été ajoutées.

Vingt-quatre heures avant de commencer l'expérience, les cellules PLB différenciées en neutrophiles ont été centrifugées 3 min à 300g et resuspendues dans le milieu d'expérimentation contenant 140 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de CaCl<sub>2</sub>, 10 mM de HEPES (pH 7.4), 1.8 mg/mL glucose, et 1% de SVF décomplémenté dans du tampon HEPES. Ce milieu d'expérimentation est aussi filtré avec un filtre contenant des pores de diamètre 0.22  $\mu$ m (MerckMillipore).

#### **4.1.2 Préparation des neutrophiles primaires**

Pour les expériences présentées dans la dernière partie des résultats de ce second chapitre, les neutrophiles primaires humains ont été extraits du sang par Sophie Dupré-Crochet au Laboratoire Chimie Physique de l'Université Paris-Sud.

La première étape est de séparer les leucocytes des globules blancs. Pour cela, le contenu de la poche de sang du donneur provenant de l'Etablissement Français du Sang (EFS) a été vidée dans une éprouvette de 1 L stérile en polypropylène présentant le moins de rayures possible pour éviter l'activation des neutrophiles. Dans l'éprouvette contenant un volume V de sang, le même volume V d'une solution de Dextran 50G (Sigma-Aldrich référence 31392) à 2% dilué dans du sérum physiologique (NaCl 0,9 % dans de l'eau milliQ) filtré et stérile a été ajouté. Ce mélange a été mélangé lentement en fermant l'éprouvette avec un Parafilm. Le mélange a été laissé 30 minutes à température ambiante pour laisser les globules rouges s'agréger au dextran et sédimenter. La partie supérieure jaunâtre contient les leucocytes. Cette partie a été répartie dans des tubes Falcon de 50 mL. Les tubes ont été centrifugé 8 min à 400g et le surnageant a été jeté pour resuspendre les culots dans 10 mL de PBS (Phosphate Buffer Saline, Dulbecco).

Les leucocytes sont ensuite récupérés. Pour cela, 30 mL maximum de suspension des culots préparés ont été déposés à la surface de 15 mL de Ficoll (Ficollpaque-plus Ge-Healthcare référence GE17-144002 ). Ce mélange biphasique a été centrifugé à 4°C pendant 30 min à 400g. Le surnageant et l'anneau de monocytes et lymphocytes ont été prélevé avec 1 mm de liquide. Le reste a été jeté. Le culot qui contient les granulocytes a été doucement remis en suspension sans réaliser d'aspiration-refoulement. Les cellules ont été comptées.

Pour lyser les globules blancs, nous avons dans chaque culot ajouté 12 mL d'eau stérile refroidie sur glace puis les culots ont ensuite été mélangés doucement avec l'eau par retournement pendant 30 secondes. Après 40 secondes, 4 mL de KCl 0,6 M refroidi sur glace ont rapidement été ajoutés, mélangés puis le volume a été complété à 50 mL avec du PBS (Dulbecco) refroidi en glace. Après mélange, le tube a été centrifugé 8 min à 400g à 4 ° C. Le surnageant a été jeté, puis le tube a été recentrifugé à 400g pendant 8 min à 4°C puis le surnageant a été de nouveau

jeté. Le culot a ensuite été repris dans 5 mL de PBS froid (Dulbecco). Les cellules ont ensuite été comptées.

Avant l'expérimentation, les cellules ont été centrifugées pendant 3 minutes à 300g et resuspendues dans le même volume avec du tampon d'expérimentation qui contient 140 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de CaCl<sub>2</sub>, 10 mM de HEPES (pH 7.4), 1.8 mg/mL glucose, et 1% de SVF décomplémenté dans du tampon HEPES. Ce milieu d'expérimentation est aussi filtré avec un filtre contenant des pores de diamètre 0.22  $\mu$ m (MerckMillipore). Les cellules ont été gardées à 4° C.

## 4.2 Oponisation des billes et des surfaces planes

### 4.2.1 Oponisation des billes

Les billes de polystyrène de 8  $\mu$ m de diamètre (Spherotech référence BP-60-5) ont été achetées déjà couvertes de BSA (Bovine Serum Albumin). Les billes de 20  $\mu$ m de diamètre (Écart type sur le diamètre <0,3  $\mu$ m ; Sigma référence 74491-5ML-F) sont en polystyrène et nous couvrons nous-mêmes ces billes de BSA.

Une solution de BSA (Sigma-Aldrich) a été préparée à 10 mg/mL dans du PBS 1X stérile (Thermo Fisher). Après dissolution de la BSA, cette solution a été filtrée sous hotte stérile avec un filtre présentant des pores de 0.22  $\mu$ m. Environ  $2 \cdot 10^6$  billes/mL ont été prises et centrifugées à 14 000g pendant 3 minutes. À la fin du dernier lavage, les billes ont été resuspendues dans 1 mL de solution de BSA à 10 mg/mL filtrée. Les billes ont été mises sur roue à vitesse lente toute la nuit, à température ambiante. Le lendemain, les billes sont lavées 3 fois à 14 000g pendant 3 minutes et resuspendues dans du PBS. Des anticorps anti-BSA de lapin (Sigma-Aldrich référence B1520) ont été dilués au 1 :500e (la concentration de la solution mère étant de 3.5 mg/mL) dans du PBS et ont été ajoutés lors du dernier lavage des billes. Les billes ont ensuite été mises sur roue à température ambiante pendant 2h. Les billes sont ensuite lavées à 14000g pendant 3 minutes et resuspendues à une concentration d'environ  $10^6$  billes/mL.

### 4.2.2 Oponisation des surfaces planes

**Préparation des surfaces** Les boîtes de cultures cellulaires présentant un fond en verre (FluoroDish 35  $\times$  23 mm) sont utilisées pendant cette expérience. Ces boîtes sont d'abord lavées 3 fois avec 1 mL de PBS par lavage et par boîte. Une solution de BSA (Sigma-Aldrich référence A7906) a été préparée avec une concentration de 10 mg/mL dans du PBS 1X stérile. Après dissolution de la BSA, cette solution a été filtrée sous hotte stérile avec un filtre de 0.22  $\mu$ m de diamètre et 1 mL de solution a été déposé dans les boîtes de culture cellulaire à fond en verre pendant 2h. Ensuite trois lavages ont été réalisés avec 1mL de PBS par lavage et par boîte. Des

anticorps anti-BSA de lapin sont dilués au 1 :500e dans du PBS 1X stérile. 1 mL de cette solution d'anticorps est placé dans les boîtes FluoroDish en verre pendant 2h. Ensuite trois lavages sont réalisés avec 1 mL de PBS par lavage et par boîte.

**Conditions pour observation au microscope** Les expériences ont été réalisées dans le milieu d'expérimentation (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES (pH 7.4), 1.8 mg/mL glucose, 1% de SVF décomplémenté dans du tampon HEPES filtré et chauffé à 37°C. Les boîtes en verre sont placées sur la platine d'un microscope optique inversé (Ti2, Nikon), et la mise au point est faite sur l'échantillon avec un objectif de grossissement 40X (CFI Plan Fluor R-DS 40X MRH99401). Les cellules qui ont été centrifugées à 300 g pendant 3 minutes ont été resuspendues dans le milieu d'expérimentation. 10 *mu*L de cellules (à environ 2.10<sup>6</sup> cellules/mL) sont déposées dans la boîte de verre Fluorodish.

Quelques centaines de cellules (PLB ou neutrophiles primaires) ont été injectées dans la boîte à fond de verre Fluorodish. Nous avons filmé (Hamamatsu ORCA-Spark C11440-36V) l'étalement des cellules sur la surface opsonisée, à la fréquence d'une image toutes les secondes en lumière blanche.

## 4.3 Mesures d'aires

### 4.3.1 Calcul de l'aire de la coupe phagocytaire

Lors de la phagocytose frustrée, les cellules PLB s'étalent et arrêtent de s'étaler avant d'avoir fermé la phagosome. Lorsque la cellule s'arrête sur la bille de 20 $\mu$ m de diamètre, la coupe phagocytaire est la partie qui recouvre partiellement la bille (figure 2.24a page ci-contre). Cette coupelle est une calotte sphérique. L'aire d'une calotte sphérique est donnée par l'équation  $S = 2\pi R_{bead}h$ , où  $R_{bead}$  est le rayon de la sphère (la bille) et h la hauteur de la calotte (figure 2.24a page suivante). La hauteur h est difficile à mesurer sur les images de microscopie, en revanche le rayon de la calotte  $R_{cell}$  est plus facilement accessible. Connaissant  $R_{bead}$  et  $R_{cell}$ , on peut calculer la hauteur h de la calotte (figure 2.24b page ci-contre). Le théorème de Pythagore implique en effet :

$$(R_{bead} - h)^2 + (R_{cell})^2 = (R_{bead})^2, \quad (2.9)$$

D'où l'on déduit h ;

$$h = R_{bead} \left(1 - \sqrt{1 - \left(\frac{R_{cell}}{R_{bead}}\right)^2}\right) \quad (2.10)$$

Pour mesurer  $R_{max}$ , la première étape est de détecter les bords de la coupe phagocytaire en traitant les images de microscopie. Nous soustrayons une image filtrée (outil fast filters, filtre Gaussien puis Median, Image J-150-64) à l'image d'origine (figure 2.24a), ce qui permet de

mettre en valeur les détails de l'image et notamment les bords de la coupe phagocytaire sont plus visibles (figure 2.24c panneau du haut de la présente page). Nous mesurons alors le diamètre de la calotte sphérique  $D_{cell} = 2 \times R_{cell}$  avec le logiciel image j avec une image calibrée pour l'objectif 100x utilisé pour les acquisitions (pixel représentant 59 nm), et nous en déduisons son rayon ( $R_{cell}$ ). Le rayon de la bille sur laquelle la calotte sphérique se trouve ( $R_{bead}$ ) est constant, il est de  $10\mu\text{m}$ . Nous avons alors les deux variables nécessaires pour résoudre l'équation de  $h$  :  $R_{cell}$  et  $R_{bille}$ .

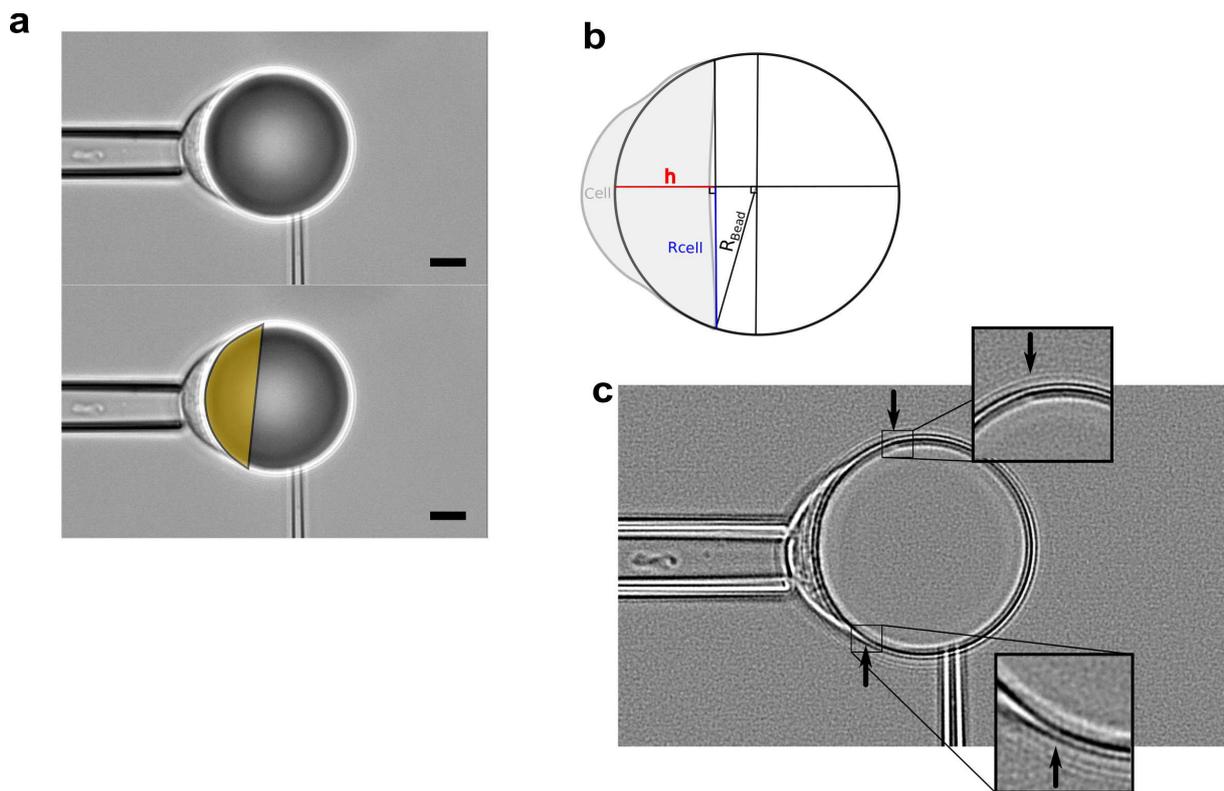


FIGURE 2.24 – Mesures de la coupe phagocytaire. a) Image en champ clair non traitée d'une cellule PLB qui a réalisé une phagocytose frustrée. La coupe phagocytaire est montrée en jaune (panneau du bas). La barre d'échelle est de  $5\mu\text{m}$ . b) Schéma de représentation géométrique des variables utilisées dans les équations de mesures de la calotte sphérique. La cellule est en gris claire. La hauteur  $h$  de la coupe phagocytaire est indiquée en rouge. c) Image traitée d'une cellule PLB qui réalise une phagocytose frustrée sur une bille de polystyrène de  $20\mu\text{m}$  de diamètre opsonisée avec des IgG. Les flèches indiquent la fin de la calotte sphérique. Le panneau du haut montre le changement de contraste qui nous permet de mesurer la fin de la calotte sphérique sur la bille. La barre d'échelle est de  $5\mu\text{m}$ .

### 4.3.2 Mesure de l'aire totale finale lorsque la cellule a arrêté de s'étaler

Quand la cellule a arrêté de s'étaler, nous doublons cette calotte sphérique pour représenter l'intérieur et l'extérieur de cette coupe phagocytaire. En effet, quand la cellule a atteint son aire maximale, la cellule est une calotte sphérique qui a une épaisseur d'environ  $4.2 \pm 1.2 \mu\text{m}$ . Cette épaisseur représente  $< 20 \%$  de la longueur maximale de la cellule et n'a pas été prise en compte dans le calcul de l'aire finale.

$$S = 2(2\pi R_{bead}h) \quad (2.11)$$

### 4.3.3 Calculs de la dynamique de la phagocytose frustrée sur surface plane

Pour calculer l'aire totale de la cellule, nous considérons la surface du disque (calculée avec le rayon  $R_{cell}$ ) et lui ajoutons la surface d'une calotte sphérique (figure 2.25c page ci-contre) d'une épaisseur  $h$  et de rayon  $R_{cell}$ . La surface ( $S$ ) de la calotte sphérique est calculée avec ( $S = 2\pi Rh$ ). L'épaisseur  $h$  ( $4 \mu\text{m}$  en moyenne) a été mesurée sur les cellules ayant arrêté de s'étaler (la cellule ne s'étale plus) pendant leur phagocytose frustrée sur les billes de  $20\mu\text{m}$  de diamètre.

### 4.3.4 Discrétisation de la géométrie cellulaire

Pour mesurer l'aire de la cellule à géométrie complexe, nous traçons un axe de symétrie ( $x$ ) (figure 2.26a page 112). Après avoir traité l'image, nous avons discrétisé le contour de la cellule avec des points indexés de coordonnées  $x$  et  $y$  (figure 2.26b page 112). À partir de ces points, la cellule a été découpée en petites tranches pour lesquelles une surface latérale élémentaire ( $dA$ ) est calculée (figure 2.26c page 112). Pour chaque section, le rayon moyen ( $R_{i-i+2}$ ) des deux points indexés symétriques par rapport à l'axe de symétrie de la cellule sont calculés, puis la largeur de chaque tranche ( $dL_{i-i+2}$ ). Puis, l'aire totale de la cellule ( $A_{totale}$ ) est calculée en ajoutant toutes les sections de surface ( $dS_{i+i2}$ ) calculées.

## 4.4 Mesurer l'aire de la cellule au moment de la rupture membranaire pendant un étirement passif par aspiration dans une micropipette

Pour mesurer l'aire à laquelle la cellule rompt sa membrane, nous avons sommé plusieurs éléments géométriques élémentaires [Guillou et al., 2016c]. Au début de l'expérience, la cellule est maintenue avec une pression d'aspiration à l'intérieur de la micropipette ( $\Delta P$ ) de 20 Pa. A faible  $\Delta P$ , la cellule ressemble à une sphère d'un diamètre initial  $D_0$  avec un cylindre de longueur  $L$ . Quand  $\Delta P = 500$  Pa, la cellule s'allonge à l'intérieur de la pipette (augmente  $L$ ) et la sphère qui se trouve à l'extérieur réduit son diamètre ( $D_f$ ) (figure 2.27a et b page 113). Ces

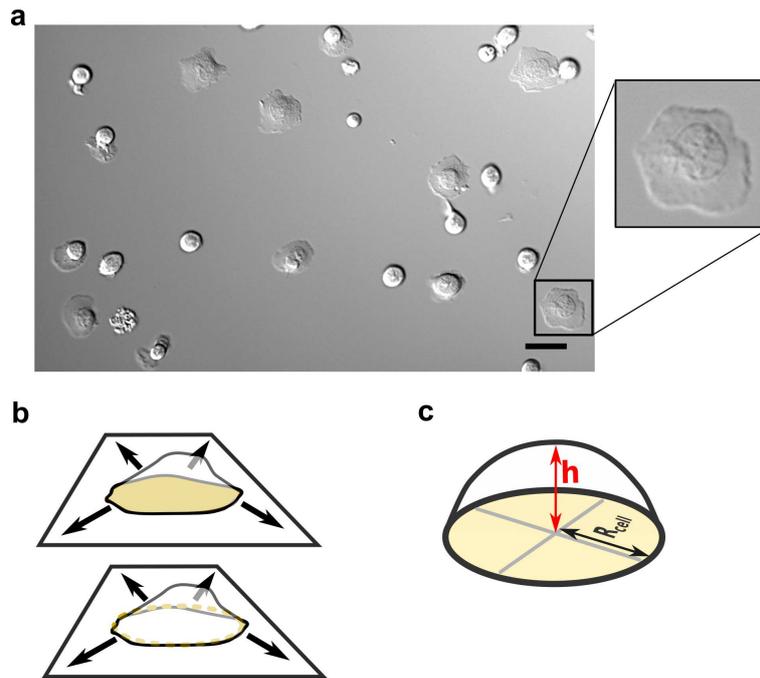


FIGURE 2.25 – Mesurer les aires cellulaires pendant la phagocytose frustrée sur plan. a) Morphologie cellulaire d’une cellule PLB s’étalant sur une surface plane en verre opsonisée avec des IgG. La géométrie de la coupe phagocytaire peut être approximée par un disque (panneau de droite). La barre d’échelle est de  $20 \mu\text{m}$ . b) Dessin de la cellule qui s’étale (panneau du haut) et représentation de la coupe phagocytaire en contact avec le verre (panneau du bas, disque jaune). c) Schéma de représentation géométrique des variables utilisées pour calculer le disque la coupe phagocytaire ainsi que l’aire de toute la cellule.

mesures de  $D_f$  et de  $L$  nous permettent de quantifier les surfaces des éléments géométriques élémentaires (figure 2.27c page 113) pour remonter la surface ( $A_f$ ).

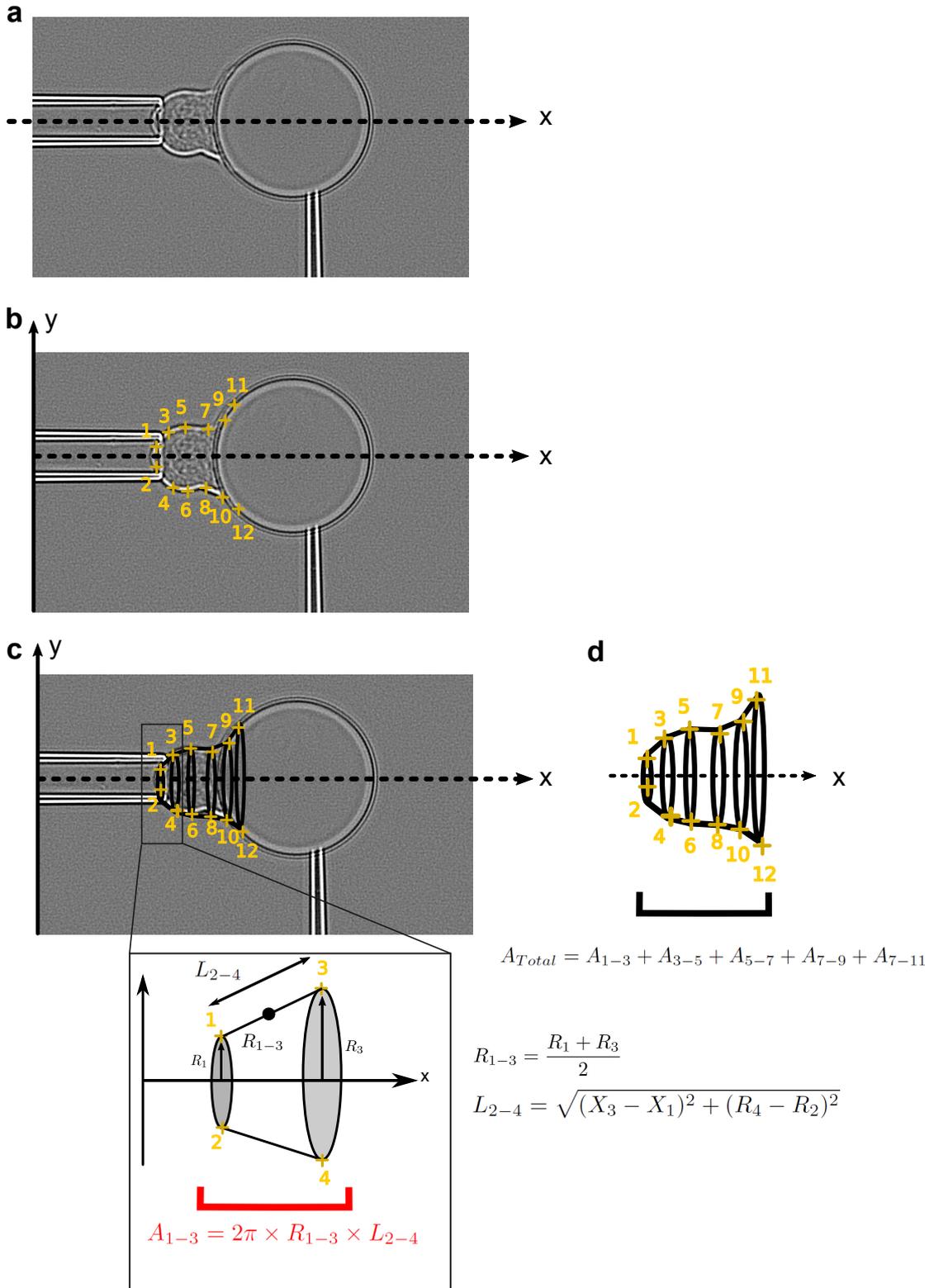
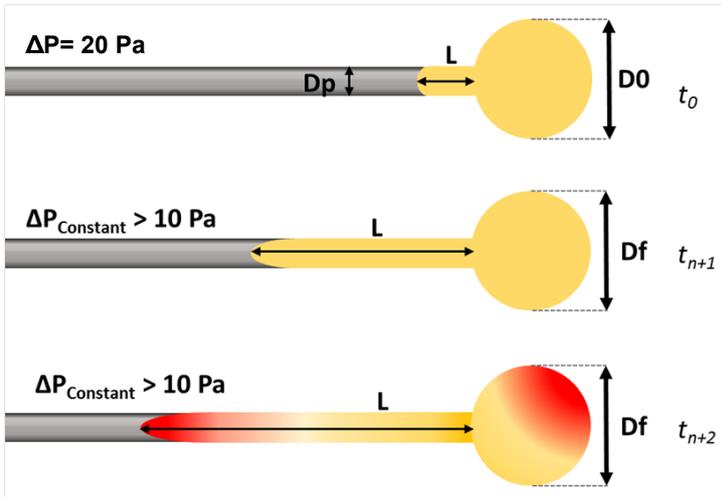
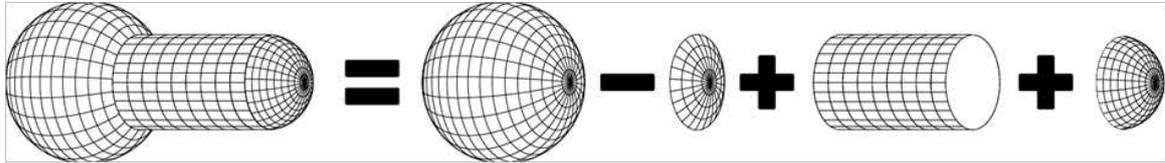


FIGURE 2.26 – Calcul de l’aire totale extérieure d’une cellule réalisant une phagocytose frustrée. a) Morphologie d’une cellule PLB réalisant une phagocytose frustrée. b) Discrétisation de la géométrie cellulaire avec des points indexés qui possèdent des coordonnées en x et en y. c) Découpage de la géométrie cellulaire en petites sections en fonction des points indexés (panneau central). Le panneau du bas décrit les calculs réalisés pour déduire la petite section ( $A_{i-i+2}$ ) qui est ici à titre d’exemple  $A_{1-3}$ . d) Schéma et équation de la surface totale de la cellule ( $A_{totale}$ ).

