



HAL
open science

Propriétés mécaniques des Cellules Musculaires Lisses isolées issues d'aortes humaines saines et anévrysmales

Claudie Petit

► **To cite this version:**

Claudie Petit. Propriétés mécaniques des Cellules Musculaires Lisses isolées issues d'aortes humaines saines et anévrysmales. Biomécanique [physics.med-ph]. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSEM014 . tel-03351374

HAL Id: tel-03351374

<https://theses.hal.science/tel-03351374>

Submitted on 22 Sep 2021

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.



N°d'ordre NNT : 2021LYSEM014

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Ecole des Mines de Saint-Etienne

Ecole Doctorale N° 488
Sciences, Ingénierie, Santé

Spécialité de doctorat : Biomécanique
Discipline : Ingénierie

Soutenue publiquement le 26/04/2021, par :
Claudie PETIT

**Propriétés mécaniques des cellules musculaires
lisses isolées issues d'aortes humaines saines et
anévrysmales**

Devant le jury composé de :

Zahouani, Hassan, Professeur, Centrale Lyon ENISE/CNRS UMR 5513	Président
Legallais, Cécile, Directeur de recherche, UTC/CNRS UMR 7338	Rapporteuse
Verdier, Claude, Directeur de recherche, UGA/CNRS UMR 5588	Rapporteur
Guignandon, Alain, Maître de conférences, UJM/INSERM U1059	Examineur
Planus, Emmanuelle, Maître de conférences, UGA/Inserm U1209/CNRS UMR 5309	Examinatrice
Lacolley, Patrick, Directeur de recherche, UHP/DCAC, INSERM UMR U1116	Examineur
Gomez, Delphine, Assistant Professor, University of Pittsburgh	Examinatrice
Avril, Stéphane, Professeur, Mines Saint-Etienne/INSERM UMR U1059	Directeur de thèse
Barnier, Vincent, Ingénieur de recherche, Mines Saint-Etienne/LGF, CNRS UMR 5307	Invité

Spécialités doctorales
 SCIENCES ET GENIE DES MATERIAUX
 MECANIQUE ET INGENIERIE
 GENIE DES PROCEDES
 SCIENCES DE LA TERRE
 SCIENCES ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

Responsables :
 K. Wolski Directeur de recherche
 S. Drapier, professeur
 F. Gruy, Maître de recherche
 B. Guy, Directeur de recherche
 D. Graillot, Directeur de recherche

Spécialités doctorales
 MATHEMATIQUES APPLIQUEES
 INFORMATIQUE
 SCIENCES DES IMAGES ET DES FORMES
 GENIE INDUSTRIEL
 MICROELECTRONIQUE

Responsables
 O. Roustant, Maître-assistant
 O. Boissier, Professeur
 JC. Pinoli, Professeur
 N. Absi, Maître de recherche
 Ph. Lalevée, Professeur

EMSE : Enseignants-chercheurs et chercheurs autorisés à diriger des thèses de doctorat (titulaires d'un doctorat d'Etat ou d'une HDR)

ABSI	Nabil	MR	Génie industriel	CMP
AUGUSTO	Vincent	CR	Image, Vision, Signal	CIS
AVRIL	Stéphane	PR2	Mécanique et ingénierie	CIS
BADEL	Pierre	MA(MDC)	Mécanique et ingénierie	CIS
BALBO	Flavien	PR2	Informatique	FAYOL
BASSEREAU	Jean-François	PR	Sciences et génie des matériaux	SMS
BATTON-HUBERT	Mireille	PR2	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
BEIGBEDER	Michel	MA(MDC)	Informatique	FAYOL
BLAYAC	Sylvain	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
BOISSIER	Olivier	PR1	Informatique	FAYOL
BONNEFOY	Olivier	PR	Génie des Procédés	SPIN
BORBELY	Andras	MR(DR2)	Sciences et génie des matériaux	SMS
BOUCHER	Xavier	PR2	Génie Industriel	FAYOL
BRODHAG	Christian	DR	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
BRUCHON	Julien	MA(MDC)	Mécanique et ingénierie	SMS
CAMEIRAO	Ana	MA(MDC)	Génie des Procédés	SPIN
CHRISTIEN	Frédéric	PR	Science et génie des matériaux	SMS
DAUZERE-PERES	Stéphane	PR1	Génie Industriel	CMP
DEBAYLE	Johan	MR	Sciences des Images et des Formes	SPIN
DEGEORGE	Jean-Michel	MA(MDC)	Génie industriel	Fayol
DELAFOSSÉ	David	PR0	Sciences et génie des matériaux	SMS
DELORME	Xavier	MA(MDC)	Génie industriel	FAYOL
DESRAYAUD	Christophe	PR1	Mécanique et ingénierie	SMS
DJENIZIAN	Thierry	PR	Science et génie des matériaux	CMP
BERGER-DOUCE	Sandrine	PR1	Sciences de gestion	FAYOL
DRAPIER	Sylvain	PR1	Mécanique et ingénierie	SMS
DUTERTRE	Jean-Max	MA(MDC)		CMP
EL MRABET	Nadia	MA(MDC)		CMP
FAUCHEU	Jenny	MA(MDC)	Sciences et génie des matériaux	SMS
FAVERGEON	Loïc	CR	Génie des Procédés	SPIN
FEILLET	Dominique	PR1	Génie Industriel	CMP
FOREST	Valérie	MA(MDC)	Génie des Procédés	CIS
FRACZKIEWICZ	Anna	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
GARCIA	Daniel	MR(DR2)	Sciences de la Terre	SPIN
GAVET	Yann	MA(MDC)	Sciences des Images et des Formes	SPIN
GERINGER	Jean	MA(MDC)	Sciences et génie des matériaux	CIS
GOEURIOT	Dominique	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
GONDRAN	Natacha	MA(MDC)	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
GONZALEZ FELIU	Jesus	MA(MDC)	Sciences économiques	FAYOL
GRAILLOT	Didier	DR	Sciences et génie de l'environnement	SPIN
GROSSEAU	Philippe	DR	Génie des Procédés	SPIN
GRUY	Frédéric	PR1	Génie des Procédés	SPIN
HAN	Woo-Suck	MR	Mécanique et ingénierie	SMS
HERRI	Jean Michel	PR1	Génie des Procédés	SPIN
KERMOUCHE	Guillaume	PR2	Mécanique et Ingénierie	SMS
KLOCKER	Helmut	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
LAFOREST	Valérie	MR(DR2)	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
LERICHE	Rodolphe	CR	Mécanique et ingénierie	FAYOL
MALLIARAS	Georges	PR1	Microélectronique	CMP
MOLIMARD	Jérôme	PR2	Mécanique et ingénierie	CIS
MOUTTE	Jacques	CR	Génie des Procédés	SPIN
NAVARRO	Laurent	CR		CIS
NEUBERT	Gilles			FAYOL
NIKOLOVSKI	Jean-Pierre	Ingénieur de recherche	Mécanique et ingénierie	CMP
NORTIER	Patrice	PR1	Génie des Procédés	SPIN
O CONNOR	Rodney Philip	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
PICARD	Gauthier	MA(MDC)	Informatique	FAYOL
PINOLI	Jean Charles	PR0	Sciences des Images et des Formes	SPIN
POURCHEZ	Jérémy	MR	Génie des Procédés	CIS
ROUSSY	Agnès	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
ROUSTANT	Olivier	MA(MDC)	Mathématiques appliquées	FAYOL
SANAUR	Sébastien	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
SERRIS	Eric	IRD		FAYOL
STOLARZ	Jacques	CR	Sciences et génie des matériaux	SMS
TRIA	Assia	Ingénieur de recherche	Microélectronique	CMP
VALDIVIESO	François	PR2	Sciences et génie des matériaux	SMS
VIRICELLE	Jean Paul	DR	Génie des Procédés	SPIN
WOLSKI	Krzysztof	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
XIE	Xiaolan	PR0	Génie industriel	CIS
YUGMA	Gallian	CR	Génie industriel	CMP