**a**



**b**



**c**

The initial cell area before aspiration is:

$$A_0 = \pi(D_0)^2$$

During aspiration, the area of the small dome that needs to be subtracted is:

$$A_{dome} = 2\pi\left(\frac{D_f}{2}\right)h_{dome}$$

$$h_{dome} = \frac{D_f}{2} - \left(\left(\frac{D_f}{2}\right)^2 - \left(\frac{D_p}{2}\right)^2\right)^{1/2}$$

The final cell area during aspiration is:

$$A_f = \pi(D_f)^2 - A_{dome} + \pi(D_p)L + 2\pi\left(\frac{D_p}{2}\right)^2$$

FIGURE 2.27 – Calculs de l’aire cellule pendant un étirement passif. a) Schéma de l’expérience d’étirement cellulaire via une pression d’aspiration ( $P_p$ ). Au début de l’expérience ( $t_0$ ),  $P_p=20$  Pa. A  $t_{n+1}$ , une pression d’aspiration de 500 Pa est appliquée à l’intérieur de la cellule faisant augmenter sa longueur ( $L$ ) et diminuer son diamètre ( $D_f$ ). A  $t_{n+2}$ , la cellule rompt sa membrane. La rupture est indiquée par la couleur rouge qui représente la fluorescence due à l’émission ( $\lambda_{exc}=636$  nm) à de l’iodure de propidium. b) Somme des éléments géométriques élémentaires qui composent la cellule. La sphère représente la partie externe de la cellule qui se trouve à l’extérieur de la micropipette. Le petit dôme de hauteur  $h_{dome}$  se trouvant à l’interface entre la sphère et le dôme est soustrait à l’aire totale de la cellule. Le cylindre et la calotte sphérique sont les parties cellulaires comprises dans la pipette. c) Equations pour calculer l’aire initiale de la cellule et son aire pendant que celle-ci s’étire après que la pression d’aspiration  $P_p=500$  Pa n’ait été appliquée. La figure a est adaptée de [Guillou et al., 2016c]; b et c proviennent de ce même article.



# Chapitre 3

## Single-cell immuno-mechanics : large cell-type-specific viscoelastic changes during white blood cell activation

### Sommaire

---

<b>1</b>	<b>Introduction</b> . . . . .	<b>117</b>
1.1	Micropipette rheometer for monitoring rapid morphological and mechanical changes in non-adherent cells. . . . .	118
1.2	Viscoelastic changes during leukocyte activation . . . . .	120
1.3	Changes in $K'$ and $K''$ correspond to changes in intrinsic leukocyte mechanical properties . . . . .	120
1.4	Localization of mechanical changes . . . . .	121
1.5	Early mechanical changes in cell-cell contacts . . . . .	122
1.6	Relationship between elastic and viscous properties during leukocyte activation . . . . .	124
<b>2</b>	<b>Discussion</b> . . . . .	<b>125</b>
<b>3</b>	<b>Materials and Methods</b> . . . . .	<b>127</b>
3.1	Micropipette rheometer. . . . .	127
3.2	T cells and activating beads . . . . .	128
3.3	PLB-985 cell line and activating beads . . . . .	128
3.4	B cells and activating beads. . . . .	129
3.5	Atomic Force Microscope and Single Cell Force Spectroscopy . . . . .	130
<b>4</b>	<b>Supplementary Material</b> . . . . .	<b>133</b>
4.1	Supplementary material    Measuring initial cell Young's modulus. . . . .	133
4.2	Supplementary material   Complex stiffness. . . . .	133

4.3	Supplementary material   Validation with red blood cells. . . . .	133
4.4	Supplementary material   Measuring initial storage modulus $E'$ and loss modulus $E''$ . . . . .	134
4.5	Supplementary material   Measuring an effective Young's modulus during activation. . . . .	135
4.6	Supplementary material   Spatial localization of viscoelastic changes. . . . .	137
4.7	Supplementary material   Cell stiffness increases before membrane surface stores are exhausted. . . . .	137
4.8	Supplementary material   Increase in stiffness corresponds to an increase in cell tension. . . . .	138
4.9	Supplementary material   Cell-cell contact mechanics measured with AFM . . . . .	139
4.10	Supplementary material   Structural damping . . . . .	141
4.11	Supplementary material   Drag coefficient . . . . .	141
4.12	Supplementary material   Effect of fast cell deformation. . . . .	142

---

## Note sur ce chapitre

Ce chapitre est un article soumis, déposé sur bioRxiv sous le DOI <https://doi.org/10.1101/851634>

### Liste des auteurs

Cet article regroupe mes résultats sur les neutrophiles pendant la phagocytose présentés dans le chapitre 2 et sont comparés avec d'autres processus immunitaires. Cette comparaison a été possible grâce aux collaborations de Julien Husson, mon principal directeur de thèse. Ces collaborations sont visibles dans la listes des auteurs sus-présentée.

Alexandra Zak<sup>1,2</sup>, Sara Violeta Merino Cortés<sup>3</sup>, Anaïs Sadoun<sup>4</sup>, Avin Babataheri<sup>2</sup>, Stéphanie Dogniaux<sup>5</sup>, Sophie Dupré-Crochet<sup>2</sup>, Elodie Hudik<sup>2</sup>, Hai-Tao He<sup>4</sup>, Abdul I. Barakat<sup>1</sup>, Yolanda R. Carrasco<sup>3</sup>, Yannick Hamon<sup>4</sup>, Pierre-Henri Puech<sup>4</sup>, Claire Hivroz<sup>5</sup>, Oliver Nüsse<sup>2</sup>, Julien Husson<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire d'Hydrodynamique (LadHyX), Ecole polytechnique, CNRS UMR7646, Institut Polytechnique de Paris, route de Saclay, 91128 Palaiseau Cedex, France

<sup>2</sup> Laboratoire de Chimie Physique, CNRS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91405, Orsay, France

<sup>3</sup> B cell Dynamics Laboratory, Department on Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología (CNB)- CSIC, Madrid, Spain

<sup>4</sup> Aix Marseille University, LAI UM 61, Marseille, F13288, France

<sup>5</sup> Institut Curie, PSL Research University, INSERM U932, Integrative analysis of T cell activation team, 26 rue d'Ulm, 75248, Paris Cedex 05, France

## 1 Introduction

The understanding of cell mechanics has progressed thanks to the development of micromanipulation techniques such as micropipette aspiration [Lightman, 1973, Needham and Hochmuth, 1990, Tsai et al., 1994, Tsai et al., 1998, Hochmuth, 2000, Lam et al., 2009, Wang et al., 2019], indentation techniques [Lee et al., 2011a, Lomakina et al., 2004, Weafer et al., 2015, Desprat et al., 2006, Fernández and Ott, 2008, Lam et al., 2007, Guillou et al., 2016a, Roca-Cusachs et al., 2006], and others [Wu et al., 2018, Fabry et al., 2001]. Some micro-fluidics based approaches now allow high-throughput mechanical measurements [Rosendahl et al., 2018, Rosenbluth et al., 2008, Ravetto et al., 2014, Toepfner et al., 2018, Tse et al., 2013, Guillou et al., 2016a, Darling and Di Carlo, 2015, Ekpenyong et al., 2017]

Yet, these techniques do not allow tracking over time mechanical changes in cells stimulated by soluble molecules [Maksym et al., 2000, Smith et al., 2005] or activating surfaces [Dura et al., 2015, Thoumine et al., 1999]. Following these changes can bring a wealth of new information on cell function and disease. Here we focus on white blood cells (leukocytes), which – among several other functions – remove dead and infected cells or pathogens. To do so, leukocytes activate by forming specialized interfaces called synapses with other cells. Different cell types form different types of synapses, which still share many common molecular features [Niedergang, 2016a]. Similarities are also mechanical. For instance, we have shown that when forming a synapse, a T lymphocyte generates forces [Hivroz and Saitakis, 2016, Basu et al., 2016] and stiffens [Sawicka et al., 2017], recapitulating pioneering observations [Lam et al., 2009, Evans and Zhelev, 1993, Herant et al., 2005, Herant et al., 2006] that during phagocytosis, the cortical tension of a phagocytic leukocyte increases dramatically while the cell engulfs its prey. The mechanical of other leukocytes (such as B lymphocytes) was still unknown, and some common mechanical aspects were also unexplored, such as the evolution of viscous properties of leukocytes during activation. Cellular matter is indeed peculiar in that elastic and viscous properties of resting cells are usually not independent : resting leukocytes conserve a ratio of cortical tension to cell viscosity of about  $0.2 - 0.3 \mu\text{m/s}$  in neutrophils [Hochmuth et al., 1993, Tran-Son-Tay et al., 1991] and macrophages [Lam et al., 2009], even though the latter can be ten times more tensed. Many studies exhibited this peculiar aspect of biological matter in other cell types [Fabry et al., 2001, Fabry et al., 2003, Mahaffy et al., 2004]. What remained unknown was whether this link between elastic and viscous properties would be conserved over time even during mechanical changes.

In this study, we quantified the evolution of both elastic and viscous properties during the activation of three types of leukocytes, and addressed if elastic and viscous showed parallel time evolution. We used a micropipette rheometer to activate leukocytes them with standardized activating antibody-covered microbeads [Sawicka et al., 2017, Basu et al., 2016, Husson et al., 2011]. We also probed mechanical changes occurring in cell-cell contacts during the first seconds following leukocyte activation used Atomic Force Microscopy.

## **1.1 Micropipette rheometer for monitoring rapid morphological and mechanical changes in non-adherent cells.**

We implemented a live feedback in our Micropipette Force Probe [Sawicka et al., 2017, Basu et al., 2016] allowing us to impose a controlled small oscillatory force modulation  $\Delta F \cos(\omega t)$  (angular frequency  $\omega = 2\pi f$ , frequency  $f = 1$  Hz) superimposed onto a constant

force  $\langle F \rangle$ . A total force  $F(t) = \langle F \rangle + \Delta F \cos(\omega t)$  is thus applied to leukocyte while it activates. Before entering this force modulation regime, bead-cell contact is ensured by pressing an activating microbead against the cell with a force  $F_{comp}$  (0.12 – 0.36 nN). From this initial compression we extract the cell effective Young's modulus  $E_{Young}$  [Rosenbluth et al., 2006b] (suppl. mat. 1). During force modulation regime, we measure the oscillatory change in position of the tip of the flexible micropipette  $x_{tip}(t) = \langle x_{tip} \rangle + \Delta x_{tip} \cos(\omega t - \varphi)$ , of average value  $\langle x_{tip} \rangle$ , amplitude  $\Delta x_{tip}$ , (typically 100 nm) and (positive) phase lag  $\varphi$ ; changes in tip position reflect changes in cell length (Figure 3.1). From  $x_{tip}(t)$  and  $F(t)$  we deduce the complex cell stiffness  $K^* = K' + iK''$ , of elastic part  $K'$ , and viscous part  $K''$  (suppl. mat. 2). We validated our setup on red blood cells, for which models predict  $K'$  (suppl. mat. 3).

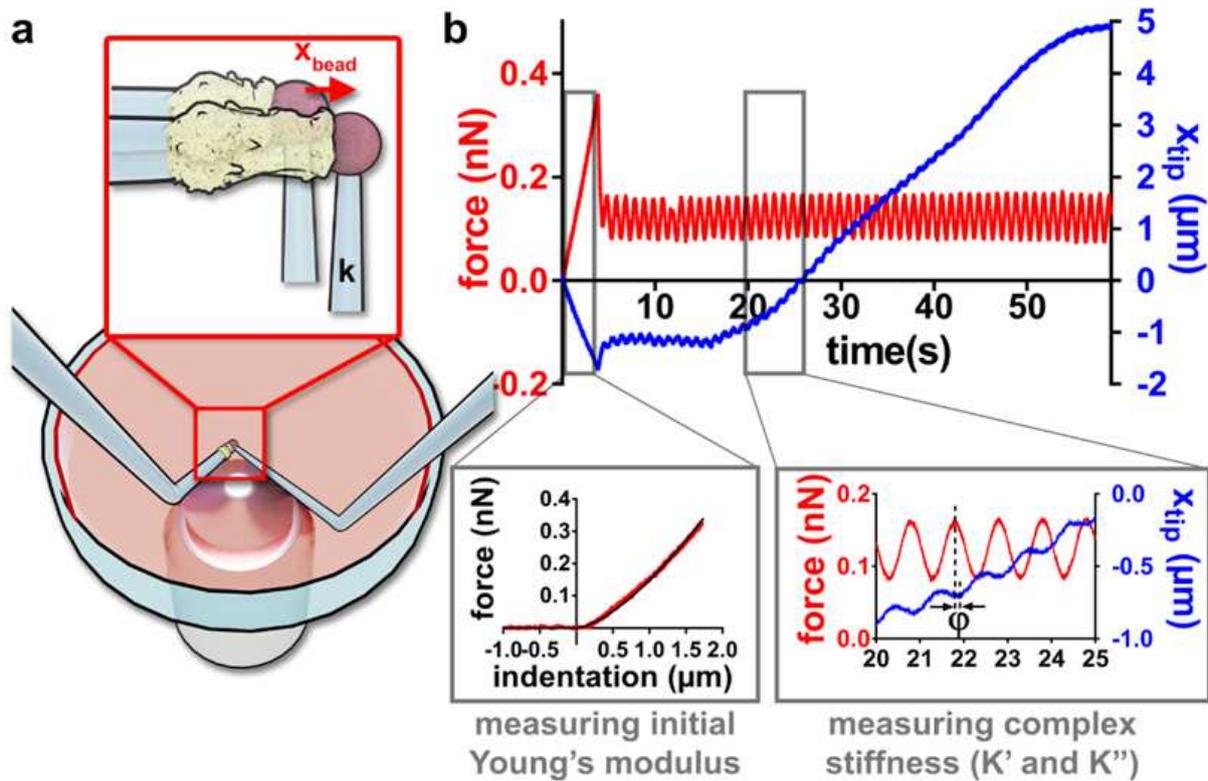


FIGURE 3.1 – Rheology of an activating leukocyte. (a). Setup. Two micropipettes are placed in a Petri dish. A flexible pipette (right, bending stiffness  $k \approx 0.2 \text{ nN}/\mu\text{m}$ ) holds an activating microbead firmly. A rigid micropipette (left) gently holds a leukocyte. The base of the flexible micropipette is translated to impose a desired force on the cell. (b) Force applied on the cell (in red) and position  $x_{tip}$  of the tip of the flexible micropipette (in blue). The cell is first compressed with a force  $F_{comp}$  (here 0.36 nN) to measure the initial Young's modulus of the cell (inset, bottom left). Then an oscillatory force is applied to the cell, leading to an oscillatory  $x_{tip}$  signal (inset, bottom right) superimposed to a slower variation of the average value  $\langle x_{tip} \rangle$  due to the growth of a protrusion produced by the leukocyte.

## 1.2 Viscoelastic changes during leukocyte activation

We probed different types of leukocytes during activation and observed qualitatively similar behavior : both  $K'$  and  $K''$  increase and reach a maximum that is 3- to 8-fold larger than their initial value within few minutes ( 2 minutes for T and B cells, 5 minutes for neutrophils) following the contact between the leukocyte and the activating microbead (Figure 3.2).

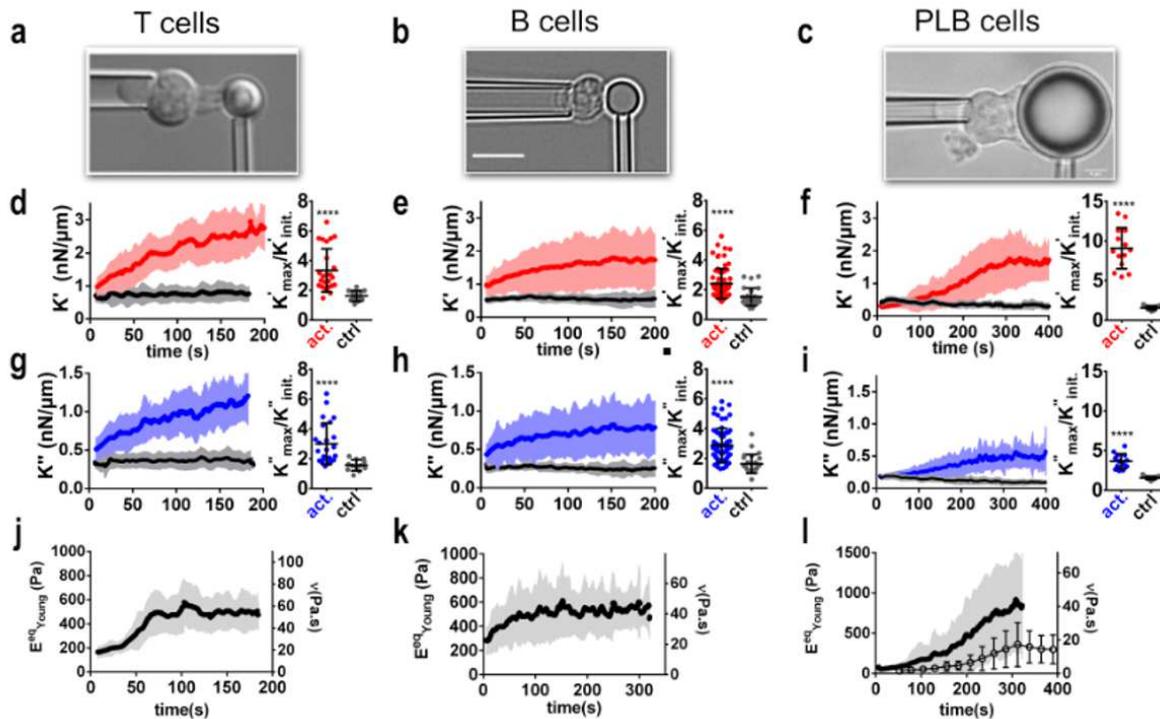


FIGURE 3.2 – Both  $K'$  and  $K''$  increase during leukocyte activation. Each column corresponds to a different celltype. (a-c) Cell morphology. (d-f) Left :  $K'$  for activating (red lines) and non-activating control beads (gray lines). Right : max/min ratio of  $K'$  values, for activating and non-activating control beads. (g-i) Left : values of  $K''$  corresponding to  $K'$  values in d-f. (j-l) Equivalent Young's modulus (left axis) and cell viscosity (right axis). In l, dots are Young's modulus measured in the back of the cell. In all panels, the time at which the leukocyte contacts the bead is defined as  $t = 0$  s, thick lines are averages over at least 3 experiments (T cells : 21 cells, B cells 71 cells, PLB cells : 14 cells), and error bars are standard deviations.

## 1.3 Changes in $K'$ and $K''$ correspond to changes in intrinsic leukocyte mechanical properties

Both  $K'$  and  $K''$  depend of the cell geometry, which changes during cell activation, so to exclude that changes in  $K'$  and  $K''$  are only a geometrical effect, cell intrinsic mechanical properties such as Young's modulus and viscosity have to be extracted from  $K'$  and  $K''$ . Do to

so, we first convert  $K'$  and  $K''$  into a storage modulus  $E'$  and a loss modulus  $E''$ , respectively. In case of T cells and B cells, we do so by modeling cell geometry (suppl. mat. 5). For PLB cells, we use another approach by using a modified set up where a non-adherent glass bead indents the cell on its “back” (figure 3.4a) [Guillou et al., 2016a] while the cell phagocytoses an activating bead at its “front” (figure 3.3a). This alternative setup leads to the same increase in  $K'$  and  $K''$  as measured using the original setup with front indentation (figure 3.3b). Having a sphere-against-sphere geometry, we can use a linearized Hertz model to extract  $E'$  and  $E''$  moduli (suppl. mat. 4). Lastly, we performed experiments when the indentation are performed in a cyclic way : indentation occurs only for a short time at the beginning of each cycle, after which the indenter retracts from the cell, marking the end of a cycle, immediately followed by a new cycle. This allows directly measuring a Young’s modulus over time, though with a limited time resolution of  $\sim 30$  seconds (dotted curve in figure 3.2l). For the sake of a simple interpretation of  $E'$  and  $E''$  that are obtained in a regime of oscillatory forces, we convert them into an effective Young’s modulus  $E_{\text{Young}}^{\text{eq}}$  and an effective viscosity  $\mu$ , respectively. To calculate  $E_{\text{Young}}^{\text{eq}}$ , we empirically compare the Young’s modulus measured by initial compression and  $E'$  measured during the first seconds of force modulation (suppl. mat. 5 ; suppl. figure 3.8). For PLB cells we went further using again cyclic back-indentation described above to measure both Young’s modulus and  $E'$  not only at initial time but during the whole activation. This lead to a phenomenological coefficient  $C$  such that  $E' = CE_{\text{Young}}$ ;  $C$  is constant over time for PLB cells, and we assume the factors  $C$  derived for T and B cells to be also constant over time during cell activation (suppl. mat. 5). Using this approach, we measured the effective Young’s modulus of the three cell types over time (figure 3.2j-l). To calculate the effective cell viscosity, we consider a simple model consistent with a newtonian liquid and cortical tension model of a cell [Wu et al., 2018], where a Newtonian viscosity is introduced as  $\mu = E''/\omega$ . The resulting Young’s modulus and viscosity increase until reaching a maximal value that is 2-3 folds larger than baseline value for T and B cells, and about 11 folds higher for PLB cells (Figure 3.2j-l).

## 1.4 Localization of mechanical changes

We asked if mechanical were localized close to the activation area in the leukocyte. In the case of T cells, we used a modified setup similar to the one allowing to indent PLB cells on their back, and showed that cell stiffening is higher in the vicinity of the contact zone with the activating surface (suppl. mat. 6).

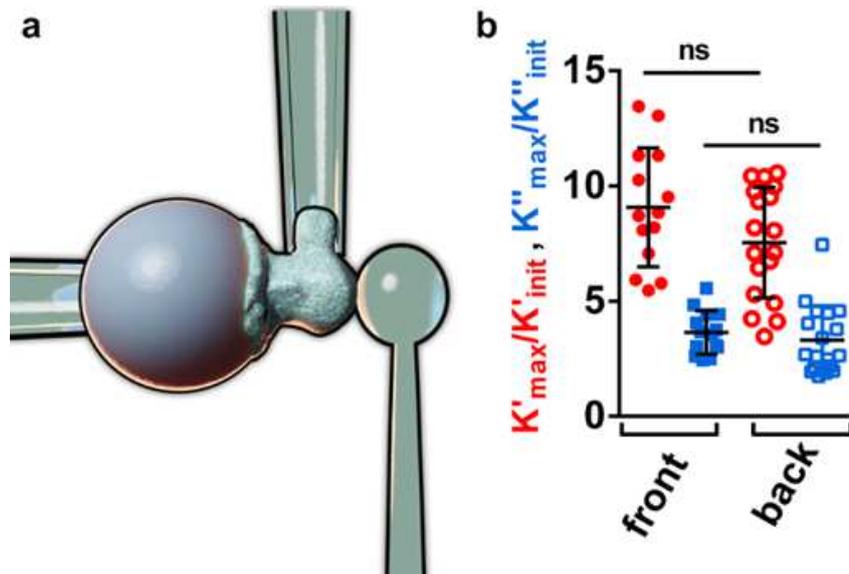


FIGURE 3.3 – Indenting the “back” of a phagocyte during activation. (a) Modified setup. A stiff pipette holds the activating microbead (left), an auxiliary (stiff) pipette holds the cell by its “side” (top) and a flexible pipette whose tip consists of a non-adherent glass bead at its tip indents the cell on its “back” (right). (b) Max/min ratios for  $K'$  and  $K''$  obtained with both versions of the setup during PLB cell activation (ns : non significant, two-tailed unpaired t test).

## 1.5 Early mechanical changes in cell-cell contacts

We asked if mechanical changes could precede morphological changes. Indeed, in T cells,  $K'$  increases slowly within seconds after cell-bead contact before cell morphology starts changing (i.e. before the T cells produces a large protrusion [Sawicka et al., 2017]). The onset of this growth is followed by a short period during which  $K'$  stays relatively constant. This phase ends by the start of a fast increase of  $K'$  during protrusion growth (Figure 3.4). Of note, T cells have large membrane stores so that we can exclude that the acceleration in  $K'$  nor the fact that it reaches a maximum can be explained by limited membrane stores (suppl. mat. 7). Note that when  $K'$  starts increasing more rapidly, the tail of the cell in the holding micropipette starts retracting (suppl. figure 3.9a), which is a consequence of an increase in cell tension. Not surprisingly, an increase in  $K'$  corresponds to an increase in cell tension. We can (i) estimate a cell tension from the moment of retraction of cell tail and (ii) compare it to an equivalent cell tension derived from  $K'$  based on physical considerations, and both are in agreement (suppl. mat. 8);  $K'$  and tension are two ways to describe cell mechanical properties. We focused here on  $K'$  measurements as our rheometer provides a temporal resolution on the order of 1 s.

In order to confirm that cell stiffness increases within seconds and before any morphological change, and address if these observations could be technique and model-dependent : we used AFM and performed Single Cell Force Spectroscopy (SCFS) experiments (figure 3.12a)

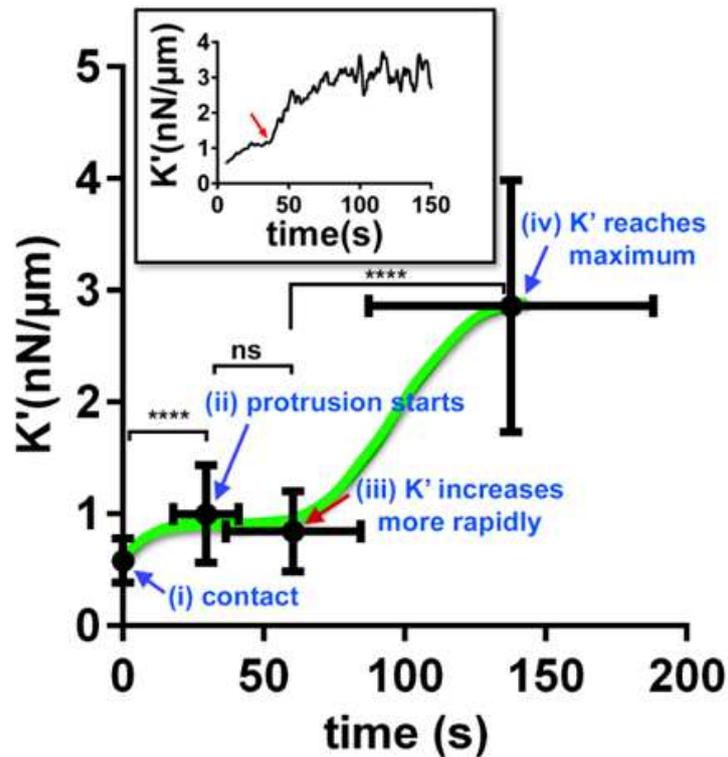


FIGURE 3.4 –  $K'$  and morphology evolution during T cell activation : (i) cell-bead contact (origin of time), (ii) start of the growth a protrusion produced by the cell [Sawicka et al., 2017], (iii) onset of more rapid increase in  $K'$ , (iv) reaching maximal stiffness. Green line is only a guide to eye. **Inset** : individual example, the red arrow indicates when  $K'$ . Tests are performed on  $K'$  values (two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed rank test,  $p < 0.0001$ ).

[Puech et al., 2006] on murine anti-CD45-immobilized 3A9m T cells encountering COS-7 surrogate antigen-presenting cells (APCs). To be able to measure rapid mechanical changes using this technique, avoiding large active cell deformations was important, and achieved by avoiding TCR signaling cascades. To do so, measurements in presence of the pan-Src kinase inhibitor PP2 inhibitor (methods). The contact mechanics were not modified by the presence or absence of peptide on the APC (sup. figure 3.12b), but the peptide induced a larger detachment force (sup. figure 3.12c).

We observed a striking difference in the mechanics of the cell conjugates as witnessed by a sudden change in the force relaxation following cell/cell contact when APCs were loaded with a saturating concentration of antigenic peptides (Figure 3.5b). T cell/APC contact thus induced mechanical changes, within few seconds, and without any biochemical signaling. Furthermore, the smaller amplitude in force relaxation due to T cell-APC contact points toward a more viscous behavior of cells following peptide recognition at the interface between a T cell and an APC, qualitatively consistent with our micropipette experiments.

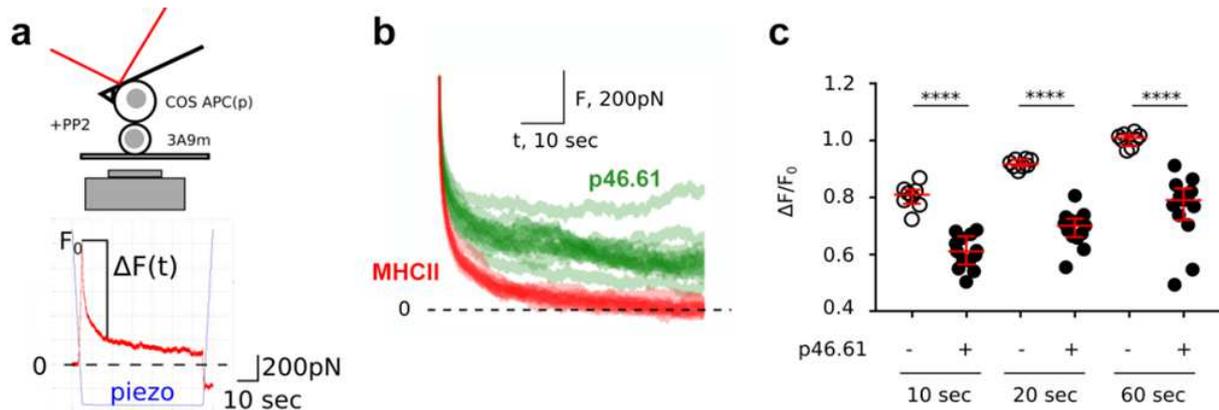


FIGURE 3.5 – Cell-cell presentation induces early changes in force relaxation. (a) AFM SCFC Setup (top) and example of individual force curve (bottom). (b) Relaxation part of force curves, for peptide (p46.61) vs. no-peptide (MHCII) cases. One curve corresponds to one cycle, ie. 1 APC/T cell couple. See suppl. figure 3.12d for plot of mean $\pm$ SD curves. (c) Quantification of the relaxation for three different time points, for MHCII (-) and MHCII/p46.61 (+) cases.

## 1.6 Relationship between elastic and viscous properties during leukocyte activation

We asked if variations in elastic and viscous properties were related to each other, motivated by work showing that in several cell types the loss modulus  $E''$  and storage modulus  $E'$  of a cell do not take on unrelated values but rather respect the fact that their ratio  $\eta = E''/E'$ , the loss tangent, lies within a narrow range of 0.1-0.3 [Kollmannsberger and Fabry, 2011, Maksym et al., 2000, Alcaraz et al., 2003b, Balland et al., 2006, Bursac et al., 2005]. This implies that the stiffer the cell, the more viscous it is. This narrow range of loss tangent is consistent with the conserved ratio of cortical tension to cell viscosity in leukocytes mentioned in introduction. In biological matter, similar to soft glassy materials [Sollich, 1997, Fabry et al., 2003], stress relaxation over time often follows a power-law (with an exponent that we shall call  $\alpha$ ) [Fabry et al., 2003, Alcaraz et al., 2003a, Kollmannsberger and Fabry, 2011, Mahaffy et al., 2004]. The loss tangent as defined by the ratio of loss and storage moduli is frequency-dependent, but expected to be approximately equal to  $\tan \frac{\pi}{2} \alpha$  at low frequencies (see details in suppl. mat. 10). Thus, by measuring the power-law exponent  $\alpha$  independently, we should recover the value of  $\eta = E''/E'$  (which is also equal to  $K''/K'$  as the contribution from geometry is eliminated in this ratio [Smith et al., 2005]). To test this prediction, we performed stress relaxation experiment on resting PLB cells (figure 3.6c) and obtained values for  $\alpha$  very consistent with the predicted value of  $\frac{2}{\pi} \arctan \left( \frac{K''}{K'} \right)$  (which is equivalent to comparing  $\tan \frac{\pi}{2} \alpha$  and  $\frac{K''}{K'}$ , dark green star symbol in Figure 3.6b). We then compared  $K'' - K'$  curves obtained during activation of T cells, B cells, and PLB cells (figure 3.6a); in Figure 3.6b we plot

the corresponding value of  $\alpha = \frac{2}{\pi} \arctan \eta = \frac{2}{\pi} \arctan \left( \frac{K''}{K'} \right)$ . These curves were remarkably consistent for T and B cells; for PLB cells,  $K'' - K'$  curves obtained by indentation in the front and in the back of the cell are very similar, and differ from the T and B cell common curve. Interestingly, Bufi et al. measured storage and loss moduli of various leukocytes in their resting state and after priming by different inflammatory environments [Bufi et al., 2015]. Their data lead to a loss tangent  $\eta$  consistent with our measurements (figure 3.6d). Note that these measurements are made at a single time point, so we looked for other examples in the literature showing a time-dependent loss tangent. Interestingly, Maksym et al. [Maksym et al., 2000] measured both the loss and storage moduli of human airway smooth muscle cells contracting due to administration of histamine. Their data are again very consistent. Roca-Cusachs et al. [Roca-Cusachs et al., 2006] used AFM on neutrophils, and found a loss tangent very consistent with our measurements on PLB cells (figure 3.6d).

## 2 Discussion

We propose a simple model of leukocyte mechanical changes during activation (figure 3.6e) : intracellular rearrangements begin seconds after receptor engagement at the leukocyte surface, the mechanical properties are already altered. Cell morphological changes start few tens of seconds later, concomitant with stiffening and increase in viscosity. Viscous and elastic properties of the leukocyte evolve following a characteristic curve defined by the loss tangent.

The role of these mechanical changes is not clear yet. Cell contractility and cell stiffness are correlated in muscle cells [Wang et al., 2002, MacKay et al., 2012, Wang et al., 2001, Stamenović et al., 2002, Abidine et al., 2018]. And it was reported in fibroblasts [Thoumine et al., 1999] and epithelial cancer cells [Abidine et al., 2018] that cells getting stiffer also get more viscous. Although inner structure of leukocytes differs from these cell types, the increase in stiffness and viscosity that we observe during activation might be a manifestation of conserved cytoskeletal-based properties among mammalian cells.

Even though the molecular details leading to changes in viscoelastic properties are yet to be understood, our observations that cell viscosity increases during leukocyte activation might imply that diffusive properties change during leukocyte activation. Observations of the formation of diffusional barriers could be one manifestation of this increase in viscosity that we observe on the whole cell level [Freeman et al., 2018, Maxson et al., 2018]. Diffusion in the cytoplasm and organelle polarization such as mitochondria in T cells [Quintana et al., 2007] might also be another manifestation of dramatic viscoelastic changes during leukocyte activation. These effect might need to be accounted for in models.

Our study highlights that not only are elastic and viscous properties relevant to understand

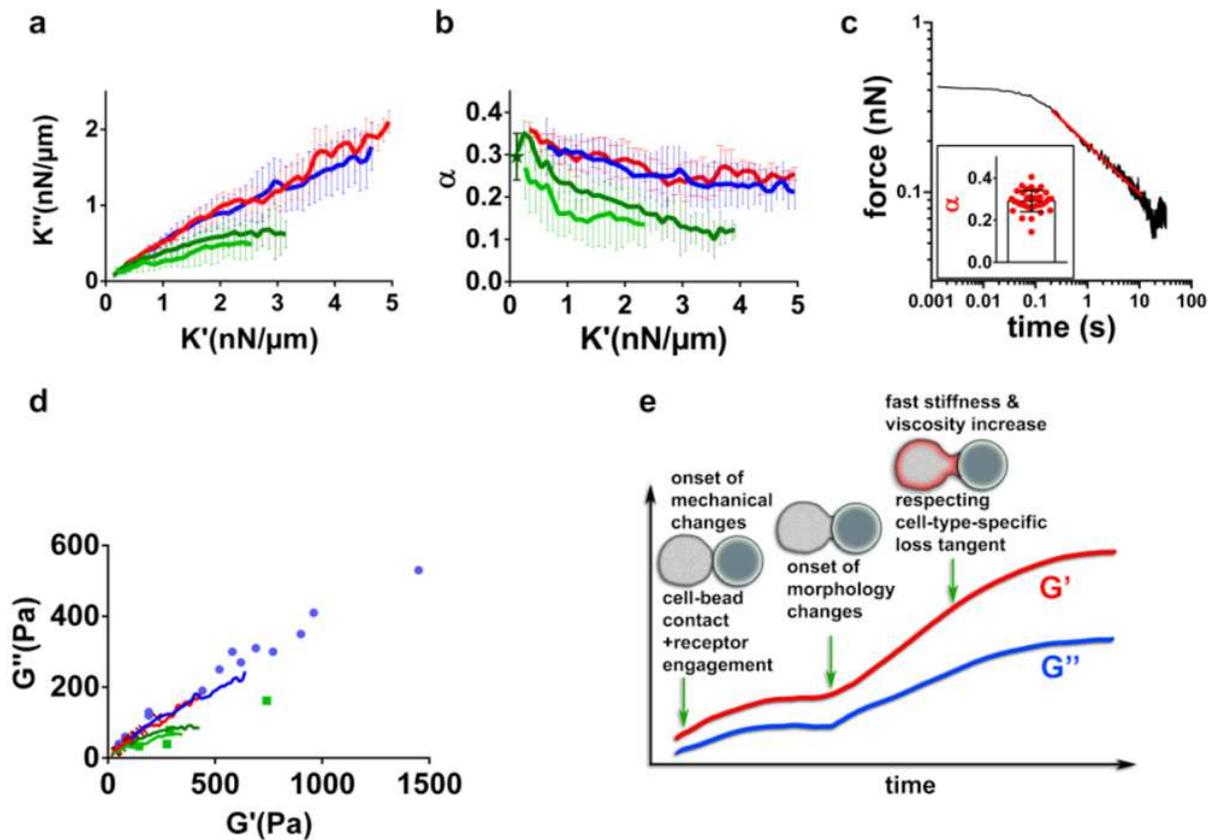


FIGURE 3.6 – Relationship between elastic and viscous cell properties **(a)**  $K''$  vs.  $K'$  during activation of T cells (red), B cells (blue) and PLB cells (front indentation : dark green, back indentation : light green). Error bar are SDs. **(b)**  $\alpha = \frac{2}{\pi} \arctan\left(\frac{K''}{K'}\right)$  corresponding to the same data as in **a**. The dark green star is the value of the power-law exponent in force relaxation experiments on resting PLB cells. **(c)** Example of force relaxation curve of a PLB cell. In the log-log plot, a power-law relaxation is identified by the straight line (red), whose slope is the exponent  $\alpha$ . Inset : individual  $\alpha$  values (cell per dot). **(d)** Loss modulus  $G''$  vs. storage modulus  $G'$  from Bufi et al. (blue dots) [Bufi et al., 2015], Roca-Cusachs et al. 19 (green dots), and Maksym et al. 30 (red crosses). Solid lines correspond to data as in **a**. **(e)** Model.

cell mechanics, but also their relationship in the form of the loss tangent  $\eta$ , and how it evolves over time. All the leukocytes that we tested show very large changes in both elastic and viscous properties, but monitoring the time evolution of the loss tangent exhibits a mechanical fingerprint specific of cell types.

It is tempting to speculate that the evolution of the loss tangent during activation can become a valuable tool to discriminate between healthy and pathological leukocytes as already suggested by considerations of static values of  $\eta$  [Rother et al., 2014]. There is a massive effort aimed at developing new cancer immunotherapies targeting tumor-infiltrating lymphocytes. We speculate that the inhibition of these lymphocytes by the tumor microenvironment can result in

an altered loss tangent and its evolution during activation by a standard stimulus by an antibody-coated microbead.

## 3 Materials and Methods

### 3.1 Micropipette rheometer.

The rheometer was build based on the evolution of our microindentation setup [Guillou et al., 2016a] and Micropipette Force Probe [Guillou et al., 2016b, Sawicka et al., 2017, Basu et al., 2016]. Micropipettes were prepared as described previously [Guillou et al., 2016a, Guillou et al., 2016b, Sawicka et al., 2017, Basu et al., 2016] by pulling borosilicate glass capillaries (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) with a P-97 micropipette puller (Sutter Instruments, Novato, CA, USA), cutting them with an MF-200 microforge (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) and bending them at a  $45^\circ$  angle with an MF-900 microforge (Narishige, Tokyo, Japan). Micropipettes were held by micropipette holders (IM-H1, Narishige) placed at a  $45^\circ$  angle relative to a horizontal plane, so that their tips was in the focal plane of an inverted microscope under brightfield or DIC illumination (Tcells : TiE, PLB cells : Ti2, Nikon Instruments, Tokyo, Japan) equipped with a  $100\times$  oil immersion, 1.3 NA objective (Nikon Instruments) and placed on an air suspension table (Newport). The flexible micropipette was linked to a non-motorized micropositioner (Thorlabs, Newton, NJ, USA) placed on top of a single-axis stage controlled with a piezo actuator (TPZ001; Thorlabs). The bending stiffness  $k$  of the flexible micropipette (about  $0.2 \text{ nN}/\mu\text{m}$ ) was measured against a standard microindenter previously calibrated with a commercial force probe (model 406A; Aurora Scientific, Aurora, ON, Canada). Once the activating microbead was aspirated by the flexible micropipette, the cell held by the stiff micropipette was brought in adequate position using a motorized micromanipulator (MP-285; Sutter Instruments). Experiments were performed in glass-bottom Petri dishes (Fluorodish, WPI, Sarasota, FL, USA). Images were acquired using a Flash 4.0 CMOS camera (for T cells), or a SPARK camera (PLB cells), both from Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan. In order to perform rheological experiments, the setup automatically detects at a rate of 400-500 Hz the position of the bead at the tip of the force probe and imposes the position of the base of the flexible micropipette by controlling the position of the piezo stage. The deflection of the force probe is the difference between the position of the bead and the position of the piezo stage. The force applied to the cell is the product of this deflection by the bending stiffness  $k$ . A retroaction implemented in Matlab (Mathworks) controlling both the camera via the Micromanager software [Edelstein et al., 2015] and the piezo stage moves the latter in

reaction to the measurement of the bead position in order to keep a desired deflection of the cantilever. This way a controlled force is applied to the cell at any given time. Experiments were performed at room temperature to avoid thermal drift. Qualitative behavior of T cell and PLB cells is unchanged at 37 °C (not shown). We quantified the fluid drag due to micropipette translation (sup. mat. 11) and the potential effect of fast cell deformation on our rheological measurements (sup. mat. 12). *Data analysis.* Rheological measurements were analyzed by post-processing using a custom Python code. During force modulation sinusoidal xtip signal was fitted every 0.5-1 period interval over a window that was 1.5-2.5 period long (i.e. every 0.5-1 second with a window of 1.5-2.5 seconds for a frequency of force modulation  $f = 1$  Hz) using a function equal to a linear trend with an added sinusoidal signal (2 free parameters for the linear trend, two for the sinusoidal signal when imposing the frequency  $f = 1$  Hz). Best fit was determined using classical squared error minimization algorithm.

### 3.2 T cells and activating beads

**Cell and reagents.** Mononuclear cells were isolated from peripheral blood of healthy donors on a ficoll density gradient. Buffy coats from healthy donors (both male and female donors) were obtained from Etablissement Français du Sang (Paris, France) in accordance with INSERM ethical guidelines. Human total CD4+ isolation kit (Miltenyi Biotech, 130-096-533) was used for the purification of T cells. Isolated T-cells were suspended in FBS :DMSO (90% :10% vol/vol) and kept frozen in liquid nitrogen. One to seven days before the experiment the cells were thawed, mixed with preheated complete medium, washed once, and then kept in the complete medium at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, at a concentration of  $\sim 10^6$  cells/ml. Experiments were performed in RPMI 1640 with GlutaMax, supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin (all from Life Technologies ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), and filtered with (0.22  $\mu$ m diameter-pores, MerckMillipore).

**Beads.** Dynabeads Human T-activator CD3/CD28, were purchased from Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA).

### 3.3 PLB-985 cell line and activating beads

**Cells and reagents.** The human acute myeloid leukemia cell line was cultured in RPMI 1640 1X GlutaMax (Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 1% penicillin/streptomycin, and filtered using a 0.22  $\mu$ m-diameter pore filter (MerckMillipore). Cells were passaged twice a week and differentiated into a neutrophil-like phenotype by adding 1.25 % (v/v) of dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) to the cell suspension the first day after passage and, in a second time, three days after with changing the culture media. Before ex-

periments, 2000 U/ml IFN- $\gamma$  (Immuno Tools) was added into the cell culture flask, cells were centrifuged for 3 min at 300g and resuspended in filtered HEPES medium (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES pH 7.4, 1.8 mg/mL glucose, and 1% heat-inactivated FBS). The medium was filtered using a 0.22  $\mu$ m-diameter pore filter (Merck-Millipore).