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Monsieur Stéphane Avril, Professeur à l'Ecole des Mines de Saint-Etienne, pour m'avoir encadrée tout au long de cette thèse et pour m'avoir offert la possibilité de travailler sur un sujet tout à fait adapté au savoir-faire que j'avais précédemment développé en master. Il s'agissait d'un travail pionnier pour le laboratoire, et par conséquent d'un pari sur les enjeux d'un travail interdisciplinaire, mais Monsieur Avril m'a accordé sa confiance et je l'en remercie vivement. Qu'il soit également remercié pour sa compréhension, son soutien, et ses conseils, ainsi que pour sa disponibilité et pour avoir fait en sorte que puisse travailler dans les meilleures conditions.

J'adresse tous mes remerciements à Madame Cécile Legallais, directrice de recherche à l'Université de Technologie de Compiègne (CNRS UMR 7338), ainsi qu'à Monsieur Claude Verdier, directeur de recherche au Laboratoire Interdisciplinaire de Physique (CNRS UMR 5588), de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse, de leurs conseils, ainsi que d'avoir rendu un avis très favorable à l'issue de ce travail.

Je remercie Monsieur Alain Guignandon, maître de conférences à l'Université Jean Monnet, de m'avoir formée à l'utilisation de la plateforme de vidéomicroscopie, et pour ses précieux conseils du point de vue de la mécanobiologie dans l'élaboration des différents articles publiés.

Monsieur Lacolley et Madame Véronique Régnault, directeurs de recherche à l'unité Défaillance Cardiovasculaire Aigüe et Chronique (INSERM U 1116), ainsi qu'à Madame Mélusine Didelot, doctorante à l'Université de Lorraine, pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire, et formée à l'extraction des cellules musculaires lisses aortiques à partir d'un échantillon d'aorte, ainsi qu'à la culture primaire. Je remercie également Monsieur Jean Baptiste Michel, et Mme Véronique Ollivier du Laboratoire de Recherche Vasculaire Translationnelle, pour m'avoir envoyé les lignées cellulaires humaines saines les plus appropriées, issues de leur biobanque.

Je souhaite remercier Monsieur Hassan Zahouani, Professeur à l'Ecole Centrale de Lyon-Ecole Nationale d'Ingénieurs de Saint-Etienne (ENISE), d'avoir accepté de présider le jury de thèse, ainsi que pour ses enseignements portant sur la nanoindentation par microscopie à force atomique lors de mon master recherche effectué à l'ENISE.

J'exprime ma gratitude à Madame Emmanuelle Planus, maître de conférences à l'Université Grenoble Alpes, et à Madame Delphine Gomez, maître de conférences à l'Université de Pittsburgh, pour avoir accepté de faire partie du jury en tant qu'examinatrices.

Je tiens aussi à remercier Monsieur Vincent Barnier, ingénieur de recherche à l'école des Mines de Saint-Etienne, de m'avoir formée et aidée lors des expérimentations au microscope à force atomique. Enfin, je tiens à remercier tous les membres du laboratoire SAINBIOSE, du côté de Mines Saint-Etienne comme de côté Faculté de médecine, pour leur volonté d'échanger et d'enrichir nos travaux respectifs en réunissant des spécialistes de la biologie cellulaire, de la mécanobiologie, du génie mécanique, et des simulations numériques. Je citerais notamment Madame Laurence Vico, directrice de l'unité SAINBIOSE, que je remercie pour son intérêt pour mes travaux, ainsi que pour sa gentillesse. Monsieur Arnaud Vanden-Bossche, responsable de la plateforme de vidéomicroscopie, pour avoir inclus mes longues campagnes de manipulations malgré l'emploi du temps souvent complet de l'équipement. Je nomme également Mme Valérie Bin, que je remercie pour sa disponibilité lorsqu'il m'a fallu venir congeler ou décongeler des lignées cellulaires du réservoir d'azote liquide de la faculté de médecine.

Du côté SAINBIOSE école des Mines, je remercie l'équipe du département BioPi, notamment Madame Lara Leclerc, et Madame Gwendolyne Sarry, pour m'avoir laissée utiliser les salles de culture et fait confiance pour gérer la logistique de mes manipulations indépendamment, malgré que je ne sois pas biologiste de formation. Je remercie également le directeur du Centre Ingénierie et Santé, Monsieur Vincent Augusto, pour m'avoir accordé beaucoup de flexibilité dans l'organisation de mes activités. Je tiens également à remercier Mesdames Françoise Bresson, Amélie Chatagnon, et Mariette Chaudier pour leur renfort administratif et leurs renseignements.

Un grand merci aussi à tous les membres du laboratoire, à mes collègues doctorants, qui m'ont finalement très peu croisée pendant ma thèse, puisque je naviguais sans cesse entre les différents laboratoires pour effectuer mes manipulations, et puisque j'ai été stoppée net dans mes activités avant même le confinement de mars 2019, étant donné que j'attendais ma fille, Victoria Sofia, pour l'été.

J'adresse ma reconnaissance envers l'équipe enseignante du département Mesures Physiques de l'IUT de Saint-Etienne, mes anciens professeurs, messieurs Yves Jourlin, Laurent Marconnet, Robert Dengerma, ainsi que leurs collègues, que j'ai pu retrouver en tant qu'enseignante vacataire auprès des étudiants recrutés ces trois dernières années. Je n'oublie pas la chance qu'ils m'ont accordée de reprendre la voie scientifique après un détour non concluant par une année d'architecture, ni leur volonté d'accompagner leurs étudiants avec patience et compréhension.

Je remercie également mes anciens professeurs de l'ENISE, pour leurs enseignements, et pour ce même accompagnement qu'ils m'ont accordé jusqu'à mon entrée en thèse. Merci à Madame Florence Marchi, enseignant-chercheur de l'Institut Néel à Grenoble, qui m'a formée à la microscopie à la force atomique, et encadrée lors de mon projet de fin d'études avec Madame Emmanuelle Planus ; cette première expérience de recherche m'a permis de construire les bases du présent sujet de thèse.

Enfin, pour clore ces remerciements, j'adresse les tous derniers, et non les moindres, à ma famille, mes parents, qui m'ont soutenue tout au long de mes études, ma jeune sœur, qui si elle n'avait pas 6 ans d'écart avec moi serait une véritable jumelle, et l'homme qui partage ma vie, le papa de ma fille, avec qui je rédige une très belle conclusion à un chapitre particulièrement mouvementé de ma vie.