**Beads.** 20- $\mu$ m diameter polystyrene microbeads at 10<sup>6</sup> beads/mL (Sigma-Aldrich) were washed three times by centrifugation at 16000 g for 3min and resuspended in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, Gibco) filtered with 0.22  $\mu$ m diameter-pores (MerckMillipore). Beads were then incubated overnight at room temperature with 5% (w/v) Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma-Aldrich) in DPBS. Beads were washed three times by centrifugation at 16000 g during 3min, resuspended in DPBS, and incubated with 1 :500e anti-BSA rabbit antibody at 3.5 mg/mL (Sigma-Aldrich) in DPBS for an hour at room temperature. Beads were washed three times by centrifugation at 16000g for 3 min with DPBS and resuspended in DPBS at 10<sup>6</sup> beads/mL.

### 3.4 B cells and activating beads.

**B cells.** Primary B lymphocytes were isolated from spleens of adult (10- to 20-week-old), purified by negative selection using mouse pan-T Dynabeads (DynaI Biotech, Invitrogen) in the total splenocytes obtained after a Lympholyte step (Cedarlane Laboratories); enrichment was >90% B cells. Animal procedures were approved by the CNB-CSIC Bioethics Committee and conform to institutional, national and EU regulations. Cells were cultured in complete RPMI (10 mM HEPES, 2 mM L-Glu and 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol) supplemented with 10% FCS.

**Beads.** Silica beads (5 x 10<sup>6</sup>; 5  $\mu$ m diameter; Bangs Laboratories) were washed in distilled water (5,000 rpm, 1 min, RT), and incubated with 20  $\mu$ l 1,2-dioleoyl-PC (DOPC) liposomes containing GPI-linked mouse ICAM-1 (200 molecules/ $\mu$ m<sup>2</sup>) and biotinylated lipids (1000 molecules/ $\mu$ m<sup>2</sup>) (10 min, RT), and washed twice with beads-buffer (PBS supplemented with 0.5% FCS, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, and 0.5 g/L D-Glucose). Then, lipid-coated beads were incubated with AF647-streptavidin (Molecular Probes) (20 min, RT) followed by biotinylated rat anti- $\kappa$  light chain antibody (clone 187.1, BD Biosciences) (20 min, RT), used as surrogate antigen (su-Ag) to stimulate the B cell receptor. Control beads were coated with ICAM-1-containing lipids only (no su-Ag was added). The number of molecules/ $\mu$ m<sup>2</sup> of ICAM-1 and su-Ag/biotin-lipids was estimated by immunofluorometric assay using anti-ICAM-1 or anti-rat-IgG anti-bodies, respectively; the standard values were obtained from microbeads with different calibrated IgG-binding capacities (Bang Laboratories). The lipid-coated silica beads were finally resuspended in complete RPMI.

### 3.5 Atomic Force Microscope and Single Cell Force Spectroscopy

**Cells and reagents.** 3A9m T cells were obtained from D. Vignali [Vignali and Strominger, 1994] and cultured in RPMI completed with 5 % FBS, 10 mM Hepes, 10mM Sodium Pyruvate in 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere. COS-7 APCs were generated as previously described [Salles et al., 2013] by stably co-expressing the  $\alpha$  and the  $\beta$  chains of the mouse MHC class II I-Ak , cultured in DMEM (5 % FBS, 1mM Sodium Pyruvate, 10 mM hepes, and geneticin 10 $\mu$ g/ml). Original COS-7 cells were obtained from ATCC stocks and cultured in DMEM supplemented with 5 % FBS, 1 % sodium pyruvate, 1 % hepes, in 10 % CO<sub>2</sub>, 37°C. When needed for selection, puromycin was added to 0.25g/ml. They were passaged up to three times a week by treating them with either Trypsin/EDTA or PBS 1X (w/o Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>), 0.53mM EDTA at 37°C for up to 5 min. The anti CD45 antibodies used for this study were produced from the hybridoma collection of the CIML (namely H193.16.3). Briefly, cells were routinely grown in complete culture medium (DMEM, 10% FBS, 1mM sodium pyruvate) prior to switching to the expansion and production phase. Hybridomas were then cultured in DMEM with decreasing concentrations of low immunoglobulin fetal bovine serum down to 0.5%. Cells were then maintained in culture for 5 additional days enabling immunoglobulin secretion prior to supernatant collection and antibody purification according to standard procedures. The expression of TCR and CD45 molecules on T cells and MHC II molecules on COS-7 APC was assessed once a week on flow cytometer (anti-TCR PE clone H57.597, anti-CD45 Alexa Fluor 647 clone 30F11 were purchased from BD Pharmingen). The count and the viability, with Trypan blue, were assessed automatically twice by using Luna automated Cell Counter (Biozym scientific). Mycoplasma test was assessed once a month. Culture media and PBS were purchased from Gibco (Life Technologies). PP2 (Lck inhibitor) was purchased from Calbiochem.

**T Cell immobilization.** Culture treated, sterile, glass bottom Petri dishes (World Precision Instruments Fluorodish FD35-100) were incubated with 50 $\mu$ g/ml anti-CD45 antibody for 1 hour at room temperature. The surfaces were extensively washed with PBS 1X prior to a last wash with HBSS 1X 10 mM Hepes. The surfaces were kept wet with HBSS 1X 10 mM Hepes before seeding T cells.

**T cell preparation.** T cells were counted, spinned and resuspended in HBSS 1X 10 mM Hepes and were kept 1 hour at 37 °C 5% CO<sub>2</sub> for recovery prior to seeding. The cells were seeded at room temperature and after 30 minutes a gentle wash was done by using two 1mL micropipettes in order to maintain, as much as possible, a constant volume in the Petri dish and hence avoid perturbations by an important flow. After 1 hour incubation the Petri dish was mounted in a Petri dish Heater system (JPK Instruments) to maintain the temperature of the sample at 37°C. 10 minutes before experiments, 10 $\mu$ M (final concentration) of Lck kinase inhibitor, PP2 drug was added and homogenised in the sample. We kept this drug present all

along the experiments.

**COS-7 APC preparation.** The day before, cells were incubated with the peptide of interest with a final concentration of  $10\mu\text{M}$  allowing 100% occupation (binding with) of MHC II molecules. Before the experiment the cells were detached from the cell culture plates by removing the cell medium, wash once with PBS 1X and then by a  $0,53\text{mM}$  EDTA treatment for 5 minutes at  $37^\circ\text{C}$  10%  $\text{CO}_2$ . The cells were resuspended in HBSS 1X  $10\text{mM}$  Hepes and were allowed to recover before to be seeded into the sample. The peptide p46.61 (which is CD4 dependent) was purchased from Genosphere with a purity  $> 95\%$ .

**AFM setup.** The setup has been described in great details elsewhere [Cazaux et al., 2016]. Measurements were conducted with an AFM (Nanowizard I, JPK Instruments, Berlin) mounted on an inverted microscope (Zeiss Axiovert 200). The AFM head is equipped with a  $15\mu\text{m}$  z-range linearised piezoelectric scanner and an infrared laser. The set-up was used in closed loop, constant height feedback mode [Puech et al., 2006]. Bruker MLCT gold-less cantilevers (MLCT-UC or MLCT-Bio DC) were used in this study. The sensitivity of the optical lever system was calibrated on the glass substrate and the cantilever spring constant by using the thermal noise method. Spring constant were determined using JPK SPM software routines in situ at the start of each experiment. The calibration procedure for each cantilever was repeated three times to rule out possible errors. Spring constants were found to be consistently close to the manufacturer's nominal values and the calibration was stable over the experiment duration. The inverted microscope was equipped with 10x, 20xNA0.8 and 40xNA0.75 lenses and a CoolSnap HQ2 camera (Photometrics). Bright field images were used to select cells and monitor their morphology during force measurements through either Zen software (Zeiss) or  $\mu\text{Manager}71$ .

**APC/T cell force measurements. Lever decoration.** To render cantilever strongly adhesive, we used a modified version of our previous protocols [Franz et al., 2007]. Briefly, gold-less MLCT cantilevers were activated using a 10min residual air plasma exposure then dipped in a solution of  $0.25\text{mg/mL}$  of Wheat Germ Agglutinin (WGA) or  $0.5\text{ mg/mL}$  of Concanavalin A in PBS for at least 1 hour. They were extensively rinsed by shaking them in  $0.2\mu\text{m}$  filtered PBS 1x, stored in PBS 1x at  $4^\circ\text{C}$  and used over a week. Before being mounted on the glass block, they were dipped in MilliQ-H<sub>2</sub>O in order to avoid the formation of salt crystals in case of drying and hence alter the reflection of the laser signal. APC capture. Using side view and micropipette techniques, we observed that this (i) allows the presented cell to be larger than the lever tip, excluding any unwanted contact of T cell with WGA and (ii) that the binding is resistant enough to ensure that any rupture event recorded is coming from the cell/cell interface (suppl. figure 3.13). After calibration, such a lectin-decorated lever is pressed on a given COS7 cell for 20 to 60 seconds with a moderate force (typically 1-2nN), under continuous transmission observation. Then, the lever is retracted far from the surface and the cell is let to recover and

adhere/spread for at least 5 minutes before starting the experiments. SCFS experiment. The surrogate APC is then positioned over a desired T cell. Thanks to the fact that the lever is not coated with gold, one can use transmission to position finely the probe over the target. Force curves are then recorded using the following parameters : max contact force 1nN, speeds  $2\mu\text{m}/\text{sec}$ , acquisition frequency 2048 Hz, curve length  $10\mu\text{m}$  and contact time 60 sec. At the end of the retraction, lateral motion of the cells is made by hand until no more force is recorded by the lever, signaling that full separation was achieved (suppl. figure 3.13b). One APC cell was used to obtain one force curve on at least three different T cells, and 3 APCs at least were used for each condition. No apparent bias was detected in the data when carefully observing the succession of the measures for a given APC, for a given lever and for a set of T cells. *Data processing & Statistics.* Force curves were analyzed using JPK Data Processing software on a Linux machine. Each curve was processed manually, except for calculation and plotting of  $\text{mean}\pm\text{SD}$  for relaxation curves where ad-hoc python scripts were used. Data were processed using Graphpad Prism (v7) on a Windows 7 machine. On graphs, data are presented as scatter dot plots with median and interquartile range. A data points correspond to force curve obtained for a given couple T cell/APC, except for the small detachment events where one data point correspond to one such event (all events were pooled). Significance was assessed using Mann-Whitney tests in GraphPad Prism v7 with  $p<0.05$  \*,  $<0.01$  \*\*,  $<0.001$  \*\*\*, and \*\*\* below ; not significant otherwise.

## 4 Supplementary Material

### 4.1 Supplementary material || Measuring initial cell Young's modulus.

The Hertz model [Johnson, 1985] leads to the following relationship between the applied compressive force and cell indentation  $\delta$  :  $F = \frac{4}{3} \frac{E_{\text{Young}}}{1 - \nu^2} \sqrt{R_{\text{eff}}} \delta^{\frac{3}{2}}$ , where  $E_{\text{Young}}$  is the effective Young's modulus of the cell,  $R_{\text{eff}}$  is an effective radius given by  $\frac{1}{R_{\text{eff}}} = \frac{1}{R_{\text{cell}}} + \frac{1}{R_{\text{bead}}}$ , with  $R_{\text{cell}}$  the cell's radius and  $R_{\text{bead}}$  the bead radius,  $\nu$  is the Poisson ratio of the cell taken as 0.5, i.e. the cell is considered incompressible [Wu et al., 2018, Moendarbary et al., 2013]

### 4.2 Supplementary material | Complex stiffness.

We apply a force  $F(t) = \langle F \rangle + \Delta F \cos(\omega t)$  to the leukocyte (angular frequency  $\omega = 2\pi f$ , frequency  $f = 1$  Hz) and we measure a resulting oscillatory change in position of the tip of the flexible micropipette  $x_{\text{tip}}(t) = \langle x_{\text{tip}} \rangle + \Delta x_{\text{tip}} \cos(\omega t - \varphi)$ , of average value  $\langle x_{\text{tip}} \rangle$ , amplitude  $\Delta x_{\text{tip}}$ , and phase lag  $\varphi$ . We consider a complex formalism where the force writes  $F^*(t) = \langle F \rangle + \Delta F e^{i\omega t}$  and the tip position  $x_{\text{tip}}^*(t) = \langle x_{\text{tip}} \rangle + \Delta x_{\text{tip}} e^{i(\omega t + \varphi)}$ . We then define the complex stiffness  $K^*$  by writing  $F^*(t) - \langle F \rangle = K^*(x_{\text{tip}}^*(t) - \langle x_{\text{tip}} \rangle)$ , this leads to  $\Delta F e^{i\omega t} = K^* \Delta x_{\text{tip}} e^{i(\omega t + \varphi)}$  where we can divide both terms of the equality by the complex exponential term  $e^{i\omega t}$  to get  $\Delta F = K^* \Delta x_{\text{tip}} e^{i\varphi}$ . Now by multiplying both terms of the equality by  $e^{-i\varphi}$ , decomposing terms in their real and imaginary part ( $K^* = K' + iK''$  and  $e^{i\varphi} = \cos \varphi + i \sin \varphi$ ), and equating real and imaginary parts we obtain two relationships :

$$\Delta F \cos \varphi = K' \Delta x_{\text{tip}} \text{ and } \Delta F \sin(-\varphi) = K'' \Delta x_{\text{tip}} \text{ finally leading to :}$$

$$K' = \Delta F / (\Delta x_{\text{tip}}) \cos \varphi$$

$$K'' = \Delta F / (\Delta x_{\text{tip}}) \sin(-\varphi)$$

Note that  $\varphi$  is negative so that  $-\varphi$  is positive, and so is  $K''$ .

### 4.3 Supplementary material | Validation with red blood cells.

We measured large viscous components in leukocytes ( $K''$  lower but comparable to  $K'$ , and large equivalent viscosities, figure 3.2). These were measured based on the phase lag  $\varphi$  between the applied force and the resulting deformation of the cell. In order to validate our technique against a consensually well-characterized cell type, we applied it to red blood cells (RBCs). There are several models of RBC stiffness (quantified by  $K'$ ) aspirated by a micropipette, which were used when the RBC was used as a spring in a Biomembrane Force Probe (BFP) [Evans et al., 1995, Simson et al., 1998, Heinrich and Ounkomol, 2007]; these models

were recently compared by Ju and Zhu [Ju and Zhu, 2017]. Human RBCs (or pig RBCs as tested here) are devoid of nucleus and of the complex and space-occupying organelles present in leukocytes, so we expected the viscous part of RBC complex stiffness to be comparatively much smaller than in a leukocyte. We quantified both  $K'$  and  $K''$  in RBCs aspirated in a micropipette with a controlled aspiration pressure (sup. figure 3.7). In the BFP a bead is stuck at the tip of the red blood cell. The corresponding model requires measurement of the geometry of the RBC (outer diameter, diameter inside micropipette), and RBC-bead contact radius. In our case the indenting bead played the role of the BFP bead. As the RBC-bead contact radius is difficult to measure accurately with light microscopy, we took the value given by the Hertz model knowing the applied compressive force and the shape of the indenter and the RBC under no force. We obtained a good agreement between the measured  $K'$  and the predicted  $K'$  (within  $\sim 20\%$ , sup. figure 3.7). Values for  $K''$  were very low, and did not increase with increasing  $K'$  as opposed to what we saw in leukocytes (sup. figure 3.7c). These experiments confirm that the large viscous components of leukocyte complex stiffness are due to actual viscous behavior, which as expected is absent when measuring RBCs.

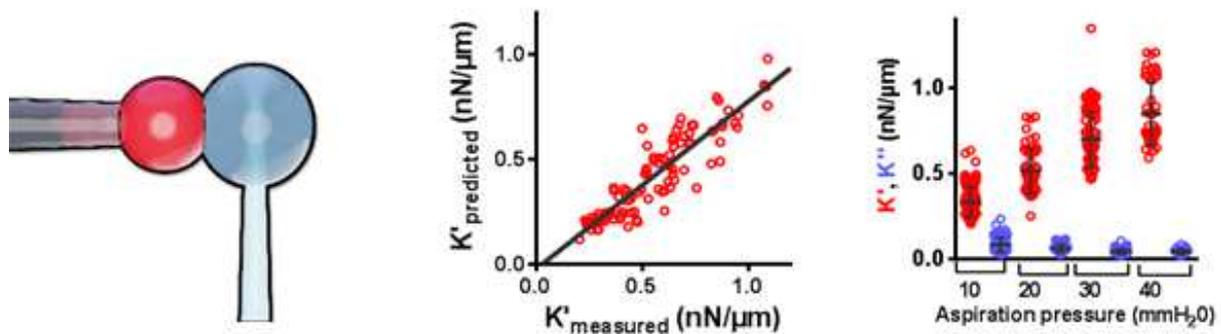


FIGURE 3.7 – Supplementary figure | Viscoelastic properties of red blood cells. (a) A red blood cell (RBC) is held by a rigid micropipette (left) under a controlled aspiration pressure. A glass microindenter is used to apply an oscillatory force to the RBC. (b) Predicted  $K'$  vs measured  $K'$ . A linear fit of the data leads to predicted  $K'_{\text{predicted}} = 0.80K'_{\text{measured}} - 0.02 \text{ nN}/\mu\text{m}$  ( $n=3$  experiments,  $N=18$  cells, each dot is mean of 3 oscillation periods repeated over the same cell). (c) Elastic ( $K'$ ) and viscous ( $K''$ ) part of aspirated RBCs as a function on the aspiration pressure applied in the holding micropipette. Error bars are standard deviations (SD).

#### 4.4 Supplementary material | Measuring initial storage modulus $E'$ and loss modulus $E''$ .

From the initial compression of the cell by the bead, when the leukocyte is still round, we use the Hertz model (see methods in main text) to measure the Young's modulus of the cell. To extract  $E'$  and  $E''$  from the first seconds of application of force modulation, we use a

linearization of the Hertz model as done elsewhere [Cheng et al., 2006a, Mahaffy et al., 2004, Carmichael et al., 2015, Cai et al., 2017, Smith et al., 2005, Lee et al., 2011a] leading to :

$E' \frac{1 - \nu^2}{2} \frac{K'}{\sqrt{R_{eff} \langle x_{tip} \rangle}}$  and  $E'' \frac{1 - \nu^2}{2} \frac{K''}{\sqrt{R_{eff} \langle x_{tip} \rangle}}$ , where  $K' = \frac{\Delta F}{\Delta \delta} \cos \varphi$  and  $K'' = \frac{\Delta F}{\Delta} \delta \sin |\varphi|$ , where  $\Delta F$  is the force amplitude,  $\Delta x_{tip}$  the resulting oscillation amplitude, and  $\varphi$  the phase lag,  $\nu$  the Poisson ratio of the cell taken as 0.5, and  $R_{eff}$  the effective radius of the indenting bead-cell system (sup. mat. 1).

#### 4.5 Supplementary material | Measuring an effective Young's modulus during activation.

Beyond the values of  $E_{Young}$  (sup. mat. 1), measuring their equivalent Young's modulus over time requires to model the geometry of cells in a way that is adapted to each cell type. Below we do so for T cells and B cells, but for PLB cells we avoid this modeling by using the modified setup described in figure 3.10(a) in main text and further explain this approach below.

*Deducing an equivalent Young's modulus from  $E'$ .* We compared  $E_{Young}$  and  $E'$  measured at initial time for T cells, B cells, and PLB cells.  $E'$  is correlated with, but 1-2 fold larger than  $E_{Young}$ ; we introduce a cell type-dependent constant  $C$  such that  $E' = CE_{Young}$ ;  $C$  is  $1.6 \pm 0.1$  for CD4, and  $1.8 \pm 0.1$  for B cells. For PLB cells, we used the alternative setup to indent the phagocyte on its "back" used in a cyclic way (see figure 3.10(a) and main text), which allowed us to measure directly a Young's modulus over time every 30 seconds (dotted curve in figure 3.2l). This lead to a coefficient  $C = 1.12 \pm 0.02$  for PLB cells valid even during activation. We assumed that as in the case for PLB cells, we could consider that the factor  $C$  was constant over time in the case of T and B cells. Using this approach, we measured the effective Young's modulus of the three cell types over time (figure 3.2j-1).

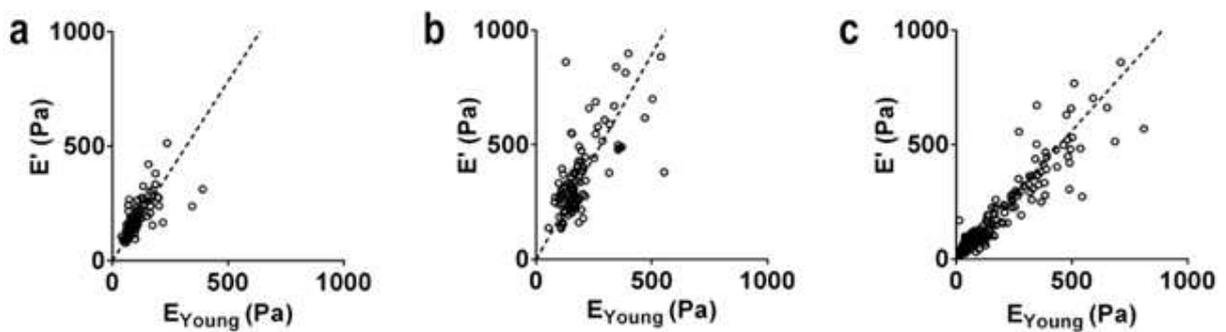


FIGURE 3.8 – Supplemental figure | The equivalent modulus  $E'$  is proportional to the Young's modulus  $E_{Young}$  :  $E' = CE_{Young}$ , where  $C = 1.6 \pm 0.1$  for T cells (a),  $1.8 \pm 0.1$  for B cells (b), and  $1.12 \pm 0.02$  for PLB cells (c).

**T cells.** During first minutes of activation, T cells develop a cylindrical protrusion [Sawicka et al., 2017]. We model the whole cell as a cylinder, which leads to  $E_{\text{Young}}^{eq} = \frac{1}{C} K' \frac{L}{S}$ , where  $L$  is the cell length,  $S$  the section of the cylinder, and  $C = 1.6$  the correction factor described above to convert  $E'$  in  $E_{\text{Young}}^{eq}$ . The resulting equivalent Young's modulus (figure 3.2j) increases until reaching a maximal value that is  $4.7 \pm 2.6$  times its initial value, consistent with the increase in  $K'$  (figure 3.2d).

**B cells.** During activation, B cells remain more round than T cells, but still change in length and losing the initial cell length makes the Hertz model difficult to use. We thus considered two different estimates for the equivalent Young's modulus  $E_{\text{Young}}^{eq}$ .

**PLB cells.** Activating PLB cells spread on their target (figure 3.2c), requiring yet another model. In order to be able to apply the Hertz model, we used a modified setup where a non-adherent glass bead indents the cell on its "back" (figure 3.3a) while the cell phagocytoses the microbead at its "front". The measured  $K'$  and  $K''$  led to the same  $K'_{max}/K'_{init}$  and  $K''_{max}/K''_{init}$  ratios as those obtained with front indentation (figure 3.3b). Of note, to compare increase in  $K'$  with increase in cell tension reported by others [Lam et al., 2009, Evans and Zhelev, 1993, Herant et al., 2005], in supplemental material 8 we show that an increase in tension reflects an increase in  $K'$ .

*First approximation.* Starting from the storage modulus  $E' \sim \frac{1 - \nu^2}{2} \frac{K'}{\sqrt{R_{eff} \langle x_{tip} \rangle}}$ , we considered the relationship given by the Hertz model between the average force  $\langle F \rangle$  and average indentation  $\langle \delta \rangle$ :  $\langle F \rangle = \frac{4}{3} \frac{E_{\text{Young}}}{1 - \nu^2} \sqrt{R_{eff}} \langle \delta \rangle^{\frac{3}{2}}$ , and substituted the resulting expression for  $\langle \delta \rangle$ , obtaining:  $E_{\text{Young}}^{eq} = (1 - \nu^2) \left( \frac{K'}{C} \right)^{\frac{3}{2}} \left( \frac{1}{6 R_{eff} \langle F \rangle} \right)^{\frac{1}{2}}$ , where the correction factor  $C$  ( $C = 1.8$  for B cells) was described above. The deduced  $E_{\text{Young}}^{eq}$  at contact time was much higher than the Young's modulus measured using constant-speed indentation, and careful data inspection showed that after the maximal force of 120 pN during initial compression was reached and after the force switched to the force modulation mode with a compressive average force of 60 pN, the indentation did not decrease as much as predicted by the Hertz model. This can be due to several effects, including adhesion, complex visco-elasto-plasticity [Guillou et al., 2016b] or poroelasticity [Moeendarbary et al., 2013].

*Second approximation.* In a second approximation we considered that the indentation measured over the first few periods of application of the oscillatory force was constant over time  $E_{\text{Young}}^{eq} \sim \frac{1 - \nu^2}{2} \frac{K'}{\sqrt{R_{eff} \langle x_{tip} \rangle}}$ , where  $\langle x_{tip} \rangle$  was maintained constant and equal to its initial value. This approximation is an underestimate of  $E_{\text{Young}}^{eq}$  because  $\langle x_{tip} \rangle$  under a given force de-

creases when cell stiffness increases. This estimate matched the initial value of the Young's modulus, and led to a time evolution comparable to values obtained in T cells (Figure 3.2).

#### **4.6 Supplementary material | Spatial localization of viscoelastic changes.**

We asked in mechanical changes in T cells during activation were localized close to the cell-bead contact area. We used a modified setup, where an auxiliary pipette brings the activating microbead in contact with the cell at its “side” : at the equatorial plane (distance between the activating and indenting beads smaller than  $5 \mu\text{m}$ ), or close to the tip of the holding pipette, at the farthest possible location from the activating bead (distance between the activating and indenting beads larger than  $5 \mu\text{m}$ , sup. figure 3.3). We computed an equivalent Young's modulus  $E_{\text{Young}}^{\text{eq}}$  as described previously, which led to good agreement with  $E_{\text{Young}}$  measured at the initial time. T cells exhibited different behavior depending on the location of the activating microbead : the closer the indenter was to the activating bead, the larger the maximum value of  $E_{\text{Young}}^{\text{eq}}$  measured during activation. Cell stiffening thus occurs with a different amplitude depending on the location on the cell relative to the contact zone with an activating surface.

#### **4.7 Supplementary material | Cell stiffness increases before membrane surface stores are exhausted.**

In T cells, at the onset of the faster increase in  $K'$ , the apparent cell surface area as measured optically by transmitted light optical microscopy has only expanded by 5% relative to its initial value. Cell surface area further expands, up to 11% (figure 3.5d) when the cell protrusion is at its largest (sup. figure 3.10 ). This increase of 11% is smaller than the 13% that we previously reported as a “slack” or reserve after which cell effective stiffness starts increasing due to progressive exhaustion of surface membrane stores [Guillou et al., 2016b]. We conclude that the increase in  $K'$  is not directly linked to a limited amount of membrane surface reservoirs, at least not in the early moments of activation.

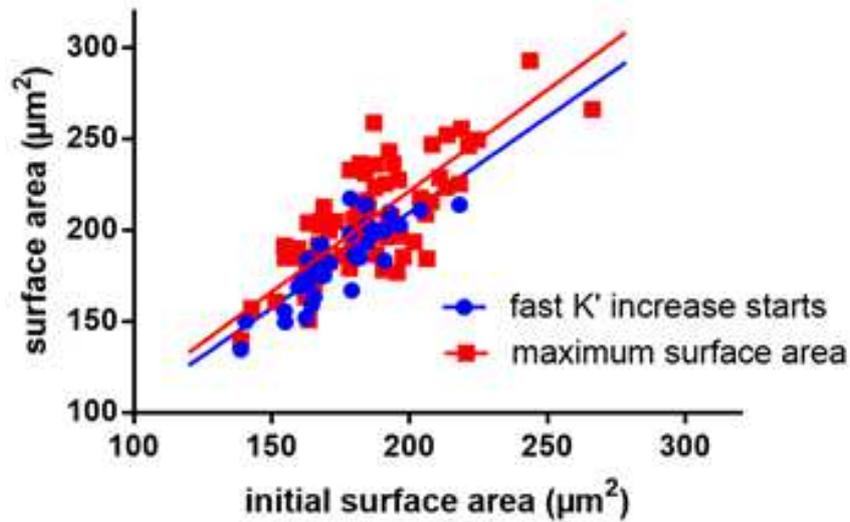


FIGURE 3.10 – Supplementary figure | Total apparent cell surface area at two different moments. In blue : apparent surface area when  $K'$  starts increasing faster vs initial apparent cell surface area of the cell. The straight blue line is a linear fit of slope  $1.05 \pm 0.01$ . In red : maximal apparent surface area vs initial apparent cell surface area of the cell. The straight blue line is a linear fit of slope  $1.11 \pm 0.01$ .

#### 4.8 Supplementary material | Increase in stiffness corresponds to an increase in cell tension.

The moment at which  $K'$  starts increasing more rapidly corresponds to the moment at which the tail of the cell in the holding micropipette starts retracting (sup. figure 3.11), which is a consequence of an increase in cell tension. Indeed, when modelling the cell as having a cortical tension (as described in the liquid core-cortical shell model of leukocytes [Sens and Plastino, 2015]), the moment at which the recoil happens is the moment when cell tension  $T$  exceeds the level that can be equilibrated by the aspiration pressure inside the micropipette holding the cell. The so-called critical pressure relative to the exterior of the micropipette that is needed to aspirate the tail in the micropipette up to a length equal to the pipette diameter is given by the Laplace law [Yeung and Evans, 1989] :  $\Delta P_c = 2T \left( \frac{1}{R_{pipette}} - \frac{1}{R_{cell}} \right)$ . This is an underestimate of the cell tension (we use the term cell tension, which is a combination of membrane tension and cortical tension) that keeps increasing during the recoil process. Cell stiffness  $K'$  and tension can be link [Sens and Plastino, 2015]. The balance between the external pressure and the pressure applied by the indenter on the side, and the cell internal pressure and its tension on the other side (similar to the calculation by Rosenbluth et al. [Rosenbluth et al., 2006b] can lead as done by Cartagena-Rivera et al. [Cartagena-Rivera et al., 2016] to  $K' = \pi\gamma$ . At the moment at which the cell starts its retrac-

tion from the holding pipette, we measure  $K' = 0.9 \pm 0.4 \text{ nN}/\mu\text{m}$  for T cells. This provides a first estimation of cell tension  $T = K'/\pi = 0.28 \text{ nN}/\mu\text{m}$ . On the other hand, Laplace law applied at the moment the cell starts its retraction leads to  $P_{cell} = P_{ext} + 2T \left( \frac{1}{R_{pipette}} - \frac{1}{R_{cell}} \right)$ ,

so that numerically  $T \sim \frac{1}{2(0.6 - 0.3) \mu\text{m}^{-1}} \frac{60 \text{ Pa}}{\mu\text{m}^{-1}} \sim 0.3 \text{ mN}/\text{m}$ , in excellent agreement with the previous estimate of cell tension [Lam et al., 2009, Evans and Zhelev, 1993, Herant et al., 2006, Herant et al., 2005], confirming that that  $K'$  is an appropriate indicator of cell tension.

#### 4.9 Supplementary material | Cell-cell contact mechanics measured with AFM

We immobilized 3A9 murine CD4+ T cell hybridomas on an aCD45-coated surface which density does not prevent efficient activation of the T cells by soluble aCD3 or peptide loaded APCs in suspension (not shown). To prevent the rise of signaling cascades, our measurements were performed in presence of the pan-Src kinase inhibitor PP2. In addition our surrogate APCs have been extensively documented to be devoid of co-stimulation and adhesion molecule that could interfere with TCR/pMHC interactions [Klickstein et al., 1996, Seder et al., 1994]. The contact mechanics was, as expected, not modified by the presence or absence of peptide on the APC : the slopes of force vs. tip sample separation are essentially the same (sup. figure 3.12b). Then, by measuring the forces during the separation of APC and T cell, we observed that the maximal detachment force (sup. figure 3.13c), in parallel with the observed number (sup. figure 3.13c) of the small detachment event was significantly increased when a peptide was present, with an effect shown to be peptide dependent, but the magnitude of these events (sup. figure 3.13c) was essentially not, in agreement with what was observed before in single molecule experiments<sup>28</sup>. The forces for the small event, potentially single pMHC/TCR detachments, were on the same range as the one reported earlier. The force we called “offset” (sup. figure 3.13c), that we observed due to our limited pulling range, was also peptide dependent, indicating that non detached molecules were present and that their number was influenced by the peptide, in line with the previous observation on the number of small events which number is then an underestimate of the number of molecular bridges to be separated upon cell/cell detachment. Of note, we never observed detachment occurring at the interfaces between aCD45/T cell and/or lectin/APC, the cells being essentially immobile even when we used large relative, lateral displacement to achieve full separation at the end of the SCFS cycle. All of these elements support the peptide specificity of our SCFS experiments.

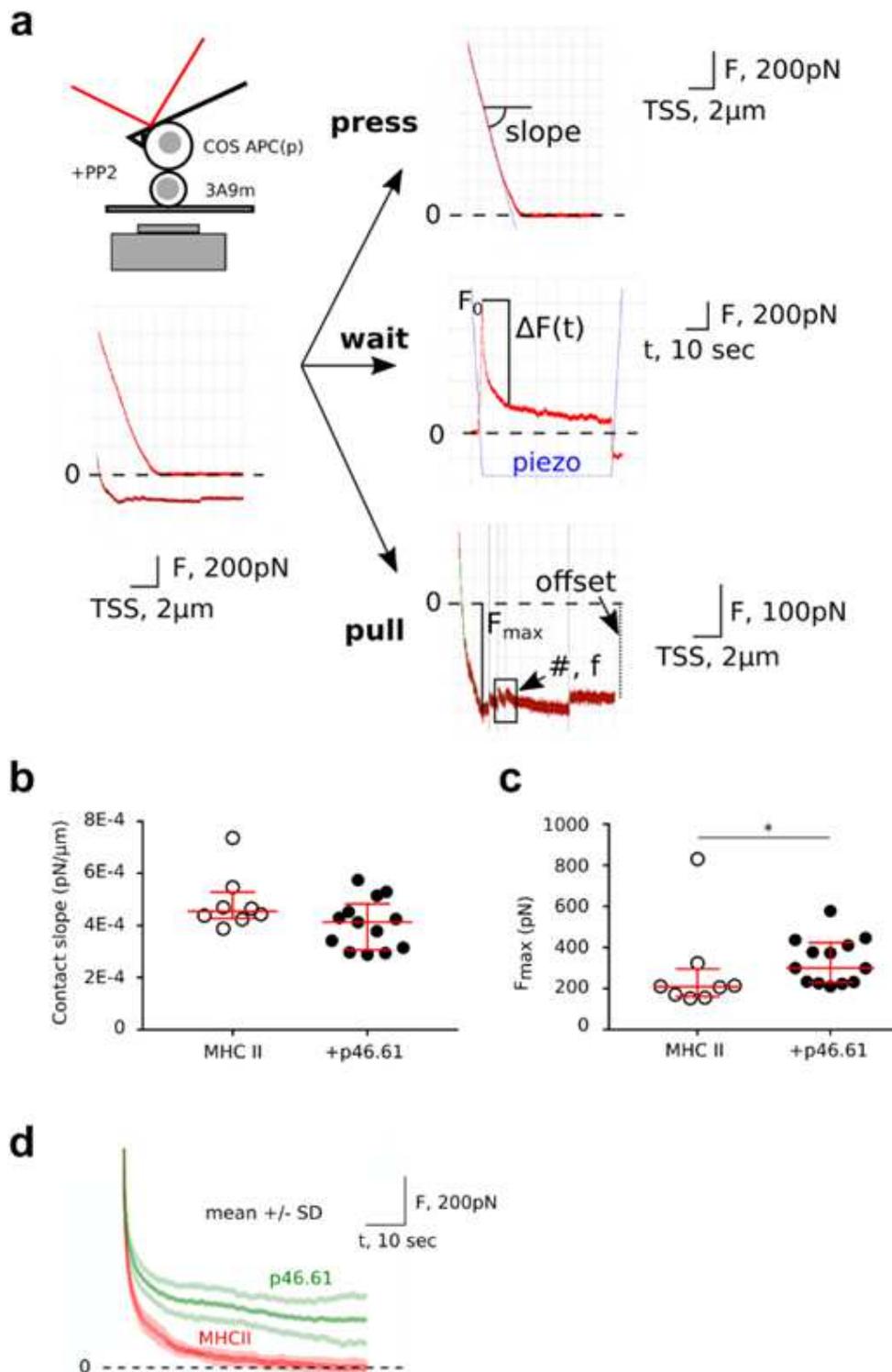


FIGURE 3.12 – Supplementary figure | Cell-cell presentation induces early mechanical changes (a) APC/T cell Single Cell Force Spectroscopy (SCFS) experiments. Cells are brought into contact under a prescribed force of 1nN, then the AFM piezo keeps its position constant for a duration of 60 sec before the cells are pulled apart. (b-f) (and sup. figure 3.13c) Effect of the presence of peptide on the APC. (b) Slope (of force vs. tip-sample separation (TSS) when putting the cells into contact, as a marker of cell/cell mechanics. No significant difference is recorded. (c) Maximal separation force. (d) Mean  $\pm$  SD representation of data in figure 3.5b.

## 4.10 Supplementary material | Structural damping

The loss tangent is a concept employed in the structural damping model that has been successfully applied to describe cell mechanical properties [Fabry et al., 2001]. It relies on the fact that, similar to what is observed in soft glassy materials [Sollich, 1997, Fabry et al., 2003], the cell's stress relaxation is a power-law such that  $\sigma(t) = \mu\delta(t) + \sigma_0(\frac{t}{t_0})^{1-x}$  where  $\sigma_0$  is the stress per unit strain,  $\mu$  a Newtonian viscous term, and  $\delta$  the Dirac delta function. The Fourier transform of this temporal stress relaxation leads to the complex modulus  $G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega) = G_0(\frac{\omega}{\Phi_0})^{x-1}(1 + i\bar{\eta})\Gamma(2-x)\cos\frac{\pi}{2}(x-1) + i\omega\mu$ , where  $G_0$  and  $\Phi_0$  are respectively scale factors for stiffness and frequency,  $\Gamma$  is the gamma function,  $\mu$  is a Newtonian viscosity,  $i$  the unit imaginary number  $\sqrt{-1}$ ,  $\bar{\eta}$  is the so-called hysteresivity or the structural damping coefficient [Fabry et al., 2001, Fabry et al., 2003, Fredberg and Stamenovic, 1989]. There is now an abundant literature on observed power-law stress relaxation functions in several cell types [Mahaffy et al., 2004, Fabry et al., 2003, Alcaraz et al., 2003a, Kollmannsberger and Fabry, 2011, Crandall, 1970]. From this last equation we can write the loss tangent :

$$\eta = \frac{E''}{E'} = \frac{E_0(\frac{\omega}{\Phi_0})^\alpha \bar{\eta} \Gamma(1-\alpha) \cos(\frac{\pi}{2}\alpha + \omega\mu)}{E_0(\frac{\omega}{\Phi_0})^\alpha \Gamma(1-\alpha) \cos(\frac{\pi}{2}\alpha)} \quad (3.1)$$

, where  $\bar{\eta} = \tan(\frac{\pi}{2}\alpha)$ , and if we consider as Fabry et al. that the Newtonian term can be neglected at low frequency (for frequencies of a few Hertz and less – we use 1 Hz-frequency),  $\eta$  tends to  $\bar{\eta}$  at low frequency. Following this model, the loss tangent  $\eta$  is thus expected to be directly related to the power exponent  $\eta \sim \tan(\frac{\pi}{2}\alpha)$ . This means that by measuring the power-law exponent  $\alpha$  independently, we should recover the value of  $\eta = \frac{E''}{E'} = \frac{K''}{K'}$  that we have measured (the ratios  $\frac{E''}{E'}$  and  $\frac{K''}{K'}$  are equal because the proportional contribution from geometry of the cell present in both  $E'$  and  $E''$  cancel out) [Smith et al., 2005].

## 4.11 Supplementary material | Drag coefficient

We measured the drag coefficient on the typical micropipette profile that we employed throughout this study. An oscillation of 1  $\mu\text{m}$  peak-to-peak amplitude at 1Hz led to a phase lag  $\varphi \sim 0.03f$  where  $f$  is the frequency. During experiments the drag force is expected to be smaller, as the micropipette moves over smaller amplitudes, so this is an overestimate of the phase lag. At  $f = 1$  Hz,  $\tan \varphi \sim 0.03$ , to be compared with the typical  $\tan \varphi = 0.4 - 0.5$  that we measured. We subtracted a fixed estimate of this phase lag due to fluid drag, and although this could be sophisticated, we estimate an error of less than 10% in the measurement of the phase lag due to the cell only.

## 4.12 Supplementary material | Effect of fast cell deformation.

We analyze raw  $x_{tip}$  data by fitting a sinusoidal signal on top of a drifting accounts for the cell deformation. Intuitively if the cell deforms too fast the experimental sinusoidal signal will be drifting so fast that the fitting will become inaccurate and might introduce an artefactual elastic and viscous contribution in  $x_{tip}$ . We decided to test our setup and data analyzis by using a purely elastic system, where we could mimic fast cell deformation. Ourkovari strategy consisted in using a microindenter instead of a cell and to indent it with the usual setup (flexible micropipette + bead). Using a micromanipulator, we could translate this surrogate cell to mimic large cell deformation, and we check that we would measure (i) a negligible  $K''$  and (ii) a constant  $K'$  (equal to the bending stiffness of the target microindenter) even though the target was moving. An example of rapid change in target position and resulting  $K'$  and  $K''$  in shown in supplementary figure 3.13.

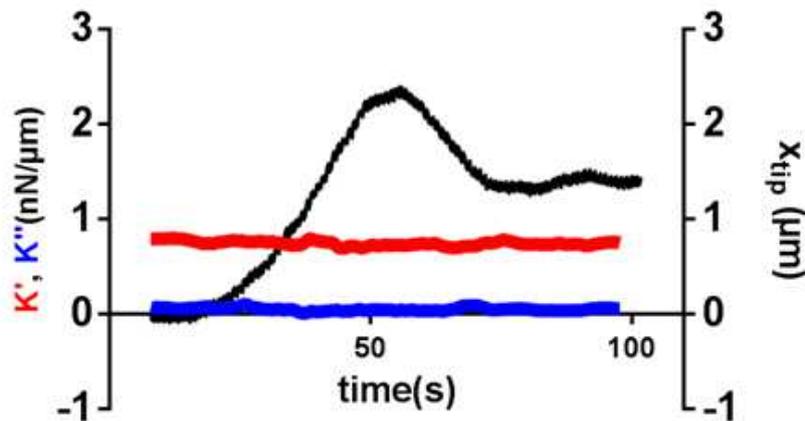


FIGURE 3.14 – Supplementary figure | Mimicking a fast deforming cell. The position  $x_{tip}$  of the tip of a microindenter used as a surrogate cell. It is submitted to the usual propotocol. The resulting measured  $K'$  and  $K''$  are shown. As expected for a purely elastic object,  $K''$  is very low. The fact that  $K'$  is constant over time shows that even with a moving target, the data analysis leads an accurate measurement of  $K'$  and  $K''$ .

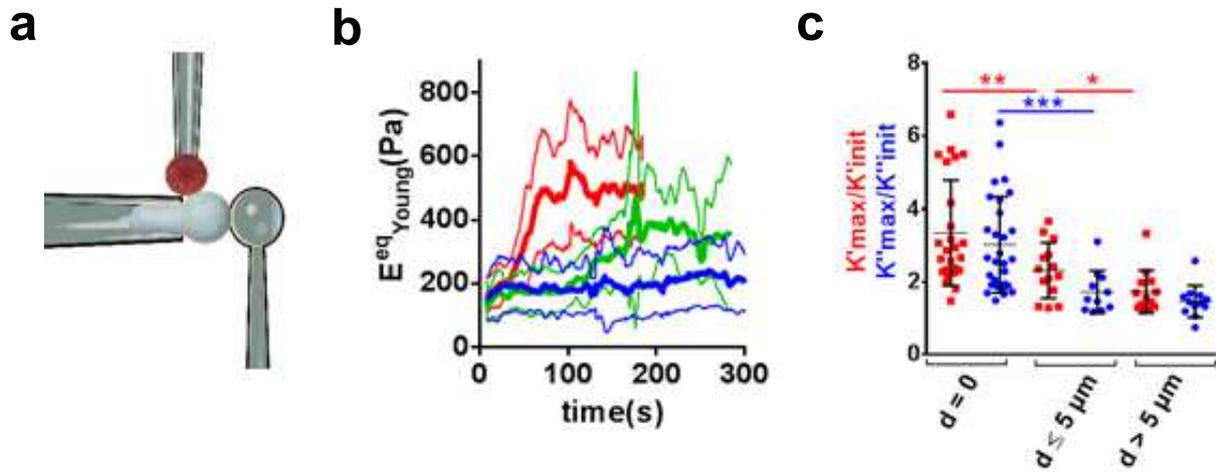


FIGURE 3.9 – Supplementary figure | (a) Modified setup where an auxiliary (stiff) pipette holds the activating microbead (top) to bring it in contact with the T cell at a location at a chosen distance from a microindenter (right) that indents the cell on its “side” while the T cell gets activated. (b) Equivalent Young’s modulus for three different ranges of distance  $d$  between the activating bead and the microindenter (red :  $d=0$ ; green :  $0 < d \leq 5 \mu\text{m}$ ; blue :  $d > 5 \mu\text{m}$ ). (c)  $K'_{max}/K'_{init}$  (red) and  $K''_{max}/K''_{init}$  (blue) ratios for the same ranges of distance  $d$  as in panel b.

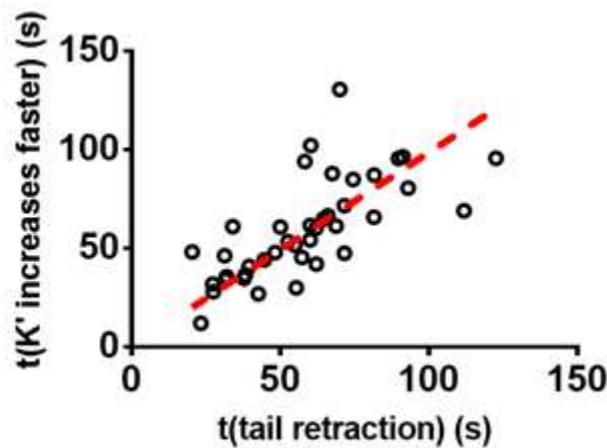


FIGURE 3.11 – Supplementary figure | Moment at which  $K'$  starts increasing faster vs time at which the cell tail in the holding micropipette starts retracting. The dashed line is a linear fit of slope  $0.99 \pm 0.05$ .