À ma fille, Victoria Sofia

SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS	3
CHAPITRE 1 : Introduction.....	4
1. Introduction au chapitre	4
2. Une thématique multiéchelle.....	4
2.1. Echelle systémique	4
2.2. Echelle tissulaire	7
2.3. Echelle cellulaire : approche épigénétique	8
3. Mécanobiologie.....	9
3.1. Un comportement biomécanique complexe	9
3.2. Homéostasie.....	10
4. Enjeux de cette recherche.....	11
4.1. Projet de recherche associé	11
4.2. Cadre de la thèse.....	12
5. Conclusion	13
CHAPITRE 2 : La Cellule Musculaire Lisse, témoin de l'état biophysique de la paroi vasculaire.....	15
1 Introduction.....	15
2 Résumé de la revue	15
3 Revue.....	20
3.1 Abstract	20
3.2 Introduction.....	20
3.3 Basics of aortic wall mechanics and passive biomechanical role of SMCs.....	23
3.4 Active biomechanical behavior	27
3.5 Mechanosensing and mechanotransduction	33
3.6 Summary and future directions.....	39
3.7 Liste des tables	40
Conclusion	45
CHAPITRE 3 : Mesure de contractilité par Traction Force Microscopy	47
1. Introduction.....	47
2. Résumé de la publication	47
3. Contenu de la publication	50
3.1. Abstract	50
3.2. Introduction.....	51
3.3. Material and methods.....	52
3.4. Results	58
3.5. Discussion	65
3.6. Conclusion	69

4. Conclusion	70
CHAPITRE 4 : Comparaison de la contractilité des CML saines et anévrismales.....	72
1. Introduction.....	72
2. Résumé de la publication	72
3. Contenu de la publication	75
3.1. Abstract	75
3.2. Introduction.....	76
3.3. Materials and methods	77
3.4. Results	83
3.5. Discussion	88
3.6. Conclusion	90
3.7. Acknowledgements	90
4. Conclusion	91
CHAPITRE 5 : Mesure de la rigidité des CML saines et anévrismales par nanoindentation AFM	93
1. Introduction.....	93
2. Résumé de la publication	93
3. Contenu de la publication	97
3.1. Abstract	97
3.2. Introduction.....	97
3.3. Material and methods.....	99
3.4. Results	105
3.5. Discussion	109
3.6. Conclusion	112
4. Conclusion	113
CHAPITRE 6 : Conclusions & Perspectives	115
1. Introduction.....	115
2. Récapitulatif des résultats et discussion	116
2.1. Méthodologie utilisée	116
2.2. Chapitre 2	117
2.3. Chapitre 3	117
2.4. Chapitre 4	119
2.5. Chapitre 5	120
3. Limitations et perspectives	123
3.1. Limitations	123
3.2. Perspectives.....	125
4. Conclusion	133
ANNEXES.....	134
RÉFÉRENCES	180

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α -SMA : Alpha Smooth Muscle Actin

AA : Anévrisme aortique

AATA : Anévrisme de l'Aorte Thoracique Ascendante

AC-I : Anticorps primaire

AC-II : Anticorps secondaire

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFM : Atomic Force Microscopy

BSA : Bovine Albumine Serum

CML : Cellule Musculaire Lisse

DIC : Digital Image Correlation

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic Acid

EF : Eléments Finis

FA : Focal Adhesion

F-Actin : Filamentous Actin

Fn : Fibronectine

GAG : Glycosaminoglycane

MEC : Matrice extracellulaire

PBS : Phosphate Buffered Saline

SmBM : Smooth muscle Basal Medium

SmGM : Smooth muscle Growth Medium

SVF : Serum de Veau Foetal

TFM : Traction Force Microscopy

CHAPITRE 1

Introduction

Contexte scientifique et académique de la thèse

1. Introduction au chapitre

Ce chapitre introductif constitue une immersion dans l'environnement scientifique de cette thèse, en établissant des bases de connaissances globales à propos du contexte anatomique de l'objet d'étude, à savoir l'aorte, et de son aspect multiéchelle. Dans cette thèse nous cherchons à élucider les conséquences des pathologies cardiovasculaires sur la réponse biomécanique de l'aorte et de la cellule musculaire lisse.

2. Une thématique multiéchelle

Alors que les précédents travaux du laboratoire SAINBIOSE (INSERM UMR 1059) se sont focalisés sur l'échelle tissulaire de l'aorte thoracique ascendante (Duprey et al., 2016; Romo, 2014; Trabelsi et al., 2015), il est important de considérer que tout tissu biologique est lui-même constitué d'un ensemble de cellules et d'une matrice extracellulaire (Fig. 1.1), et il est naturel de se demander comment se traduit le comportement mécanique du tissu à partir de celui de la cellule.

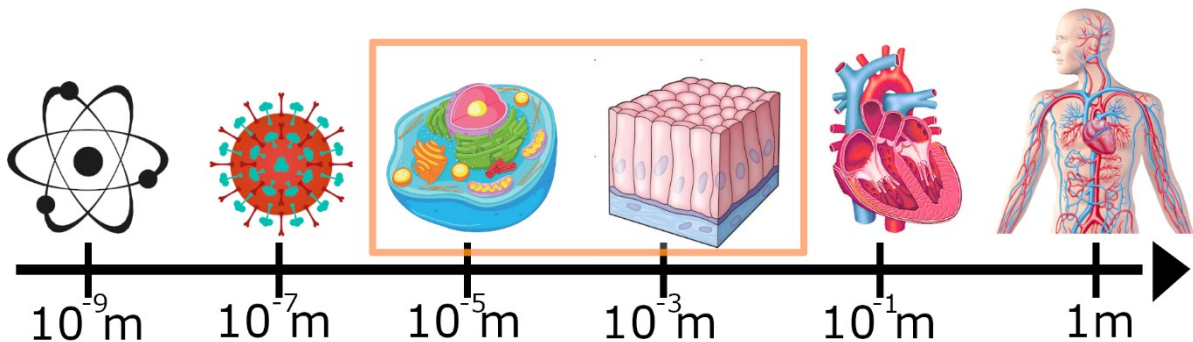


Figure 1.1 Echelle du vivant : encadré en orange : le tissu est constitué d'un ensemble de cellules, unité de base du vivant.
Sources des différentes figures : <http://clipart-library.com>

2.1. Echelle systémique

2.1.1. L'appareil cardiovasculaire

L'appareil cardiovasculaire fait référence au système de conduction et de distribution du sang à travers tout l'organisme. La circulation du sang est impulsée par le cycle cardiaque, rythmé par la systole (éjection du sang en dehors du cœur par contraction des ventricules) et la diastole (aspiration du sang dans les ventricules). Le cœur agit alors comme une pompe qui permet la circulation du sang

vers l'ensemble des tissus du corps grâce à des vaisseaux de différents types, et suivant un sens de parcours établi selon la décroissance du diamètre des vaisseaux traversés (Cabrera Fischer, 2019). Ainsi, les artères délivrent le sang oxygéné depuis le ventricule gauche jusqu'aux artérioles, puis aux capillaires qui alimentent alors les tissus en oxygène et en nutriments.