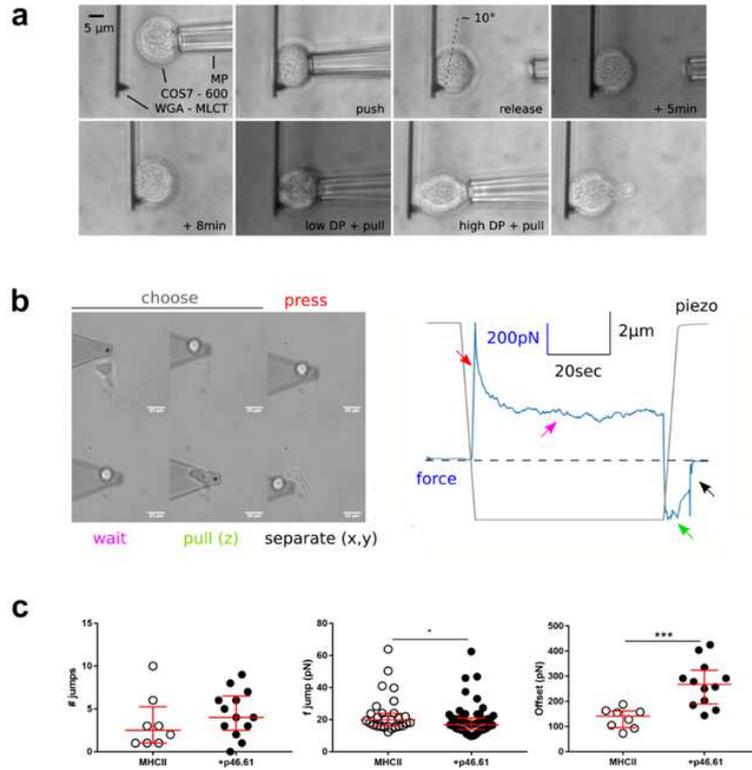


FIGURE 3.13 – Supplementary figure 1 (a) Lateral view of a sequence micro-mechanical tests of APC attachment to a lectin coated lever. Gentle contact of a micropipette carried APC is followed by an adhesion time (typically several minutes). Then the adhesion is tested by strongly aspirating the APC in the micropipette and pulling by moving away the pipette. We never recorded any large variation of the contact zone or separation of the cell from the lever, even after huge aspiration, motion and deformation (see the tongue, which then is “re-adsorbed” by the APC over time). Note that the side observation allows to assess that the tip of the lever, being coated with lectin, never protrudes from the APC, hence is never in contact with the T cell (since, of note, lectins may interfere with T cell activation). Bar = 5  $\mu\text{m}$ . (b) Sequence of SCFS, after the APC being adhered to the lever. Left, micrographs; right, force vs. time (blue) and piezo vs. time (grey). After positioning the APC over a T cell, the two are brought into contact, let interact for 60 sec, then pulled separated for the limited piezo range of the system. Full separation is obtained by lateral relative displacement of the two cells, until no more force is recorded by the lever deflection, indicating also that the lever drift was minimal if not null. The color coding of the arrows on the plot indicate the moment. Bar = 10  $\mu\text{m}$ . (c) Number of small detaching events, as seen as force jumps, per curve. Small jump force magnitude, each of the recorded event being pooled for a given condition, regardless of its nature (adhesion or tether pulling,<sup>29</sup>). Weak variation and amplitude of these forces as a function of the presence of the peptide in the MHC is consistent with previous single molecule data on T cell murine hybridomas<sup>28</sup>. Offset of the force at the end of the accessible pulling distance, which may encompass several non-broken bonds / membrane tethers [Puech et al., 2006].

# Discussion générale

Dans ce manuscrit, nous avons cherché à apporter une compréhension du comportement viscoélastique des neutrophiles, des lymphocytes T CD4+ et des lymphocytes B pendant que ces derniers réalisent une fonction immune : la phagocytose pour les neutrophiles, et l'engagement du TCR (T Cell Receptor) ou du BCR (B Cell Receptor) à la surface d'une bille modèle d'une CPA (Cellule Présentatrice d'Antigènes) pour les lymphocytes T et B.

## Évolution des propriétés viscoélastiques des leucocytes

### Pendant la phagocytose : un effet de courbure de l'objet phagocyté ?

Nous avons vu que, quand les neutrophiles phagocytent, leur rigidité ainsi que leur viscosité augmentent. Ces propriétés semblent augmenter d'autant plus que la bille à phagocyter est large. Cependant, nous ne pouvons pas exclure un potentiel effet de courbure de la cible dans l'évolution de ces propriétés viscoélastiques : les billes de  $8\mu\text{m}$  de diamètre et celles de  $20\mu\text{m}$  n'ont pas la même courbure, ni la même surface à phagocyter. Dans nos expériences, nous ne pouvons pas dissocier l'effet de la surface de la bille de celui de sa courbure. De façon très intéressante, pendant la phagocytose frustrée, l'aire maximale atteinte par les cellules PLB est la même sur les surfaces planes que sur les sphères de  $20\mu\text{m}$  de diamètre. Ce résultat, nous indique que la surface maximale ne semble pas dépendre de la courbure d'un objet. Cependant, ce résultat ne correspond qu'à la surface d'extension maximale et non de l'évolution des propriétés viscoélastiques pendant la phagocytose frustrée. Ce résultat ne nous permet pas de discriminer l'effet de la courbure de celui de la surface de l'objet à phagocyter. Étudier ces deux paramètres indépendamment pourrait nous renseigner sur un potentiel effet de courbure sur l'évolution des propriétés viscoélastiques : M. Clarke et ses collègues ont montré que *Dictyostelium* exerce des forces différentes selon la courbure concave ou convexe des levures phagocytées par cette amibe [Clarke et al., 2010]. Cela suggère que les changements des propriétés élastiques pourraient dépendre de la courbure de l'objet phagocyté. Pour étudier spécifiquement le rôle de la courbure dans ces changements mécaniques, il pourrait être envisageable de développer des cibles non

sphériques, par exemple, de forme ellipsoïdale [Champion and Mitragotri, 2006]. Cependant, l'aire finale d'étalement sur les surfaces planes et celle sur les billes de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre sont équivalentes.

## **Une évolution retrouvées chez trois types de leucocytes**

Mes mesures sur les neutrophiles s'insèrent dans une étude qui regroupe des observations sur trois types de leucocytes. De toutes ces observations se dégage le fait que des changements mécaniques dans un globule blanc en train de phagocyter ou de s'activer commencent dans les secondes suivant l'engagement des récepteurs à la surface des leucocytes. Les changements morphologiques qui s'ensuivent n'arrivent que quelques dizaines de secondes plus tard, en même temps qu'une rigidification et qu'une augmentation de la viscosité cellulaire. Dans le cas des lymphocytes T, l'élasticité (mesurée par  $K'$ ) augmente plus vite après que la protrusion n'ait commencée à être formée. Cette augmentation est d'autant plus faible que sa mesure est réalisée loin de zone où la cellule est activée par l'APC artificielle.

Dans le cas de la phagocytose complète ou frustrée, nous avons montré que les valeurs maximales de  $K'$  et  $K''$  correspondent à un autre changement morphologique : celui de la perte de l'angle entre le corps cellulaire et la coupe phagocytaire dans le cas des cellules PLB, et à la fermeture du phagosome dans le cas des neutrophiles primaires réalisant une phagocytose complète. Les exemples ci-dessus nous ont permis de montrer dans cette thèse que l'évolution des grandeurs  $K'$  et  $K''$  correspond à des changements morphologiques bien définis.

Le rôle de ces changements mécaniques n'est pas clair, mais des données dans la littérature sur des changements similaires liant rigidification et augmentation de viscosité dans d'autres types cellulaires que des leucocytes [Rosendahl et al., 2018, Heinrich and Ounkomol, 2007] suggèrent que cette relation élasticité-viscosité est une caractéristique qui pourrait se retrouver dans toutes les cellules dotées d'un cytosquelette. Les propriétés élastiques et visqueuses évoluent par ailleurs en respectant une relation bien définie, et qui consiste en une signature mécanique qui peut être différente d'un type cellulaire à l'autre.

## **Viscosité et diffusion dans la synapse**

Bien que les détails moléculaires conduisant aux modifications des propriétés viscoélastiques que nous avons mesurées restent à comprendre, le fait que la viscosité cellulaire augmente pourrait impliquer que les propriétés diffusives changent lors de l'activation des leucocytes. La formation de barrières de diffusion pourrait être une manifestation de l'augmentation

de la viscosité observée sur l'ensemble des cellules [Ju and Zhu, 2017, Cheng et al., 2006b]. La diffusion et la polarisation d'organelles telles que les mitochondries dans les lymphocytes T [Mahaffy et al., 2004] pourraient également être affectées par de grands changements de viscosité au cours de l'activation des leucocytes. Ces effets devront peut-être être pris en compte dans les modèles d'activation des leucocytes.

## Capacités d'extension pendant la phagocytose frustrée

Pendant la phagocytose complète et frustrée, la surface apparente des neutrophiles augmente. Nous avons estimé que l'expansion de la surface apparente pendant la phagocytose frustrée correspondait à 30 % de surface supplémentaire par rapport à un étirement passif. Cet étirement passif nous a renseigné sur les réserves membranaires contenues des microvillosités : dans une cellule PLB ces réserves représenteraient 70 % de la surface apparente de la cellule au repos. Ces résultats suggèrent que les phagocytes mobilisent de la membrane interne pour agrandir leur surface au-delà de leurs réserves, enveloppant ainsi leur cible, comme cela a déjà été décrit dans la littérature [Di et al., 2003, Hallett and Dewitt, 2007, Masters et al., 2013a].

Quand une cellule phagocyte, sa surface apparente augmente en même temps que  $K'$ . Cette quantité est une mesure indirecte de la tension membranaire, qui évolue pendant la phagocytose : celle-ci est maximale quand la cellule a totalement consommé son stock de microvillosités, et diminue ensuite via le recrutement de membrane par exocytose [Masters et al., 2013b, Pontes et al., 2017]. Quand l'aire maximale est atteinte par les cellules PLB réalisant une phagocytose frustrée,  $K'$  et  $K''$  ont déjà diminué de 20%.  $K'$  ne reflète pas nécessairement le comportement de la tension membranaire [Sens and Plastino, 2015], mais si son évolution suivait la même évolution que la tension membranaire, nous pourrions s'interroger sur la possibilité de lier l'étude de  $K'$  à celle des événements d'exocytose suivant le pic de tension membranaire observé pendant la phagocytose frustrée [Pontes et al., 2017]. L'exocytose pourrait être explorée en marquant des vésicules avec des ancres GPI comme l'ont fait T. Masters et ses collègues [Masters et al., 2013b] et en suivant l'évolution de  $K'$  en fonction de la localisation à la membrane de vésicules positives pour ces ancres.

Les neutrophiles humains possèdent plusieurs milliers de granules et leur dégranulation complète se traduit par un triplement de leur surface [Nusse and Lindau, 1988]. De toute évidence, les neutrophiles ne vont pas jusqu'à la dégranulation complète dans nos conditions expérimentales : les cellules PLB doublent leur surface pendant la phagocytose sur une surface plane ou sur une bille de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre. À notre connaissance, le nombre et la surface des

granules des cellules PLB-985 n'ont pas été évalués. A ce stade, nous ne pouvons pas évaluer la proportion des granules libérées par les cellules PLB-985 lors de la phagocytose. Une dégranulation complète se traduirait par une libération massive de produits toxiques tels que des protéases et des défensines, peptides perméabilisants. Une telle libération serait potentiellement destructrice pour le tissu environnant, et donc l'absence de dégranulation complète protège l'environnement tissulaire du phagocyte.

La phagocytose frustrée n'est pas seulement un modèle de laboratoire pour étudier la phagocytose. Quand les phagocytes rencontrent un très grand pathogène, comme des champignons filamenteux [Erwig and Gow, 2016], ils tentent d'abord de le phagocyter. Si la phagocytose n'aboutit pas, le phagocyte crée une zone de contact spécialisée riche en actine dans laquelle il déverse des composants microbicides afin d'attaquer la surface du pathogène [Maxson et al., 2018]. Ce processus est très difficile à étudier, peu d'informations sont disponibles à ce jour. Nous pouvons envisager que nos phagocytes peuvent procéder à une nouvelle vague de dégranulation à un stade plus tardif de la phagocytose frustrée. Notre technique de micropipette n'est pas adaptée à un suivi prolongé de l'interaction entre la proie et le phagocyte (par manque de contrôle des conditions environnementales). Des observations en microscopies ponctuelles sur des cellules conservées par ailleurs dans un incubateur avec des conditions contrôlées pourraient être mises en place pour étudier cette phase tardive.

## **Les propriétés mécaniques des leucocytes dans les pathologies**

La mécanique des globules blancs est directement impliquée dans plusieurs pathologies. Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (ou SDRA), qui est une complication fréquente chez les patients en réanimation, implique une inflammation pulmonaire médiée notamment par les neutrophiles, qui se trouvent piégés dans la microvasculature pulmonaire. Le mécanisme de ce blocage n'est pas encore élucidé malgré la mortalité élevée que le SDRA engendre. Une cause importante pourrait être une rigidification des neutrophiles. En effet, des études ont identifié deux façons de rigidifier des neutrophiles : leur confinement dans un espace limité (ce qui arrive lorsqu'un neutrophile transite dans un vaisseau sanguin très étroit) ou bien leur exposition à certaines molécules solubles stimulantes (des cytokines, également présentes dans l'organisme et en particulier dans des situations pathologiques) [Preira et al., 2016]. Ainsi deux stimuli de nature très différente, mécanique (confinement) et biochimique (incubation avec des cytokines), changent les propriétés mécaniques des neutrophiles.

Caractériser ces changements mécaniques est important pour mieux comprendre le SDRA pour possiblement élaborer des stratégies thérapeutiques visant à diminuer la mortalité due à ce syndrome. Plusieurs points restent à élucider sur le mécanisme exact qui entraîne une rigidifica-

tion des neutrophiles par un confinement. La réaction aux cytokines est elle aussi caractérisée seulement partiellement, et l'interaction éventuelle entre confinement et présence des cytokines molécules solubles – plausible dans le cas d'un patient atteint de SDRA – est inconnue.

Nous avons mis en place des méthodes permettant l'analyse des propriétés mécaniques de cellules avec une bonne précision dans les mesures morphologiques, mécaniques, et dans le temps. L'étude du comportement cellulaire au niveau de la cellule unique apporte de nombreux détails qui sont masqués dans les études impliquant des grandes populations de cellules. Nous pouvons donc considérer nos méthodes comme complémentaires d'autres techniques développées récemment, qui grâce à des techniques de microfluidique permettent des mesures mécaniques à haut débit. La "Real-time deformability cytometry" [Otto et al., 2015, Rosendahl et al., 2018] consiste à faire passer un grand nombre de cellules dans un microcanal. La contrainte que le fluide applique sur les cellules les déforme, et cette déformation est analysée par imagerie, cellule par cellule, avec un débit pouvant aller jusqu'à 1000 cellules par seconde. Cette technique est bien adaptée pour tester l'effet de cytokines sur la déformabilité des cellules [Bashant et al., 2019], cependant elle ne donne pas le même niveau de détail que nous pouvons obtenir par rhéologie sur cellule unique, ni ne permet de mesurer l'évolution des paramètres mécaniques sur une cellule.

Notre étude souligne que non seulement les propriétés élastiques et visqueuses sont importantes pour comprendre la mécanique des cellules, mais aussi leur relation sous la forme de leur rapport  $\eta$  et de son évolution dans le temps. Tous les leucocytes que nous avons testés présentent de très grands changements dans les propriétés élastiques et visqueuses, mais le suivi de l'évolution temporelle de  $\eta$  montre une signature mécanique spécifique aux types cellulaires. Il est tentant de penser que l'évolution de  $\eta$  au cours de l'activation puisse devenir un outil utile pour distinguer des leucocytes sains de leucocytes pathologiques, comme le suggèrent déjà la prise en compte de la valeur de  $\eta$  dans des cellules au repos [Carmichael et al., 2015].



# Liste des symboles

$\Delta P$	Pression d'aspiration dans la micropipette
$\delta$	Indentation
$\eta$	Rapport de $\frac{K''}{K'}$
$\mu$	Viscosité effective
$\nu$	Coefficient Poisson
$\omega$	Fréquence angulaire
$\varphi$	Retard de phase
$E_{Young}$	Module d'Young
$E_{Young}^{Eq}$	Module d'Young effectif
$x_{tip}$	Position de l'extrémité de la micropipette flexible ou du microindenteur
$E'$	Module de conservation
$E''$	Module de perte
$F$	Force
$f$	Fréquence
$Fc\gamma R$	Récepteur de la partie constance ( $Fc$ ) des anticorps
$K'$	Raideur cellulaire
$K''$	Partie imaginaire de la raideur complexe $K^*$ , reflète les propriétés visqueuses de la cellule



# Bibliographie

- [Abidine et al., 2018] Abidine, Y., Constantinescu, A., Laurent, V. M., Sundar Rajan, V., Michel, R., Laplaud, V., Duperray, A., and Verdier, C. (2018). Mechanosensitivity of Cancer Cells in Contact with Soft Substrates Using AFM. *Biophys. J.*, 114(5) :1165–1175.
- [Aderem and Underhill, 1999] Aderem, A. and Underhill, D. M. (1999). MECHANISMS OF PHAGOCYTOSIS IN MACROPHAGES. pages 593–623.
- [Alcaraz et al., 2003a] Alcaraz, J., Buscemi, L., Grabulosa, M., Trepas, X., Fabry, B., Farré, R., and Navajas, D. (2003a). Microrheology of Human Lung Epithelial Cells Measured by Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.*, 84(3) :2071–2079.
- [Alcaraz et al., 2003b] Alcaraz, J., Buscemi, L., Grabulosa, M., Trepas, X., Fabry, B., Navajas, D., and Farré, R. (2003b). Microrheology of Human Lung Epithelial Cells Measured by Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.*, 84(March) :2071–2079.
- [Ashkenazi and Marks, 2009] Ashkenazi, A. and Marks, R. (2009). Luminol-dependent chemiluminescence of human phagocyte cell lines : comparison between dmsol differentiated plb 985 and hl 60 cells. *Luminescence*, 24(3) :171–177.
- [Azar et al., 2010] Azar, G. A., Lemaître, F., Robey, E. A., and Bousso, P. (2010). Subcellular dynamics of T cell immunological synapses and kinapses in lymph nodes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107(8) :3675–3680.
- [Bakalar et al., 2018] Bakalar, M. H., Joffe, A. M., Schmid, E. M., Son, S., Podolski, M., and Fletcher, D. A. (2018). Size-Dependent Segregation Controls Macrophage Phagocytosis of Antibody-Opsonized Targets. *Cell*, 174(1) :131–142.e13.
- [Balland et al., 2006] Balland, M., Desprat, N., Icard, D., Féréol, S., Asnacios, A., Browaeys, J., Hénon, S., and Gallet, F. (2006). Power laws in microrheology experiments on living cells : Comparative analysis and modeling. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, 74(2).
- [Barger et al., 2019] Barger, S. R., Reilly, N. S., Shutova, M. S., Li, Q., Maiuri, P., Heddleston, J. M., Mooseker, M. S., Flavell, R. A., Svitkina, T., Oakes, P. W., Krendel, M., and Gauthier,

- N. C. (2019). Membrane-cytoskeletal crosstalk mediated by myosin-I regulates adhesion turnover during phagocytosis. *Nat. Commun.*, 10(1) :1–18.
- [Bashant et al., 2019] Bashant, K. R., Vassallo, A., Herold, C., Berner, R., Menschner, L., Subburayalu, J., Kaplan, M. J., Summers, C., Guck, J., Chilvers, E. R., and Toepfner, N. (2019). Real-time deformability cytometry reveals sequential contraction and expansion during neutrophil priming. *Journal of Leukocyte Biology*, 105(6) :1143–1153.
- [Bashoura et al., 2014] Bashoura, K. T., Gondarenko, A., Chen, H., Shen, K., Liu, X., Huse, M., Hone, J. C., and Kam, L. C. (2014). CD28 and CD3 have complementary roles in T-cell traction forces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 111(6) :2241–2246.
- [Basu et al., 2016] Basu, R., Whitlock, B. M., Husson, J., Le Floc’h, A., Jin, W., Lieberman, J., Oyler-yaniv, A., Hivroz, C., Kam, L. C., and Huse, M. (2016). Cytotoxic T Cells Use Mechanical Force to Potentiate Target Cell Killing. *Cell*, pages 1–11.
- [Branzk et al., 2014] Branzk, N., Lubojemska, A., Hardison, S. E., Wang, Q., Gutierrez, M. G., Brown, G. D., and Papayannopoulos, V. (2014). Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nature Immunology*, 15(11) :1017–1026.
- [Bretschneider et al., 2009] Bretschneider, T., Anderson, K., Ecke, M., Müller-Taubenberger, A., Schroth-Diez, B., Ishikawa-Ankerhold, H. C., and Gerisch, G. (2009). The three-dimensional dynamics of actin waves, a model of cytoskeletal self-organization. *Biophys. J.*, 96(7) :2888–2900.
- [Brinkmann et al., 2004] Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, 303(March) :1532–1536.
- [Brinkmann and Zychlinsky, 2012] Brinkmann, V. and Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil extracellular traps : Is immunity the second function of chromatin? *J. Cell Biol.*, 198(5) :773–783.
- [Bufi et al., 2015] Bufi, N., Saitakis, M., Dogniaux, S., Buschinger, O., Bohineust, A., Richert, A., Maurin, M., Hivroz, C., and Asnacios, A. (2015). Human Primary Immune Cells Exhibit Distinct Mechanical Properties that Are Modified by Inflammation. *Biophys. J.*, 108(9) : 21.
- [Burroughs and Van Der Merwe, 2007] Burroughs, N. J. and Van Der Merwe, P. A. (2007). Stochasticity and spatial heterogeneity in T-cell activation. *Immunol. Rev.*, 216(1) :69–80.
- [Bursac et al., 2005] Bursac, P., Lenormand, G., Fabry, B., Oliver, M., Weitz, D. A., Viasnoff, V., Butler, J. P., and Fredberg, J. J. (2005). Cytoskeletal remodelling and slow dynamics in the living cell. *Nat. Mater.*, 4(7) :557–561.

- [Cai et al., 2017] Cai, P. G., Takahashi, R., Kuribayashi-Shigetomi, K., Subagyo, A., Sueoka, K., Maloney, J. M., Van Vliet, K. J., and Okajima, T. (2017). Temporal Variation in Single-Cell Power-Law Rheology Spans the Ensemble Variation of Cell Population. *Biophys. J.*, 113(3) :671–678.
- [Carmichael et al., 2015] Carmichael, B., Babahosseini, H., Mahmoodi, S. N., and Agah, M. (2015). The fractional viscoelastic response of human breast tissue cells. *Phys. Biol.*, 12(4) :46001.
- [Cartagena-Rivera et al., 2016] Cartagena-Rivera, A. X., Logue, J. S., Waterman, C. M., and Chadwick, R. S. (2016). Actomyosin Cortical Mechanical Properties in Nonadherent Cells Determined by Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.*, 110(11) :2528–2539.
- [Casuso et al., 2011] Casuso, I., Rico, F., and Scheuring, S. (2011). Biological AFM : Where we come from - Where we are - Where we may go. *J. Mol. Recognit.*, 24(3) :406–413.
- [Cazaux et al., 2016] Cazaux, S., Sadoun, A., Pélicot-Biarnes, M., Martinez, M., Obeid, S., Bongrand, P., Limozin, L., and Puech, P. H. (2016). Synchronizing atomic force microscopy force mode and fluorescence microscopy in real time for immune cell stimulation and activation studies. *Ultramicroscopy*, 160 :168–181.
- [Champion and Mitragotri, 2006] Champion, J. a. and Mitragotri, S. (2006). Role of target geometry in phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103 :4930–4934.
- [Cheng et al., 2006a] Cheng, Y. T., Ni, W., and Cheng, C. M. (2006a). Nonlinear analysis of oscillatory indentation in elastic and viscoelastic solids. *Phys. Rev. Lett.*, 97(7).
- [Cheng et al., 2006b] Cheng, Y. T., Ni, W., and Cheng, C. M. (2006b). Nonlinear analysis of oscillatory indentation in elastic and viscoelastic solids. *Phys. Rev. Lett.*, 97(7) :1–4.
- [Clarke et al., 2010] Clarke, M., Engel, U., Giorgione, J., Müller-Taubenberger, A., Prassler, J., Veltman, D., and Gerisch, G. (2010). Curvature recognition and force generation in phagocytosis. *BMC Biol.*, 8(1) :154.
- [Colin-York et al., 2019] Colin-York, H., Javanmardi, Y., Skamrahl, M., Kumari, S., Chang, V. T., Khuon, S., Taylor, A., Chew, T. L., Betzig, E., Moeendarbary, E., Cerundolo, V., Eggeling, C., and Fritzsche, M. (2019). Cytoskeletal Control of Antigen-Dependent T Cell Activation. *Cell Rep.*, 26(12) :3369–3379.e5.
- [Colotta et al., 1992] Colotta, F., Re, F., Polentarutti, N., Sozzani, S., and Mantovani, A. (1992). Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*, 80(8) :2012–2020.
- [Corse et al., 2011] Corse, E., Gottschalk, R. A., and Allison, J. P. (2011). Strength of TCR–Peptide/MHC Interactions and In Vivo T Cell Responses. *J. Immunol.*, 186(9) :5039–5045.