En échange, ces mêmes tissus produisent des déchets et appauvrissent le sang en oxygène, qui ressort et remonte vers le cœur par le système veineux : d'abord par les veinules liées aux tissus, puis par les veines musculaires et enfin par les veines fibreuses et la veine cave liée au ventricule droit (Fig. 1.2). La réoxygénation du sang à la sortie du ventricule droit a lieu entre les globules rouges circulant dans le système capillaire pulmonaire et les alvéoles pulmonaires, grâce à un phénomène d'échanges gazeux (Powers and Dhamoon, 2020; Wagner, 2015). Les globules rouges ont en effet un cytoplasme riche en hémoglobine, une protéine capable de fixer le dioxygène, ce qui leur permet de le transporter jusqu'aux alvéoles (Pittman, 2011). Le sang réoxygéné parvient de nouveau au ventricule gauche, prêt à être réexpulsé lors de la prochaine systole par l'aorte.

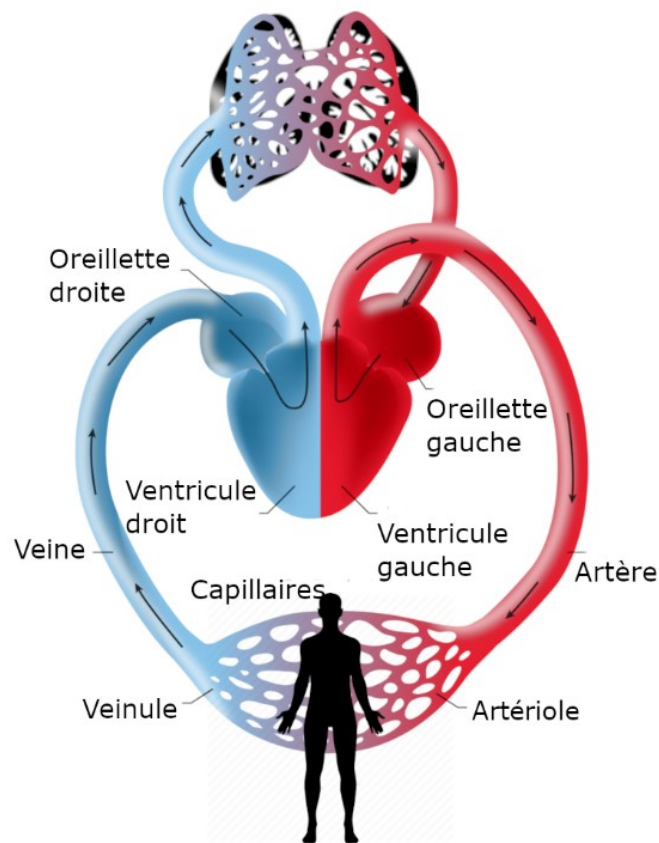


Figure 1.2 Schématisation du système cardiovasculaire. Sources des différentes figures : <http://clipart-library.com>

2.1.2. Zoom sur l'aorte

L'aorte, et plus généralement les artères, contribuent à la distribution du débit sanguin et de l'oxygène porté par les globules rouges vers tous les tissus de l'organisme, et peuvent être classées en trois catégories selon l'ordre croissant de leur diamètre :

- Les artérioles (<100µm de diamètre, ce sont les plus proches des tissus desservis)
- Les artères musculaires (1 à 10mm de diamètre, faisant le lien entre les artères élastiques et les artérioles)
- Les artères élastiques (2 à 3 cm de diamètre, dont le rôle est de réguler le débit sanguin à la sortie du cœur).

L'aorte constitue la plus grosse artère de l'organisme chez les mammifères. Elle relie le ventricule gauche du cœur à l'abdomen, et parvient aux membres inférieurs du corps en se divisant en deux artères : les artères iliaques communes. L'aorte est également divisée en deux parties par rapport au diaphragme : l'aorte thoracique et l'aorte abdominale (Fig. 1.3).

En réalité, l'aorte thoracique est elle-même constituée de trois parties, à savoir la crosse aortique, l'aorte ascendante, et la racine aortique en sortie du cœur (Fig. 1.3).

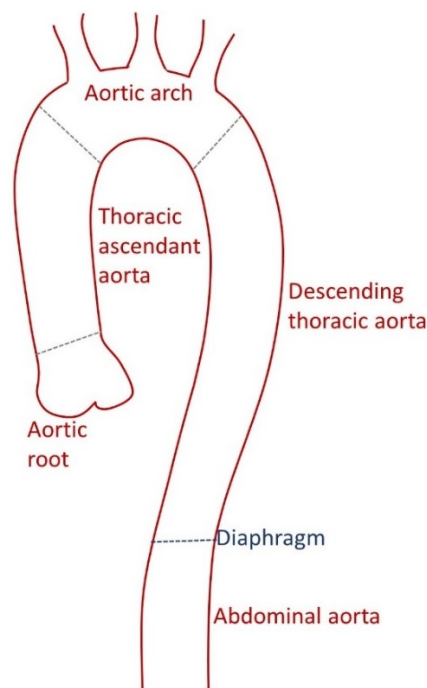


Figure 1.3 L'aorte comporte plusieurs parties : l'aorte abdominale est séparée de l'aorte thoracique par le diaphragme. L'aorte thoracique est quant à elle dissociée en trois parties : la crosse aortique (aortic arch), l'aorte ascendante (ascending aorta), et la racine aortique (aortic root).

2.1.3. Fonctionnalité spécifique de l'aorte

L'aorte est la plus grosse des artères élastiques, dont les parois sont riches en élastine qui leur confère une importante extensibilité. L'aorte est soumise, de par le rythme cardiaque, à des cycles successifs de charge/décharge avec une variation cyclique de la pression sanguine. Le cycle cardiaque envoie, lors de la systole, environ 100 mL de sang vers l'aorte (Romo, 2014), qui subit une soudaine augmentation de pression, mais dont les propriétés élastiques naturelles permettent de supporter ce volume d'éjection par distension de la paroi. Lors de la diastole, l'aorte tend à retrouver sa morphologie initiale en restituant l'énergie accumulée lors de la systole sous forme d'un flux sanguin continu (Fig. 1.4). Ce cycle d'extension/contraction de l'aorte au cours du cycle cardiaque est à l'origine

de l'effet Windkessel, qui contribue au maintien d'un débit sanguin continu à partir d'un débit pulsé discontinu, et ce sur l'ensemble de l'aorte (Romo, 2014).

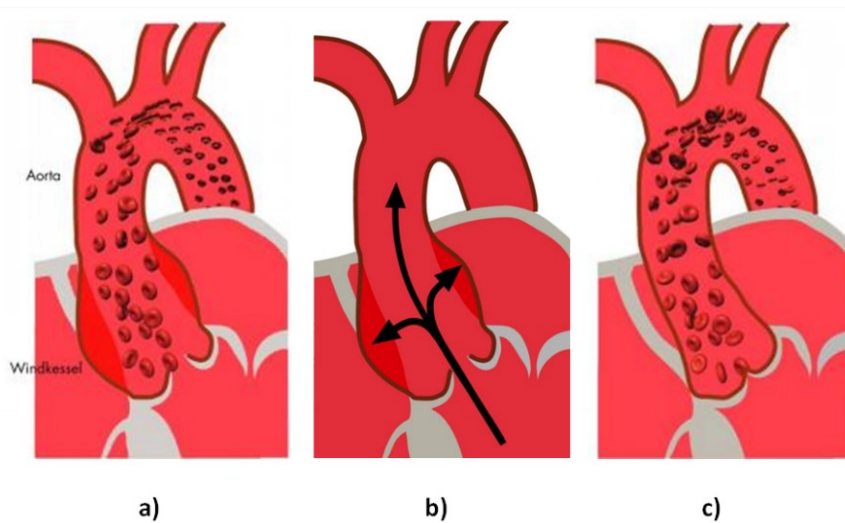


Figure 1.4 Effet Windkessel dans l'aorte thoracique ascendante. a) et b) Pendant la systole, le sang éjecté provoque la distension de l'artère, c) pendant la diastole, l'artère reprend son calibre initial grâce à la contraction élastique (Romo, 2014).

Cependant, la capacité naturelle de l'artère élastique à encaisser les efforts subis en situation normale peut être altérée par une modification géométrique ou physique de la paroi artérielle. Autrement dit, toute modification de l'élasticité de la paroi causée entre autres par le vieillissement, les mutations génétiques ou certaines pathologies entraîne un risque de fragilisation et par conséquent des dysfonctionnements à plus ou moins long terme :

- Chroniques → hypertension, troubles vasculaires, insuffisance cardiaque, formation d'un anévrisme...
- Aigus → accident vasculaire cérébral, infarctus, rupture d'anévrisme...

Les répercussions biomécaniques de la pathologie sur le fonctionnement de l'aorte seront détaillées dans le **Chapitre 2**. Dans un premier temps, il est important de saisir les grandes lignes de la structure et de la réponse mécanique complexes de la paroi aortique.

2.2. Echelle tissulaire

2.2.1. Structure de la paroi aortique

Généralement, la structure des artères, et plus particulièrement de l'aorte, comporte trois couches (Rapp, 1997; Romo, 2014):

- L'intima, d'épaisseur très faible car constituée d'une monocouche de cellules endothéliales. Elle délimite la lumière de l'artère et est en contact direct avec le flux sanguin, et permet des échanges biochimiques entre le flux sanguin et les couches internes de la paroi.
- La media, contenant des cellules musculaires lisses au sein d'une matrice riche en élastine. Il s'agit de la couche la plus épaisse, à savoir 2/3 de l'épaisseur totale de la paroi aortique.
- L'adventice, couche la plus externe, qui représente 1/3 de l'épaisseur globale, et qui contient notamment des fibroblastes, dans une matrice riche en collagène, apte à protéger

la paroi contre les fortes sollicitations mécaniques (Humphrey et al., 2015; Wagenseil and Mecham, 2009; Wolinsky and Glagov, 1964).

2.2.2. Composition des différents tissus

Chacune des couches de la paroi contient un type de cellule spécifique au sein d'une matrice extracellulaire (ECM), formant le tissu conjonctif. L'ECM contient principalement de l'élastine et du collagène, participant à la formation des fibres élastiques, et en proportion particulière selon le type d'artère, des Glycosaminoglycanes (GAG), mais également des glycoprotéines d'adhésion cellulaire telles que la laminine ou la fibronectine. L'ECM contribue donc tout autant au maintien des propriétés mécaniques de la paroi artérielle, mais fournit également un support adhésif aux cellules qui la constituent (Humphrey, 2002). Certaines interactions biochimiques existent également entre les composés de l'ECM et les cellules, ce qui influe sur la réponse cellulaire.

2.3. Echelle cellulaire : approche épigénétique

Au niveau international, de nombreux travaux de recherche pluridisciplinaires se sont intéressés à l'influence des propriétés physiques de l'environnement des cellules sur leur comportement (Brown et al., 2010; Gomez et al., 2015; Jansen et al., 2017; Park et al., 2011; Saez et al., 2007; Timraz et al., 2015). Ainsi, tout porte à croire que la réponse de la cellule ne dépend pas uniquement de son code génétique, porté par l'ADN de son noyau, mais également de l'influence de l'environnement qu'elle perçoit au travers de sa structure interne mécanosensible, ce qui constitue la base de l'approche dite épigénétique. Il apparaît en effet de plus en plus évident que la cellule constitue un capteur hautement spécialisé dans la détection des plus infimes variations de son environnement, qu'elle retranscrit au travers d'une réponse cellulaire adaptée à ce qu'elle perçoit (Ahmed et al., 2015; Park et al., 2011; Saez et al., 2007).

Différents types de cellules se côtoient au sein même de l'aorte et s'organisent selon les trois couches qui composent sa paroi. Mais seule la couche intermédiaire, la media, contient des cellules possédant la particularité d'être très contractiles : les Cellules Musculaires Lisses (CML).

2.3.1. Caractéristiques principales de la cellule musculaire lisse

Les CML se présentent sous la forme d'un fuseau très allongé. Il s'agit de cellules contractiles capables d'apporter la capacité de résilience de la paroi artérielle, à savoir sa capacité à pouvoir surmonter les brusques variations de pression dues à la pulsation du flux sanguin hors du cœur. Elles demeurent par ailleurs toujours partiellement contractées afin de maintenir le tonus basal de la paroi aortique. Le **Chapitre 2** détaillera les mécanismes induits à l'échelle cellulaire par la CML lors de sa contraction.

Chaque CML est entourée d'une lame basale externe assurant la liaison avec l'ECM grâce aux protéines d'adhésion qui y sont présentes. Les interactions de la CML avec son ECM constituent une composante essentielle dans la modulation de sa réponse, ce qui sera également abordé au **Chapitre 2**. L'absence de lame basale autour des jonctions gap, permet d'assurer le contact direct entre les CML qui peuvent alors communiquer entre elles (Balas, D. and Philip, P., 2002). Ces jonctions permettent de transmettre l'excitation électrochimique à toutes les CML du tissu et à synchroniser par conséquent la contraction au travers de la media, et plus généralement de la paroi.

2.3.2. La cellule musculaire lisse au cœur des préoccupations

L'intérêt s'est particulièrement focalisé dans la littérature sur ces cellules que l'on retrouve fréquemment sous un autre phénotype dans le cas de nombreuses pathologies, dont les anévrismes de l'aorte (Crosas-Molist et al., 2015; Kuang et al., 2012; Mao et al., 2015; Thyberg et al., 1995). Plus récemment, la revue de *Humphrey et al.* (Humphrey et al., 2015) a mis en évidence la présence d'un état mécanique d'équilibre, l'homéostasie, vers lequel tendent les CML au travers de leur matrice extracellulaire (Hayashi and Naiki, 2009). En dehors de cet état d'équilibre homéostatique, elles enclenchent un phénomène de remodelage tissulaire en réponse à un environnement qu'elles perçoivent comme étant endommagé, dans le but de le réparer. Il existe plusieurs types de stimuli pouvant induire une réponse cellulaire, mais du point de vue du génie mécanique, ce sont les contraintes que les CML perçoivent au sein de la paroi aortique dilatée qui jouent le rôle de signal d'alarme à propos de l'état pathologique du tissu. Les CML seraient par conséquent capables d'adapter leur tonus face à la variation durable des contraintes au sein de la paroi.