- [Crandall, 1970] Crandall, S. H. (1970). The role of damping in vibration theory. *J. Sound Vib.*, 11(1) :3–18.
- [Dancey et al., 1976] Dancey, J. T., Harker, L. A., Finch, C. A., Dancey, J. T., Deubelbeiss, K. A., Harker, L. A., and Finch, C. A. (1976). Neutrophil kinetics in man . Find the latest version : Neutrophil Kinetics in Man. *J. Clinial Investig.*, 58(3) :705–715.
- [Darby et al., 1994] Darby, C., Geahlen, R. L., and Schreiber, A. D. (1994). Stimulation of macrophage fc gamma riia activates the receptor-associated protein tyrosine kinase syk and induces phosphorylation of multiple proteins including p95vav and p62/gap-associated protein. *The Journal of Immunology*, 152(11) :5429–5437.
- [Darling and Di Carlo, 2015] Darling, E. M. and Di Carlo, D. (2015). High-Throughput Assessment of Cellular Mechanical Properties. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 17(1) :35–62.
- [Desprat et al., 2006] Desprat, N., Guirouy, A., and Asnacios, A. (2006). Microplates-based rheometer for a single living cell. *Rev. Sci. Instrum.*, 77(5).
- [Di et al., 2003] Di, A., Nelson, D. J., Bindokas, V., Brown, M. E., Libunao, F., and Palfrey, H. C. (2003). Dynamin Regulates Focal Exocytosis in Phagocytosing Macrophages. *Mol. Biol. Cell*, 14(May) :1835–1851.
- [Diakonova et al., 2002] Diakonova, M., Bokoch, G., and Swanson, J. A. (2002). Dynamics of Cytoskeletal Proteins during Fc-gamma Receptor-mediated Phagocytosis in Macrophages. *Molecular biology of the cell*, 13(February) :402–411.
- [Dieckmann et al., 2010] Dieckmann, R., von Heyden, Y., Kistler, C., Gopaldass, N., Haussher, S., William Crawley, S., Schwarz, E. C., Diensthuber, R. P., Graham, P. C., Tsiavaliaris, G., and Soldati, T. (2010). A Myosin IK-Abp1-PakB Circuit Acts as a Switch to Regulate Phagocytosis Efficiency. *Molecular biology of the cell*, 21 :1505–1518.
- [Drury and Dembo, 1999] Drury, J. L. and Dembo, M. (1999). Hydrodynamics of micropipette aspiration. *Biophys. J.*, 76(1 I) :110–128.
- [Dunn et al., 2018] Dunn, J. D., Bosmani, C., Barisch, C., Raykov, L., Lefrançois, L. H., Cardenal-Muñoz, E., López-Jiménez, A. T., and Soldati, T. (2018). Eat prey, live : Dictyostelium discoideum as a model for cell-autonomous defenses. *Front. Immunol.*, 8(JAN).
- [Dupre-Crochet et al., 2013] Dupre-Crochet, S., Erard, M., and Nüsse, O. (2013). ROS production in phagocytes : why, when, and where ? *J. Leukoc. Biol.*, 94(4) :657–670.
- [Dura et al., 2015] Dura, B., Dougan, S. K., Barisa, M., Hoehl, M. M., Lo, C. T., Ploegh, H. L., and Voldman, J. (2015). Profiling lymphocyte interactions at the single-cell level by microfluidic cell pairing. *Nat. Commun.*, 6.
- [Dustin, 2014] Dustin, M. L. (2014). The immunological synapse. *Cancer Immunol. Res.*, 2(11) :1023–1033.

- [Edelstein et al., 2015] Edelstein, A. D., Tsuchida, M. A., Amodaj, N., Pinkard, H., Vale, R. D., and Stuurman, N. (2015). Advanced methods of microscope control using  $\mu$ Manager software. *J Biol Methods*, 1(2) :1–18.
- [Ekpenyong et al., 2017] Ekpenyong, A. E., Toepfner, N., Fiddler, C., Herbig, M., Li, W., Cojoc, G., Summers, C., Guck, J., and Chilvers, E. R. (2017). Mechanical deformation induces depolarization of neutrophils. *Sci. Adv.*, 3(6) :1–11.
- [Erwig and Gow, 2016] Erwig, L. P. and Gow, N. A. (2016). Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat. Rev. Microbiol.*, 14(3) :163–176.
- [Evans et al., 1995] Evans, E., Ritchie, K., and Merkel, R. (1995). Sensitive Force Technique to Probe Molecular Adhesion and Structural Linkages at Biological Interfaces. *Biophys. J.*, 68(June) :2580–2587.
- [Evans and Yeung, 1989] Evans, E. and Yeung, A. (1989). Apparent viscosity and cortical tension of blood granulocytes determined by micropipet aspiration. *Biophys. J.*, 56(1) :151–160.
- [Evans and Zhelev, 1993] Evans, E. and Zhelev, D. (1993). Synchrony of Cell Spreading and Contraction Force as Phagocytes Engulf Large Pathogens. 122(6) :1295–1300.
- [Fabry et al., 2001] Fabry, B., Maksym, G. N., Butler, J. P., Glogauer, M., Navajas, D., and Fredberg, J. J. (2001). Scaling the microrheology of living cells. *Phys. Rev. Lett.*, 87(14) :1–4.
- [Fabry et al., 2003] Fabry, B., Maksym, G. N., Butler, J. P., Glogauer, M., Navajas, D., Taback, N. A., Millet, E. J., and Fredberg, J. J. (2003). Time scale and other invariants of integrative mechanical behavior in living cells. *Phys. Rev. E - Stat. Physics, Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.*, 68(4).
- [Fernández and Ott, 2008] Fernández, P. and Ott, A. (2008). Single cell mechanics : Stress stiffening and kinematic hardening. *Phys. Rev. Lett.*, 100(23) :2–5.
- [Finnemann et al., 1997] Finnemann, S. C., Bonilha, V. L., Marmorstein, A. D., and Rodriguez-Boulan, E. (1997). Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires  $\alpha v \beta 5$  integrin for binding but not for internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94(24) :12932–12937.
- [Flannagan et al., 2012] Flannagan, R. S., Jaumouillé, V., and Grinstein, S. (2012). The Cell Biology of Phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 7(1) :61–98.
- [Fouchard et al., 2014] Fouchard, J., Bimbard, C., Bufi, N., Durand-Smet, P., Proag, A., Richert, A., Cardoso, O., and Asnacios, A. (2014). Three-dimensional cell body shape dictates the onset of traction force generation and growth of focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 111(36) :13075–13080.

- [Franz et al., 2007] Franz, C. M., Taubenberger, A., Puech, P.-h., and Muller, D. J. (2007). Studying Integrin-Mediated Cell Adhesion at the Single-Molecule Level Using AFM Force Spectroscopy. (May 2014).
- [Fredberg and Stamenovic, 1989] Fredberg, J. J. and Stamenovic, D. (1989). On the imperfect elasticity of lung tissue. *J. Appl. Physiol.*, 67(6) :2408–2419.
- [Freeman et al., 2018] Freeman, S. A., Vega, A., Riedl, M., Mayor, S., Jaqaman, K., Grinstein, S., Freeman, S. A., Vega, A., Riedl, M., Collins, R. F., Ostrowski, P. P., Woods, E. C., Bertozzi, C. R., Tammi, M. I., Lidke, D. S., Johnson, P., Mayor, S., and Jaqaman, K. (2018). Transmembrane Pickets Connect Cyto- and Pericellular Skeletons Forming Barriers to Receptor Article Transmembrane Pickets Connect Cyto- and Pericellular Skeletons Forming Barriers to Receptor Engagement. *Cell*, 172 :305–317.
- [Fregin et al., 2019] Fregin, B., Czerwinski, F., Biedenweg, D., Girardo, S., Gross, S., Aurich, K., and Otto, O. (2019). High-throughput single-cell rheology in complex samples by dynamic real-time deformability cytometry. *Nat. Commun.*, 10(1).
- [Galloway et al., 2019] Galloway, D. A., Phillips, A. E., Owen, D. R., and Moore, C. S. (2019). Phagocytosis in the brain : Homeostasis and disease. *Front. Immunol.*, 10(MAR) :1–15.
- [Gauthier et al., 2011] Gauthier, N. C., Fardin, M. A., Roca-Cusachs, P., and Sheetz, M. P. (2011). Temporary increase in plasma membrane tension coordinates the activation of exocytosis and contraction during cell spreading. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108(35) :14467–14472.
- [Goodridge et al., 2011] Goodridge, H. S., Reyes, C. N., Becker, C. A., Katsumoto, T. R., Ma, J., Wolf, A. J., Bose, N., Chan, A. S. H., Magee, A. S., Danielson, M. E., Weiss, A., Vasilakos, J. P., and Underhill, D. M. (2011). upon formation of a ‘ phagocytic synapse ’. *Nature*, 472(7344) :471–475.
- [Greenberg et al., 1994] Greenberg, S., Chang, P., and Silverstein, S. C. (1994). Tyrosine phosphorylation of the  $\gamma$  subunit of Fc( $\gamma$ ) receptors, p72(syk), and paxillin during Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J. Biol. Chem.*, 269(5) :3897–3902.
- [Guillou et al., 2016a] Guillou, L., Babataheri, A., Puech, P.-H., Barakat, A. I., and Husson, J. (2016a). Dynamic monitoring of cell mechanical properties using profile microindentation. *Sci. Rep.*, 6(1) :21529.
- [Guillou et al., 2016b] Guillou, L., Babataheri, A., Saitakis, M., Bohineust, A., Dogniaux, S., Hivroz, C., Barakat, A. I., and Husson, J. (2016b). T lymphocyte passive deformation is controlled by unfolding of membrane surface reservoirs. *Mol. Biol. Cell*, 27(22) :3574–3582.

- [Guillou et al., 2016c] Guillou, L., Dahl, J. B., Lin, J. M. G., Barakat, A. I., Husson, J., Muller, S. J., and Kumar, S. (2016c). Measuring Cell Viscoelastic Properties Using a Microfluidic Extensional Flow Device. *Biophys. J.*, 111(9) :2039–2050.
- [Hackam et al., 1998] Hackam, D. J., Rotstein, O. D., Sjolin, C., Schreiber, A. D., Trimble, W. S., and Grinstein, S. (1998). v-snare-dependent secretion is required for phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(20) :11691–11696.
- [Hallett and Dewitt, 2007] Hallett, M. B. and Dewitt, S. (2007). Ironing out the wrinkles of neutrophil phagocytosis. *Trends Cell Biol.*, 17(5) :209–214.
- [Haraoka et al., 1999] Haraoka, M., Hang, L., Freund us, B., Godaly, G., Burdick, M., Strieter, R., and Svanborg, C. (1999). Neutrophil Recruitment and Resistance to Urinary Tract Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 180(4) :1220–1229.
- [Heinrich, 2015] Heinrich, V. (2015). Controlled One-on-One Encounters between Immune Cells and Microbes Reveal Mechanisms of Phagocytosis. *Biophys J*, 109(3) :469–476.
- [Heinrich and Ounkomol, 2007] Heinrich, V. and Ounkomol, C. (2007). Force versus axial deflection of pipette-aspirated closed membranes. *Biophys. J.*, 93(2) :363–372.
- [Herant et al., 2005] Herant, M., Heinrich, V., and Dembo, M. (2005). Mechanics of neutrophil phagocytosis : behavior of the cortical tension. *J. Cell Sci.*, 118(Pt 9) :1789–1797.
- [Herant et al., 2006] Herant, M., Heinrich, V., and Dembo, M. (2006). Mechanics of neutrophil phagocytosis : experiments and quantitative models. *J. Cell Sci.*, 119(4) :1903–1913.
- [Herant et al., 2003] Herant, M., Marganski, W. A., and Dembo, M. (2003). The Mechanics of Neutrophils : Synthetic Modeling of Three Experiments. *Biophys. J.*, 84(5) :3389–3413.
- [Hivroz and Saitakis, 2016] Hivroz, C. and Saitakis, M. (2016). Biophysical aspects of T lymphocyte activation at the immune synapse. *Front. Immunol.*, 7(FEB) :1–12.
- [Hochmuth, 2000] Hochmuth, R. M. (2000). Micropipette aspiration of living cells. *J. Biomech.*, 33(1) :15–22.
- [Hochmuth et al., 1993] Hochmuth, R. M., Ting-Beall, H. P., Beaty, B. B., Needham, D., and Tran-Son-Tay, R. (1993). Viscosity of passive human neutrophils undergoing small deformations. *Biophys. J.*, 64(5) :1596–1601.
- [Hooper et al., 2012] Hooper, L. V., Littman, D. R., and J., M. A. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science (80- )*, 336(6086) :1268–1273.
- [Husson et al., 2011] Husson, J., Chemin, K., Bohineust, A., Hivroz, C., and Henry, N. (2011). Force generation upon T cell receptor engagement. *PLoS One*, 6(5).
- [Ip et al., 2010] Ip, W. K. E., Sokolovska, A., Charriere, G. M., Boyer, L., Dejardin, S., Cappillino, M. P., Yantosca, L. M., Takahashi, K., Moore, K. J., Lacy-Hulbert, A., and Stuart,

- L. M. (2010). Phagocytosis and Phagosome Acidification Are Required for Pathogen Processing and MyD88-Dependent Responses to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.*, 184(12) :7071–7081.
- [Irmscher et al., 2013] Irmscher, M., de Jong, A. M., Kress, H., and Prins, M. W. J. (2013). A method for time-resolved measurements of the mechanics of phagocytic cups. *J. R. Soc. Interface*, 10(82) :20121048–20121048.
- [Jacobsen et al., 2007] Jacobsen, L. C., Theilgaard-Mönch, K., Christensen, E. I., and Borregaard, N. (2007). Arginase 1 is expressed in myelocytes/metamyelocytes and localized in gelatinase granules of human neutrophils. *Blood*, 109(7) :3084–3087.
- [Jaumouillé et al., 2014] Jaumouillé, V., Farkash, Y., Jaqaman, K., Das, R., Lowell, C. A., and Grinstein, S. (2014). Actin cytoskeleton reorganization by syk regulates  $fc\gamma$  receptor responsiveness by increasing its lateral mobility and clustering. *Dev. Cell*, 29(5) :534–546.
- [Jaumouillé and Grinstein, 2016] Jaumouillé, V. and Grinstein, S. (2016). Molecular Mechanisms of Phagosome Formation. *Microbiol. Spectr.*, 4(3) :1–18.
- [Johnson, 1985] Johnson, K. L. (1985). *Contact Mechanics*.
- [Ju and Zhu, 2017] Ju, L. and Zhu, C. (2017). Benchmarks of Biomembrane Force Probe Spring Constant Models. *Biophys. J.*, 113(12) :2842–2845.
- [Keller et al., 2017] Keller, S., Berghoff, K., and Kress, H. (2017). Phagosomal transport depends strongly on phagosome size. *Sci. Rep.*, 7(1) :1–15.
- [Kenneth Murphy, 2012] Kenneth Murphy (2012). *Immunobiology*. Garland sc edition.
- [Kiefer et al., 1998] Kiefer, F., Brumell, J., Al-Alawi, N., Latour, S., Cheng, A., Veillette, A., Grinstein, S., and Pawson, T. (1998). The Syk Protein Tyrosine Kinase Is Essential for  $Fc\gamma$  Receptor Signaling in Macrophages and Neutrophils. *Mol. Cell. Biol.*, 18(7) :4209–4220.
- [Klebanoff et al., 1992] Klebanoff, S. J., Olszowski, S., Van Voorhis, W. C., Ledbetter, J. A., Waltersdorff, A. M., and Schlechte, K. G. (1992). Effects of  $\gamma$ -interferon on human neutrophils : Protection from deterioration on storage. *Blood*, 80(1) :225–234.
- [Klickstein et al., 1996] Klickstein, L. B., York, M. R., De Fougerolles, A. R., and Springer, T. A. (1996). Localization of the binding site on intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3) for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *J. Biol. Chem.*, 271(39) :23920–23927.
- [Köhler and Zeiser, 2019] Köhler, N. and Zeiser, R. (2019). Intestinal microbiota influence immune tolerance post allogeneic hematopoietic cell transplantation and intestinal GVHD. *Front. Immunol.*, 10(JAN) :1–9.

- [Kollmannsberger and Fabry, 2011] Kollmannsberger, P. and Fabry, B. (2011). Linear and Nonlinear Rheology of Living Cells. *Annu. Rev. Mater. Res.*, 41(1) :75–97.
- [Kovari et al., 2016a] Kovari, D. T., Wei, W., Chang, P., Toro, J.-S., Beach, R. F., Chambers, D., Porter, K., Koo, D., and Curtis, J. E. (2016a). Frustrated Phagocytic Spreading of J774A-1 Macrophages Ends in Myosin II-Dependent Contraction. *Biophys. J.*, 111(12) :2698–2710.
- [Kovari et al., 2016b] Kovari, D. T., Wei, W., Toro, J.-S., Fogg, R. E., Porter, K., and Curtis, J. E. (2016b). Frustrated Phagocytic Spreading Dynamics End in Distinct Non-Muscle Myosin II Dependent Contraction. *Biophys. J.*, 110(3) :621a.
- [Kumari et al., 2019] Kumari, A., Pineau, J., Sáez, P. J., Maurin, M., Lankar, D., San Roman, M., Hennig, K., Boura, V. F., Voituriez, R., Karlsson, M. C., Balland, M., Lennon Dumenil, A. M., and Pierobon, P. (2019). Actomyosin-driven force patterning controls endocytosis at the immune synapse. *Nat. Commun.*, 10(1) :1–14.
- [Kumari et al., 2014] Kumari, S., Curado, S., Mayya, V., and Dustin, M. L. (2014). NIH Public Access. *Biochim Biophys Acta*, 27(4) :1–19.
- [Kuznetsov and McPherson, 2011] Kuznetsov, Y. G. and McPherson, A. (2011). Atomic Force Microscopy in Imaging of Viruses and Virus-Infected Cells. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 75(2) :268–285.
- [Lacy, 2006] Lacy, P. (2006). Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology*, 2 :98–108.
- [Lam et al., 2009] Lam, J., Herant, M., Dembo, M., and Heinrich, V. (2009). Baseline Mechanical Characterization of J774 Macrophages. *Biophys. J.*, 96(1) :248–254.
- [Lam et al., 2007] Lam, W. A., Rosenbluth, M. J., and Fletcher, D. A. (2007). Brief report Chemotherapy exposure increases leukemia cell stiffness. 109(8) :3505–3508.
- [Lawrence et al., 2018] Lawrence, S. M., Corriden, R., and Nizet, V. (2018). The Ontogeny of a Neutrophil : Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 82(1) :1–22.
- [Lee et al., 2011a] Lee, C.-Y., Herant, M., and Heinrich, V. (2011a). Target-specific mechanics of phagocytosis : protrusive neutrophil response to zymosan differs from the uptake of antibody-tagged pathogens. *J. Cell Sci.*, 124(Pt 7) :1106–1114.
- [Lee et al., 2003] Lee, W. L., Harrison, R. E., and Grinstein, S. (2003). Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection*, 5 :1299–1306.
- [Lee et al., 2011b] Lee, Y. J., Patel, D., and Park, S. (2011b). Local rheology of human neutrophils investigated using atomic force microscopy. *Int. J. Biol. Sci.*, 7(1) :102–111.

- [Lemaitre and Hoffmann, 2007] Lemaitre, B. and Hoffmann, J. (2007). The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.*, 25(1) :697–743.
- [Lightman, 1973] Lightman, M. A. (1973). Rheology of leukocytes, leukocyte suspensions, and blood in leukemia. Possible relationship to clinical manifestations. *J. Clin. Invest.*, 52(2) :350–358.
- [Liu et al., 2014] Liu, B., Chen, W., Evavold, B. D., and Zhu, C. (2014). Accumulation of dynamic catch bonds between TCR and agonist peptide-MHC triggers T cell signaling. *Cell*, 157(2) :357–368.
- [Liu et al., 2016] Liu, Y., Blanchfield, L., Pui-Yan Ma, V., Andargachew, R., Galior, K., Liu, Z., Evavold, B., and Salaita, K. (2016). DNA-based nanoparticle tension sensors reveal that T-cell receptors transmit defined pN forces to their antigens for enhanced fidelity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 113(20) :5610–5615.
- [Lomakina et al., 2004] Lomakina, E. B., Spillmann, C. M., King, M. R., and Waugh, R. E. (2004). Rheological analysis and measurement of neutrophil indentation. *Biophys. J.*, 87(6) :4246–58.
- [MacKay et al., 2012] MacKay, J. L., Keung, A. J., and Kumar, S. (2012). A genetic strategy for the dynamic and graded control of cell mechanics, motility, and matrix remodeling. *Biophys. J.*, 102(3) :434–442.
- [Mahaffy et al., 2004] Mahaffy, R. E., Park, S., Gerde, E., Käs, J., and Shih, C. K. (2004). Quantitative Analysis of the Viscoelastic Properties of Thin Regions of Fibroblasts Using Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.*, 86(3) :1777–1793.
- [Maksym et al., 2000] Maksym, G. N., Fabry, B., Butler, J. P., Navajas, D., Tschumperlin, D. J., Laporte, J. D., and Fredberg, J. J. (2000). Mechanical properties of cultured human airway smooth muscle cells from 0.05 to 0.4 Hz. *J. Appl. Physiol.*, 89 :1619–1632.
- [Mantovani et al., 2011] Mantovani, A., Cassatella, M. A., and Costantini, C. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Publ. Gr.*, 11(8) :519–531.
- [Marie-Anaïs et al., 2016] Marie-Anaïs, F., Mazzolini, J., Herit, F., and Niedergang, F. (2016). Dynamin-Actin Cross Talk Contributes to Phagosome Formation and Closure. *Traffic*, 17(5) :487–499.
- [Masters et al., 2013a] Masters, T. A., Pontes, B., Viasnoff, V., Li, Y., and Gauthier, N. C. (2013a). Plasma membrane tension orchestrates membrane trafficking, cytoskeletal remodeling, and biochemical signaling during phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 110(29) :11875–11880.