3. Mécanobiologie

Cette section établit les grandes lignes des propriétés mécaniques de la paroi aortique, nécessaires à son bon fonctionnement face aux sollicitations permanentes engendrées par le passage du flux sanguin. Elle introduit le fait que cet équilibre naturel est mis en danger par le vieillissement ou les pathologies cardiovasculaires.

3.1. Un comportement biomécanique complexe

3.1.1. Un matériau hétérogène

La paroi aortique constitue un matériau composite hétérogène, constitué d'une partie solide (tissu conjonctif et cellules) et d'une partie fluide, disposées en différentes couches n'ayant pas les mêmes propriétés mécaniques (Humphrey, 2002; Pasta et al., 2013).

3.1.2. Hypothèses simplificatrices

Etant donné que la paroi aortique contient près de 70% à 80 % d'eau, l'hypothèse d'incompressibilité est ici retenue dans les travaux de cette thèse, et notamment dans la partie modélisation en vue de simplifier la représentation mathématique de la réponse biomécanique de l'aorte.

Par ailleurs, au vu de l'épaisseur prédominante de la media (2/3) par rapport à l'adventice (1/3) et à l'intima (monocouche de cellules), on se focalisera sur la media. Dans le cas d'autres pathologies, comme l'athérosclérose, l'intima subit en revanche un épaissement, ce qui lui confère un rôle mécanique majeur.

3.1.3. Réponse passive et réponse active

Considérant que la media seule est impliquée dans la réponse biomécanique de la paroi, la disposition hélicoïdale, presque circonférentielle, des CML autour de la lumière de l'artère, leur synchronisation par communication intercellulaire, ainsi que l'orientation dans la même direction des fibres du tissu conjonctif, tout laisse à penser que la media tend vers une structure optimisée de manière à reprendre les efforts subis par le passage du flux sanguin et à les transmettre sans

discontinuité en conditions physiologiques normales (Berridge, 2008; Brozovich et al., 2016; Humphrey, 2002; Tuna et al., 2012; Wagenseil and Mecham, 2009; Wolinsky and Glagov, 1964). Plusieurs travaux ont déjà mis en évidence la réponse mécanique de la paroi aortique en ne prenant en compte que la réponse de l'ECM (Humphrey, 2002; Pasta et al., 2013; Wagenseil and Mecham, 2009). Toutefois, il est important de distinguer cette réponse dite « passive » face aux sollicitations induites par le passage du flux sanguin de la réponse possiblement « active » de la paroi comme en témoigne la littérature (Hayashi and Naiki, 2009; Humphrey, 2002; Humphrey et al., 2015; Matsumoto et al., 1996; Sherifova and Holzapfel, 2020; Wagenseil and Mecham, 2009).

En effet, la paroi conserve une certaine tension, due aux contraintes résiduelles persistant au travers du tissu conjonctif, précontraint lors de sa synthèse par les cellules constitutives de la paroi, mais également à la persistance d'une contraction des CML de la media : c'est le phénomène d'homéostasie (Humphrey, 2002; Humphrey et al., 2015; Kassab, 2008; Schildmeyer et al., 2000). Ce phénomène a été mis en évidence lors d'expériences de coupe radiale sur des anneaux d'artère initialement non chargés, et qui finissent par s'ouvrir brutalement suite à la coupe, minimisant ainsi l'énergie stockée par précontrainte (Fig. 1.5).



Figure 1.5 Ouverture instantanée d'un anneau d'artère (droite) initialement non chargé (gauche), suite à une coupure selon la direction radiale (Humphrey, 2002)

3.2. Homéostasie

3.2.1. Propriétés mécaniques de la media

Tandis que l'élastine confère au tissu son extensibilité, le collagène augmente sa résistance mécanique. Le collagène entre en action pour protéger l'élastine et les CML de la media contre une trop grande sollicitation en déchargeant une partie de la contrainte subie par le tissu au fur et à mesure qu'elle augmente (Humphrey et al., 2015; Wagenseil and Mecham, 2009; Wolinsky and Glagov, 1964). Ainsi, à de faibles sollicitations, l'élastine et les microfibrilles jouent le rôle principal, et ce n'est qu'à partir d'un certain niveau de pression que le collagène prend le relais (Wolinsky and Glagov, 1964). Plus généralement, le tissu aortique est constitué d'une proportion élastine/collagène spécifique lui conférant ses propriétés mécaniques particulières (Arribas et al., 2006; Tsamis et al., 2013). Différentes teneurs en élastine relativement au collagène sont associées à chaque partie de l'aorte (Tsamis et al., 2013). Ainsi, la partie de l'aorte thoracique ascendante possède son propre ratio élastine/collagène, qui est adapté à sa fonction.

3.2.2. Un équilibre structurel fragile

La destruction des fibres d'élastine suite au vieillissement ou à une pathologie est un phénomène irréversible, puisque l'élastine régénérée à l'âge adulte n'est pas aussi efficace que celle qui a été développée à l'origine pendant les premiers stades du développement (Arribas et al., 2006). La perte d'élastine, en combinaison avec la synthèse active de collagène lors du phénomène de remodelage, conduit à une modification significative du ratio élastine/collagène et modifie de façon permanente les propriétés mécaniques de la paroi.

La rigidité de la media peut en effet se retrouver affectée par le phénomène de remodelage tissulaire, induit par les CML en vue de réparer un tissu qu'elles perçoivent défectueux en cas de pathologie. Dans ce cas les CML se mettent à synthétiser davantage de collagène, ce qui entraîne par conséquent une diminution du ratio élastine/collagène. La media tend donc à perdre de son élasticité initiale au profit d'une rigidification de la paroi. Cette augmentation de rigidité lui permet effectivement de se renforcer face aux contraintes mécaniques élevées, mais cela la fragilise en contrepartie, et la rend de ce fait plus sujette à la rupture.

Elastine et collagène font partie des composants mécaniques passifs, tandis que les CML sont des éléments actifs de par leur capacité à se contracter durablement, et à maintenir un tonus basal (Humphrey, 2002; Murtada et al., 2016b; Sherifova and Holzapfel, 2020).

4. Enjeux de cette recherche

4.1. Projet de recherche associé

4.1.1. Contexte académique et scientifique du projet de recherche

Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans le projet « *Biochanics - Localization in biomechanics and mechanobiology of aneurysms : Towards personalized medicine* », bénéficiant du support d'une bourse de l'European Research Council : ERC-2014CoG BIOLOCHANICS pour la période 2015-2020.

Le Centre Ingénierie et Santé (CIS), rattaché à l'école des Mines de Saint-Etienne, a accueilli au sein de l'équipe DVH (*Dysfonctions Vasculaires et de l'Hémostase*) de son laboratoire SAINBIOSE INSERM U1059 les travaux de cette thèse. Ce laboratoire mène depuis une dizaine d'années des travaux de recherche sur la mécanique des tissus biologiques et particulièrement sur la compréhension et la modélisation des ATAA.

En ce qui concerne la thématique de l'ATAA dans le milieu médical, le risque de rupture est encore traditionnellement jugé sur le critère du diamètre de l'anévrisme. De ce fait, un diamètre inférieur à 5.5cm ne conduira pas souvent à une intervention chirurgicale, malgré que des cas de rupture aient été rapportés en-dessous de cette valeur (Fillinger, 2007). C'est pourquoi le besoin de développer de nouvelles méthodes de caractérisation et de prévention du risque de rupture est apparu, et ce sur quoi le projet *Biochanics* a été initié.

4.1.2. Etat de l'art en interne

Les précédents travaux issus du projet de recherche se sont focalisés sur l'échelle tissulaire de l'aorte thoracique ascendante. Les premières investigations se sont penchées sur le développement

de nouvelles méthodes de diagnostic s'appuyant sur des méthodes inverses de caractérisation par corrélation d'image afin d'estimer les paramètres du tissu aortique anévrysmal (Kim et al., 2012, 2011). L'équipe a ensuite pu mettre en avant pour la première fois dans la littérature l'existence de zones fragilisées lorsque la rupture du tissu était imminente par des tests de gonflement (Romo et al., 2014).

Par la suite, avec la mise en place de l'ERC, ces travaux ont permis d'identifier le risque de rupture de la paroi aortique d'après des modèles éléments finis reconstruits à partir de la géométrie réelle du patient, initiant alors un chemin vers le traitement personnalisé de la pathologie (Trabelsi et al., 2015).

L'application du génie mécanique à la caractérisation des propriétés mécaniques locales de l'artère s'appuie sur le développement de méthodes numériques inverses, et est devenue le véritable cœur de métier du laboratoire. Ces méthodes novatrices visent à prédire plus efficacement le risque de rupture de l'ATAA par la modélisation mathématique (Bersi et al., 2016). Ces travaux se veulent de plus en plus orientés vers une caractérisation locale de la paroi soumise à un ensemble complexe de contraintes lors du cycle cardiaque, afin de déterminer plus précisément où risque d'avoir lieu la rupture (Farzaneh et al., 2019).

Toutefois, étant donné que l'ATAA comporte une dimension multiéchelle, il est naturel de se demander comment se traduit le comportement mécanique du tissu à partir de ces éléments constitutifs. Si celui de l'ECM a déjà été investigué au travers des fibres de collagène de l'adventice au laboratoire (Cavinato et al., 2020, 2017), pour celui de la cellule le mystère reste entier.

Suite à mon master portant sur l'investigation des propriétés mécaniques locales de la cellule animale isolée par des méthodes d'ingénierie physique (Petit, C., 2017), cette thèse représente la juste continuité dans le développement d'un savoir et d'un savoir-faire pluridisciplinaires. L'association des techniques instrumentales, du génie mécanique et de la biologie cellulaire a pu démontrer un potentiel particulier pour l'enrichissement du projet *BioMechanics*.

4.2. Cadre de la thèse

4.2.1. Apports du projet de thèse

Cette thèse a été mise en place dans le but d'affiner le modèle tissulaire précédemment développé au laboratoire avec la prise de compte de l'échelle cellulaire, voire également subcellulaire. Cette volonté s'accompagne d'une réelle difficulté à descendre à ce niveau de détail, étant donné l'extrême sensibilité d'un matériau biologique, et d'autant plus lorsqu'il s'agit de la cellule vivante.

En effet, le plus grand obstacle à surmonter demeure l'élaboration d'un protocole adapté pour l'application des techniques d'ingénierie disponibles à la caractérisation de la cellule vivante. La cellule ne présente pas la même docilité que tout autre matériau standard. Il s'agit d'un matériau fragile, possédant sa propre intelligence, et un langage qui demeure encore largement inintelligible à l'heure actuelle. Toutefois, au vu du manque de données quantitatives à propos des propriétés mécaniques de la CML aortique humaine, ces obstacles méritent d'être surmontés.

Notre objectif est d'explorer et de comprendre comment les modifications de l'environnement mécanique des CML impactent leur tonus basal et leur rigidité.

4.2.2. Collaborations

Les travaux de cette thèse ont été enrichis de par la collaboration avec d'autres membres de l'équipe : M. S. Jamaledin Mousavi, sur le modèle de l'aorte prenant en compte la réponse active des CML, et M. Ali-Akbar Karkhaneh, sur le développement d'un modèle éléments finis de la CML.

Nous avons également collaboré avec l'équipe LBTO (*Laboratoire de Biologie des Tissus Ostéo-articulaires*) de SAINBIOSE où les biologistes s'intéressent à l'impact des stimuli mécaniques sur la biologie des cellules de l'os. Les travaux présentés dans ce mémoire ont bénéficié de l'aide de M. Alain Guignandon, Maître de Conférences spécialisé en mécanobiologie, notamment pour la biologie et la prise en main de la vidéomicroscopie/microscopie à fluorescence. Enfin, cette thèse m'a également permis d'encadrer trois stages de master.

En raison du déroulement de cette thèse, du volume de données expérimentales, de la variété des travaux présentés et de la richesse des collaborations, la rédaction s'appuie sur les articles qui sont venus marquer successivement son déroulement. Ce type de rédaction permet ainsi de suivre la logique de développement des travaux réalisés, tout en marquant l'apport de chacun d'entre eux pour la communauté scientifique au travers des publications. Une liste récapitulative des articles publiés sera indiquée à la fin de ce mémoire.

5. Conclusion

Au vu de la fonction de l'aorte et de sa localisation dans l'organisme, il en ressort avec évidence qu'il s'agit d'un organe particulièrement sensible en cas de pathologie telle que l'AATA. De par sa complexité physique et biologique, les travaux précédents du laboratoire se sont attachés à investiguer les propriétés mécaniques fondamentales du tissu aortique et à prédire plus efficacement le risque de rupture en cas d'AATA. Cette thèse s'inscrit par conséquent bien dans la continuité de ces recherches, en enrichissant les connaissances de la pathologie grâce au lien entre le génie mécanique, le génie physique, et la biologie cellulaire. La rédaction de ce mémoire s'appuie sur des publications déjà acceptées ou soumises, afin de retranscrire la logique du développement expérimental, la pluralité des travaux présentés, la richesse des collaborations extérieures, ainsi que l'apport concrétisé de ces connaissances pour la communauté scientifique.