- [Masters et al., 2013b] Masters, T. a., Pontes, B., Viasnoff, V., Li, Y., and Gauthier, N. C. (2013b). Plasma membrane tension orchestrates membrane trafficking, cytoskeletal remodeling, and biochemical signaling during phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110(29) :11875–80.
- [Maxson et al., 2018] Maxson, M. E., Naj, X., O’Meara, T. R., Plumb, J. D., Cowen, L. E., and Grinstein, S. (2018). Integrin-based diffusion barrier separates membrane domains enabling the formation of microbiostatic frustrated phagosomes. *Elife*, 7 :1–37.
- [Metchnikoff, 1901] Metchnikoff, E. (1901). *L’immunité dans les maladies infectieuses*.
- [Moeendarbary et al., 2013] Moeendarbary, E., Valon, L., Fritzsche, M., Harris, A. R., and Dale, A. (2013). The cytoplasm of living cells behaves as a poroelastic material. *Nat. Mater.*, 12(3) :253–261.
- [Molnár et al., 2009] Molnár, E., Dopfer, E.-p., Deswal, S., and Schamel, W. W. A. (2009). Models of Antigen Receptor Activation in the Design of Vaccines. *Curr. Pharm. Des.*, pages 3237–3248.
- [Morimoto and Nakajima, 2019] Morimoto, K. and Nakajima, K. (2019). Role of the Immune System in the Development of the Central Nervous System. *Front. Neurosci.*, 13(September).
- [Needham and Hochmuth, 1990] Needham, D. and Hochmuth, R. M. (1990). Rapid flow of passive neutrophils into a 4  $\mu$ m pipet and measurement of cytoplasmic viscosity. *J. Biomech. Eng.*, 112(3) :269–276.
- [Neubert et al., 2018] Neubert, E., Meyer, D., Rocca, F., Günay, G., Kwaczala-tessmann, A., Grandke, J., Senger-sander, S., Geisler, C., Egner, A., Schön, M. P., Erpenbeck, L., and Kruss, S. (2018). Chromatin swelling drives neutrophil extracellular trap release. *Nature Communications*, (2018) :1–13.
- [Niedergang, 2016a] Niedergang, F. (2016a). Comparative Anatomy of Phagocytic and immunological Synapses. *Front. Immunol.*, 7(January) :1–9.
- [Niedergang, 2016b] Niedergang, F. (2016b). Phagocytosis. *Encycl. Cell Biol.*, 2 :751–757.
- [Niedergang and Grinstein, 2018] Niedergang, F. and Grinstein, S. (2018). How to build a phagosome : new concepts for an old process. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 50 :57–63.
- [Nüsse, 2011] Nüsse, O. (2011). Biochemistry of the phagosome : the challenge to study a transient organelle. *ScientificWorldJournal.*, 11 :2364–81.
- [Nusse and Lindau, 1988] Nusse, O. and Lindau, M. (1988). The dynamics of exocytosis in human neutrophils. *J. Cell Biol.*, 107(6 I) :2117–2123.
- [Olazabal et al., 2002] Olazabal, I. M., Caron, E., May, R. C., Schilling, K., Knecht, D. A., and Machesky, L. M. (2002). Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not Fc $\gamma$ R, phagocytosis. *Curr. Biol.*, 12(16) :1413–1418.

- [Ostrowski et al., 2016] Ostrowski, P. P., Grinstein, S., and Freeman, S. A. (2016). Diffusion Barriers, Mechanical Forces, and the Biophysics of Phagocytosis. *Dev. Cell*, 38(2) :135–146.
- [Otto et al., 2015] Otto, O., Rosendahl, P., Mietke, A., Golfier, S., Herold, C., Klaue, D., Girardo, S., Pagliara, S., Ekpenyong, A., Jacobi, A., Wobus, M., Töpfner, N., Keyser, U. F., Mansfeld, J., Fischer-Friedrich, E., and Guck, J. (2015). Real-time deformability cytometry : On-the-fly cell mechanical phenotyping. *Nat. Methods*, 12(3) :199–202.
- [Papayannopoulos et al., 2010] Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A., and Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*, 191(3) :677–691.
- [Pedruzzi et al., 2002] Pedruzzi, E., Fay, M., Carole, E., Muriel, G., and Gougerot-Pocidalò, M.-A. (2002). Differentiation of PLB-985 myeloid cells into mature neutrophils , shown by degranulation of terminally differentiated compartments in response to N-formyl peptide and priming of superoxide anion production by granulocyte – macrophage colony-stimulating f. (ii) :719–726.
- [Pillay et al., 2010] Pillay, J., Den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L. M., De Boer, R. J., Borghans, J. A., Tesselaar, K., and Koenderman, L. (2010). In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*, 116(4) :625–627.
- [Pontes et al., 2017] Pontes, B., Monzo, P., Gole, L., Le Roux, A. L., Kosmalska, A. J., Tam, Z. Y., Luo, W., Kan, S., Viasnoff, V., Roca-Cusachs, P., Tucker-Kellogg, L., and Gauthier, N. C. (2017). Membrane tension controls adhesion positioning at the leading edge of cells. *J. Cell Biol.*, 216(9) :2959–2977.
- [Powell et al., 2006] Powell, M. S., Barnes, N. C., Bradford, T. M., Musgrave, I. F., Wines, B. D., Cambier, J. C., and Hogarth, P. M. (2006). Alteration of the Fc $\gamma$ RIIa Dimer Interface Affects Receptor Signaling but Not Ligand Binding. *J. Immunol.*, 176(12) :7489–7494.
- [Pradeu, 2019] Pradeu, T. (2019). Immunology and individuality. *Elife*, 8 :1–5.
- [Pradeu Thomas and Eric, 2017] Pradeu Thomas and Eric, V. (2017). The discontinuity theory of immunity. *Sci Immunol*, 13(11) :795–806.
- [Preira et al., 2016] Preira, P., Forel, J.-M., Robert, P., Nègre, P., Biarnes-pelicot, M., Xeridat, F., Bongrand, P., Papazian, L., and Theodoly, O. (2016). The leukocyte-stiffening property of plasma in early acute respiratory distress syndrome (ARDS) revealed by a microfluidic single-cell study : the role of cytokines and protection with antibodies. *Crit. Care*, 20(1) :8.
- [Puech et al., 2011] Puech, P. H., Nevoltris, D., Robert, P., Limozin, L., Boyer, C., and Bongrand, P. (2011). Force measurements of TCR/pMHC recognition at T cell surface. *PLoS One*, 6(7).

- [Puech et al., 2006] Puech, P.-H., Poole, K., Knebel, D., and Muller, D. J. (2006). A new technical approach to quantify cell–cell adhesion forces by afm. *Ultramicroscopy*, 106(8) :637 – 644. Proceedings of the Seventh International Conference on Scanning Probe Microscopy, Sensors and Nanostructures.
- [Quintana et al., 2007] Quintana, A., Schwindling, C., Wenning, A. S., Becherer, U., Rettig, J., Schwarz, E. C., and Hoth, M. (2007). T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104(36) :14418–14423.
- [Ravetto et al., 2014] Ravetto, A., Wyss, H. M., Anderson, P. D., Den Toonder, J. M., and Bouten, C. V. (2014). Monocytic cells become less compressible but more deformable upon activation. *PLoS One*, 9(3).
- [Rigato et al., 2017] Rigato, A., Miyagi, A., Scheuring, S., and Rico, F. (2017). High-frequency microrheology reveals cytoskeleton dynamics in living cells. *Nat. Phys.*, 13(8) :771–775.
- [Roca-Cusachs et al., 2006] Roca-Cusachs, P., Almendros, I., Sunyer, R., Gavara, N., Farré, R., and Navajas, D. (2006). Rheology of passive and adhesion-activated neutrophils probed by atomic force microscopy. *Biophys. J.*, 91(9) :3508–3518.
- [Roca-cusachs et al., 2006] Roca-cusachs, P., Almendros, I., Sunyer, R., Navajas, D., and Farre, R. (2006). Rheology of Passive and Adhesion-Activated Neutrophils Probed by Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.*, 91(November) :3508–3518.
- [Rosales, 2018] Rosales, C. (2018). Neutrophil : A cell with many roles in inflammation or several cell types ? *Front. Physiol.*, 9(FEB) :1–17.
- [Rosenbluth et al., 2006a] Rosenbluth, M. J., Lam, W. A., and Fletcher, D. A. (2006a). Force Microscopy of Nonadherent Cells : A Comparison of Leukemia Cell Deformability. *Biophys. J.*, 90(8) :2994–3003.
- [Rosenbluth et al., 2006b] Rosenbluth, M. J., Lam, W. A., and Fletcher, D. A. (2006b). Force microscopy of nonadherent cells : A comparison of leukemia cell deformability. *Biophys. J.*, 90(8) :2994–3003.
- [Rosenbluth et al., 2008] Rosenbluth, M. J., Lam, W. A., and Fletcher, D. A. (2008). Analyzing cell mechanics in hematologic diseases with microfluidic biophysical flow cytometry. *Lab Chip*, 8(7) :1062–1070.
- [Rosendahl et al., 2018] Rosendahl, P., Plak, K., Jacobi, A., Kraeter, M., Toepfner, N., Otto, O., Herold, C., Winzi, M., Herbig, M., Ge, Y., Girardo, S., Wagner, K., Baum, B., and Guck, J. (2018). Real-time fluorescence and deformability cytometry. *Nat. Methods*, 15(5) :355–358.
- [Rother et al., 2014] Rother, J., Nöding, H., Mey, I., and Janshoff, A. (2014). Atomic force microscopy-based microrheology reveals significant differences in the viscoelastic response between malign and benign cell lines. *Open Biol.*, 4(MAY).

- [Salles et al., 2013] Salles, A., Billaudeau, C., Serge, A., Bernard, A.-M., Phélipot, M.-C., Bertaux, N., Fallet, M., Grenot, P., Marguet, D., He, H.-T., and Hamon, Y. (2013). Barcoding T Cell Calcium Response Diversity with Methods for Automated and Accurate Analysis of Cell Signals ( MAAACS ). *PLoS Comput. Biol.*, 9(9) :24–26.
- [Sawicka et al., 2017] Sawicka, A., Babataheri, A., Dogniaux, S., Barakat, A. I., Gonzalez-Rodriguez, D., Hivroz, C., and Husson, J. (2017). Micropipette Force Probe to quantify single-cell force generation : application to T cell activation. *Mol. Biol. Cell*, 28 :mbc.E17–06–0385.
- [Seder et al., 1994] Seder, B. R. A., Germain, R. N., Linsley, P. S., and Paul, W. E. (1994). B̃ef Detnitive Report. *J. Exp. Med.*, 179(January).
- [Sens and Plastino, 2015] Sens, P. and Plastino, J. (2015). Membrane tension and cytoskeleton organization in cell motility. *J. Phys. Condens. Matter*, 27(27).
- [Shao and Hochmuth, 1996] Shao, J.-Y. and Hochmuth, R. M. (1996). Micropipette Suction. *Biophys. J.*, 71(November) :2892–2901.
- [Shao et al., 1998] Shao, J. Y., Ting-Beall, H. P., and Hochmuth, R. M. (1998). Static and dynamic lengths of neutrophil microvilli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95(12) :6797–6802.
- [Simson et al., 1998] Simson, D. A., Ziemann, F., Strigl, M., and Merkel, R. (1998). Micropipet-Based Pico Force Transducer : In Depth Analysis and Experimental Verification. *Biophys. J.*, 74(April) :2080–2088.
- [Smith et al., 2005] Smith, B. A., Tolloczko, B., Martin, J. G., and Grütter, P. (2005). Probing the Viscoelastic Behavior of Cultured Airway Smooth Muscle Cells with Atomic Force Microscopy : Stiffening Induced by Contractile Agonist. *Biophys. J.*, 88(4) :2994–3007.
- [Sollich, 1997] Sollich, P. (1997). Rheological constitutive equation for a model of soft glassy materials. *Phys. Rev. E - Stat. Physics, Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.*, 58(1) :738–759.
- [Stamenović et al., 2002] Stamenović, D., Liang, Z., Chen, J., and Wang, N. (2002). Effect of the cytoskeletal prestress on the mechanical impedance of cultured airway smooth muscle cells. *J. Appl. Physiol.*, 92(4) :1443–1450.
- [Steffan et al., 1986] Steffan, A. M., Gendrault, J. L., McCuskey, R. S., McCuskey, P. A., and Kirn, A. (1986). Phagocytosis, an unrecognized property of murine endothelial liver cells. *Hepatology*, 6(5) :830–836.
- [Stuart and Ezekowitz, 2005] Stuart, L. M. and Ezekowitz, R. A. B. (2005). Phagocytosis : Elegant complexity. *Immunity*, 22(5) :539–550.

- [Suzaki et al., 1997] Suzaki, E., Kobayashi, H., Kodama, Y., Masujima, T., and Terakawa, S. (1997). Video-rate dynamics of exocytotic events associated with phagocytosis in neutrophils. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 38(3) :215–228.
- [Tauber and Chernyak, 1991] Tauber, A. I. and Chernyak, L. (1991). *Metchnikoff and the Origins of Immunology*.
- [Thoumine et al., 1999] Thoumine, O., Cardoso, O., and Meister, J. J. (1999). Changes in the mechanical properties of fibroblasts during spreading : A micromanipulation study. *Eur. Biophys. J.*, 28(3) :222–234.
- [Toepfner et al., 2018] Toepfner, N., Herold, C., Otto, O., Rosendahl, P., Jacobi, A., Kräter, M., Stächele, J., Menschner, L., Herbig, M., Ciuffreda, L., Ranford-Cartwright, L., Grzybek, M., Coskun, Ü., Reithuber, E., Garriss, G., Mellroth, P., Henriques-Normark, B., Tregay, N., Suttorp, M., Bornhäuser, M., Chilvers, E. R., Berner, R., and Guck, J. (2018). Detection of human disease conditions by single-cell morpho-rheological phenotyping of blood. *Elife*, 7 :1–22.
- [Tran-Son-Tay et al., 1991] Tran-Son-Tay, R., Needham, D., Yeung, a., and Hochmuth, R. M. (1991). Time-dependent recovery of passive neutrophils after large deformation. *Biophys. J.*, 60(October) :856–866.
- [Tsai et al., 1994] Tsai, M. A., Frank, R. S., and Waugh, R. E. (1994). Passive mechanical behavior of human neutrophils : effect of cytochalasin B. *Biophys. J.*, 66(6) :2166–2172.
- [Tsai et al., 1998] Tsai, M. A., Waugh, R. E., and Keng, P. C. (1998). Passive mechanical behavior of human neutrophils : Effects of colchicine and paclitaxel. *Biophys. J.*, 74(6) :3282–3291.
- [Tsai and Discher, 2008] Tsai, R. K. and Discher, D. E. (2008). Inhibition of "self" engulfment through deactivation of myosin-II at the phagocytic synapse between human cells. *J. Cell Biol.*, 180(5) :989–1003.
- [Tse et al., 2013] Tse, H. T., Gossett, D. R., Moon, Y. S., Masaeli, M., Sohsman, M., Ying, Y., Mislick, K., Adams, R. P., Rao, J., and Di Carlo, D. (2013). Quantitative diagnosis of malignant pleural effusions by single-cell mechanophenotyping. *Sci. Transl. Med.*, 5(212).
- [Underhill and Goodridge, 2012] Underhill, D. M. and Goodridge, H. S. (2012). Myeloid phagocytes — including macrophages. *Nat. Publ. Gr.*, 12.
- [Vignali and Strominger, 1994] Vignali, B. D. A. A. and Strominger, J. L. (1994). Amino Acid Residues that Flank Core Peptide Epitopes and the Extracellular Domains of CD4 Modulate Differential Signaling through the T Cell Receptor. *J. Exp. Med.*, 179(June).
- [Vivier and Malissen, 2005] Vivier, E. and Malissen, B. (2005). Innate and adaptive immunity : Specificities and signaling hierarchies revisited. *Nat. Immunol.*, 6(1) :17–21.

- [von Köckritz-Blickwede et al., 2008] von Köckritz-Blickwede, M., Goldmann, O., Thulin, P., Heinemann, K., Norrby-Teglund, A., Rohde, M., and Medina, E. (2008). Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood*, 111(6) :3070–3080.
- [Wang et al., 2019] Wang, K., Sun, X. H., Zhang, Y., Zhang, T., Zheng, Y., Wei, Y. C., Zhao, P., Chen, D. Y., Wu, H. A., Wang, W. H., Long, R., Wang, J. B., and Chen, J. (2019). Characterization of cytoplasmic viscosity of hundreds of single tumour cells based on micropipette aspiration. *R. Soc. Open Sci.*, 6(3).
- [Wang et al., 2001] Wang, N., Naruse, K., Stamenović, D., Fredberg, J. J., Mijailovich, S. M., Tolić-Nørrelykke, I. M., Polte, T., Mannix, R., and Ingber, D. E. (2001). Mechanical behavior in living cells consistent with the tensegrity model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98(14) :7765–7770.
- [Wang et al., 2002] Wang, N., Toli-Nørrelykke, I. M., Chen, J., Mijailovich, S. M., Butler, J. P., Fredberg, J. J., and Stamenović, D. (2002). Cell prestress. I. Stiffness and prestress are closely associated in adherent contractile cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, 282(3 51-3) :606–616.
- [Weafer et al., 2015] Weafer, P. P., Reynolds, N. H., Jarvis, S. P., and McGarry, J. P. (2015). Single cell active force generation under dynamic loading - Part I : AFM experiments. *Acta Biomater.*, 27 :236–250.
- [Wen et al., 2009] Wen, F., White, G. J., Vanetten, H. D., Xiong, Z., and Hawes, M. C. (2009). Extracellular DNA Is Required for Root Tip Resistance to. *Plant Physiology*, 151(October) :820–829.
- [Wu et al., 2018] Wu, P. H., Aroush, D. R. B., Asnacios, A., Chen, W. C., Dokukin, M. E., Doss, B. L., Durand-Smet, P., Ekpenyong, A., Guck, J., Guz, N. V., Janmey, P. A., Lee, J. S., Moore, N. M., Ott, A., Poh, Y. C., Ros, R., Sander, M., Sokolov, I., Staunton, J. R., Wang, N., Whyte, G., and Wirtz, D. (2018). A comparison of methods to assess cell mechanical properties. *Nat. Methods*, 15(7).
- [Yanaga et al., 1996] Yanaga, F., Poole, A., Asselin, J., Blake, R., Schieven, G., Clark, E. A., Law, C. L., and Watson, S. P. (1996). Erratum : Syk interacts with tyrosine-phosphorylated proteins in human platelets activated by collagen and cross-linking of the Fc $\gamma$ -IIA receptor (Biochemical Journal (1995) 311 (471-478)). *Biochem. J.*, 313(3) :1047.
- [Yeung and Evans, 1989] Yeung, A. and Evans, E. (1989). Cortical shell-liquid core model for passive flow of liquid-like spherical cells into micropipets. *Biophys. J.*, 56(1) :139–149.
- [Yousefi et al., 2008] Yousefi, S., Gold, J. A., Andina, N., Lee, J. J., Kelly, A. M., Kozłowski, E., Straumann, A., Reichenbach, J., Gleich, G. J., and Simon, H.-u. (2008). Catapult-like

release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nature Medicine*, 14(9) :949–953.

**Titre :** Mécanique de la phagocytose et comparaison avec d'autres processus immunitaires

**Mots clés :** Biophysique, immunologie, immunité innée

**Résumé :** De multiples interfaces se développent entre la biophysique et divers domaines de la biologie, dont l'immunologie, la science qui étudie le système immunitaire. Ce système est composé d'acteurs cellulaires (les leucocytes) qui réalisent des fonctions immunes telles que la phagocytose, un processus qui consiste en l'internalisation de microorganismes ou de cellules mortes par des cellules spécialisées appelées phagocytes. La phagocytose permet, notamment, de limiter la prolifération d'agents pathogènes et d'établir une réponse immune en recrutant d'autres leucocytes sur le site de l'infection pour contrôler celle-ci. Dans cette thèse, nous avons travaillé avec des phagocytes professionnels : des neutrophiles. Quand un neutrophile phagocyte, ses propriétés élastiques (sa capacité à se déformer, sa rigidité) sont modifiées. Une cellule est cependant un matériau viscoélastique : ses propriétés mécaniques ont une partie élastique et une partie visqueuse (la viscosité est ce qui limite la vitesse de déformation d'une cellule). Nous avons cherché à comprendre le comportement viscoélastique des neutrophiles pendant la phagocytose. Pour cela, nous avons développé un rhéomètre permettant de quantifier ces propriétés pendant que la cellule phagocyte une microbille de polystyrène couverte d'anticorps. Nous avons

tenté de comprendre ce qui pouvait limiter la phagocytose : quand l'objet à internaliser a une surface supérieure aux capacités d'internalisation de la cellule, celui-ci n'est pas totalement internalisé, la phagocytose n'est alors pas complète et est dite frustrée. Nous avons pu établir que les neutrophiles augmentaient non seulement leur surface, mais aussi leur rigidité et leur viscosité pendant la phagocytose. L'augmentation de ces propriétés viscoélastiques est d'autant plus élevée que la microbille à phagocyter est large, sous-entendant un potentiel effet de courbure dans l'évolution de ces propriétés. Nous avons pu montrer que ce n'est pas l'évolution des propriétés viscoélastiques qui limite la phagocytose, mais bien la capacité d'extension de la surface de la cellule. Nous avons comparé le comportement mécanique des neutrophiles à celui de deux autres types de leucocytes : les lymphocytes T CD4+ et les lymphocytes B. Nous avons montré que dans ces deux autres types de leucocytes, l'élasticité et la viscosité de ces cellules augmentaient aussi lors de leur activation par une microbille recouverte d'anticorps pertinents. Il existe par ailleurs dans le lien entre les changements des propriétés élastiques et visqueuses une signature mécanique spécifique du type de leucocyte et de la fonction immune réalisée.

**Title :** Mechanics of phagocytosis and comparison with other immune processes

**Keywords :** Biophysics, immunology, innate immunity

**Abstract :** Multiple interfaces are developing between biophysics and various fields of biology, including immunology, the science that studies the immune system. This system is composed of cellular actors (leukocytes) that perform immune functions such as phagocytosis, a process that consists in internalizing microorganisms or dead cells by specialized cells called phagocytes. Especially, phagocytosis allows limiting the proliferation of pathogens and establishing an immune response by recruiting other leukocytes to the site of infection to control it. In this thesis, we have worked with professional phagocytes : neutrophils. When a neutrophil phagocytoses, its elastic properties (its ability to deform, its stiffness) are modified. However, a cell is a viscoelastic material : its mechanical properties have both an elastic and a viscous part (viscosity is what limits the deformation rate of a cell). We have sought to understand the viscoelastic behavior of neutrophils during phagocytosis. To do so, we have developed a rheometer to quantify these properties while a neutrophil is phagocytosing an antibody-covered polystyrene microbead. We have tried

to understand what could limit phagocytosis : when the object to phagocytose has a surface area greater than the cell's internalization abilities, it is not fully internalized, so phagocytosis is not complete and is said to be frustrated. We were able to establish that neutrophils not only increase their surface area, but also their stiffness and viscosity during phagocytosis. The larger the microbead, the higher the stiffness and the viscosity, implying a potential curvature effect in the evolution of these mechanical properties. We were able to show that it is not the evolution of viscoelastic properties that limits phagocytosis, but rather the ability to extend the cell surface. We then compared the mechanical behavior of neutrophils with two other types of leukocytes : CD4+ T lymphocytes and B lymphocytes. We showed that, in these other two types of leukocytes, there is also an increase in elasticity and viscosity while they are activated by a microbead coated with relevant antibodies. There is also a mechanical signature in the changes in elastic and viscous properties that is specific of the type of leukocyte and the immune function that is achieved.