C'est dans ce cadre que se définissent les travaux de cette thèse, en venant ajouter un degré supplémentaire de précision à l'échelle cellulaire et subcellulaire dans la compréhension des liens de causes à effets impliqués dans l'apparition et le développement de l'AATA. Les objectifs de ces travaux seront :

- L'établissement d'un état de l'art complet à propos de la CML vasculaire humaine et des données disponibles à son sujet
- Le développement de méthodes pour l'extraction, la culture de CML aortiques humaines, et l'application des techniques instrumentales à disposition pour leur caractérisation
- La caractérisation des propriétés mécaniques de la CML humaine saine et anévrismale, à savoir son tonus et sa rigidité apparente

- Etablir le lien entre deux disciplines distinctes afin de contourner les difficultés liées à l'étude de la CML en tant que matériau et enrichir l'état des connaissances actuelles à son propos

Le **Chapitre 2** se focalisera davantage sur le rôle de la CML à l'échelle cellulaire et son implication dans la pathologie anévrismale. Ce chapitre fera par la même occasion l'état de l'art des connaissances à ce sujet, posant ainsi les bases de l'étude et mettant en avant les pistes à creuser dans le cadre de cette thèse. Le **Chapitre 3** présentera le développement d'un premier travail expérimental pour l'évaluation du tonus basal de la CML. Il sera complété par le **Chapitre 4** qui présentera quant à lui l'application du protocole établi précédemment à un plus grand nombre d'échantillons afin d'établir une comparaison entre CML saines et anévrismales issues de donneurs d'âge et de genres correspondants. Le **Chapitre 5** présentera une autre application expérimentale à propos de la cartographie des propriétés mécaniques, et notamment de la rigidité apparente de la CML par nanoindentation AFM (Atomic Force Microscopy). Le **Chapitre 6** de cette thèse proposera une synthèse des résultats et discussions des travaux préalablement présentés, en établissant également les limites actuelles de l'étude, et en proposant des perspectives de recherche à partir des bases établies dans ces travaux.

CHAPITRE 2

La Cellule Musculaire Lisse, témoin de l'état biophysique de la paroi vasculaire

Claudie, P., Mousavi, S. J., Avril, S. Chapter 6 - Review of the Essential Roles of SMCs in ATAA Biomechanics. *Advances in Biomechanics and Tissue Regeneration*, Academic Press, Editor: Doweidar M. H. (2019). 95-114. ISBN 9780128163900.

1 Introduction

Ce chapitre se focalise sur le rôle de la CML à l'échelle cellulaire et son implication dans la pathologie anévrismale. Il fait par la même occasion l'état de l'art des connaissances à ce sujet, posant ainsi les bases de l'étude et mettant en avant les pistes à creuser dans le cadre de cette thèse. Il est construit sur la base de la revue qui a fait l'objet d'un premier chapitre de livre publié en 2019. Cette revue constitue tout le travail de bibliographie préalable aux travaux expérimentaux de cette thèse et dresse un état de l'art détaillé à propos de la CML aortique humaine.

2 Résumé de la revue

L'Anévrisme de l'Aorte Thoracique Ascendante (AATA) fait partie des pathologies vasculaires les plus critiques en raison du risque accru de rupture. Toutefois, la détection de son apparition reste difficile puisque le critère de diagnostic reconnu encore à l'heure actuelle est le diamètre. La limite fixée à 5.5 cm n'apparaît plus comme suffisante pour prévenir de la rupture ou de la dissection de l'AATA de façon plus individualisée. L'objet de cette revue est de présenter un autre point de vue de la pathologie, en considérant le rôle multiple d'un de ses acteurs principaux : la cellule musculaire lisse (CML). Il s'agit d'un travail de bibliographie qui se veut relativement complet, afin de dresser un état de l'art des causes pressenties de l'apparition d'un AATA et du lien avec la réponse cellulaire au travers de la mécanobiologie. Car, en effet, la CML a démontré sa capacité à maintenir un état dit « homéostatique » de par la réparation de son environnement qu'elle perçoit comme endommagé par la pathologie (rôle « passif ») et de par l'adaptation de son tonus via ses propriétés contractiles à la variation permanente de sollicitations mécaniques au sein de la paroi touchée.

La revue présente en premier lieu les bases de la réponse mécanique de la paroi aortique et son lien avec le rôle passif de la CML. Elle détaille la composition structurelle de la paroi en trois couches concentriques (intima, media, adventice, comme indiqué dans le **Chapitre 1**) et des tissus qui la composent, ainsi que leur contribution dans la réponse mécanique globale. Le premier composant purement passif est la matrice extracellulaire (MEC), constituée majoritairement d'un réseau complexe de fibres d'élastine et de collagène, et d'une petite fraction de Glycosaminoglycans (GAG). Pris à part, chacun de ces constituants apporte sa contribution :

- Elastine : les fibres élastiques contribuent à la réponse élastique, mais sont facilement endommageables par de trop fortes sollicitations et ne sont pas régénérées efficacement à l'âge adulte.
- Collagène : ces fibres non extensibles assurent la résistance du tissu en reprenant les fortes sollicitations et protègent ainsi l'élastine.
- GAG : contribuent à la compressibilité de la paroi. Ils participent marginalement à la réponse globale de la paroi sauf dans des cas spécifiques comme l'athérosclérose, où ils sont accumulés dans la zone touchée et augmentent ainsi localement la rigidité de la paroi.

D'un point de vue biochimique, ces composants peuvent également influencer sur la réponse des CML de la media et des fibroblastes de l'adventice, et plus particulièrement sur le remodelage qu'elles induisent lorsqu'elles perçoivent un éloignement de leur état d'équilibre homéostatique. Ainsi, la destruction des fibres élastiques est également due à la production de métalloprotéases (MMP) par les cellules en vue de dégrader leur MEC. Car effectivement, le remodelage induit un équilibre entre dégradation et synthèse des composants de la MEC. En ce qui concerne la synthèse, il faut savoir que seules les fibres de collagène sont efficacement régénérées à l'âge adulte, mais pas l'élastine, dont on acquiert un capital aux premiers stades du développement. Le phénomène de remodelage entraîne donc une modification permanente des propriétés mécaniques de la paroi, qui tend à se rigidifier par l'augmentation de la teneur en collagène vis-à-vis de l'élastine, et par la même occasion à se fragiliser de par la perte d'élasticité de la paroi.

La revue propose également une représentation mathématique de la réponse mécanique de la paroi à partir d'un modèle bicouche tenant compte des propriétés mécaniques de la media et de l'adventice. Ce modèle s'appuie sur la définition d'une fonction de densité d'énergie (Strain-Energy Function, SEF) incluant la contribution respective de l'élastine, des différentes familles de collagène, et des CML. Ce modèle permet d'estimer la sollicitation perçue par les cellules constitutives de la paroi dans le cas physiologique, et pour des pressions plus élevées telles que celles induites par le développement d'un anévrisme.

En résumé de cette première partie de la revue, tout dans la constitution physique et biochimique de la paroi se trouve initialement dans un état d'homéostasie ; un état d'équilibre mécanobiologique auquel les cellules sont sensibles et pour lequel elles modulent leur réponse pour y revenir lorsqu'elles perçoivent un changement. En revanche, ces éléments ne dressent un tableau que de la réponse purement passive de la paroi, en l'absence du tonus vasculaire, indispensable au fonctionnement de l'aorte pour assurer la conversion du flux sanguin pulsé par le rythme cardiaque en un flux continu et dont les variations sont lissées.

La deuxième partie s'attache à décrire cette fois le rôle biomécanique actif de la paroi, au travers du tonus vasculaire, induit par la capacité des CML à se contracter. Ce tonus permet à la paroi de s'adapter aux variations de pression dues au passage du flux sanguin, et à le lisser afin de fournir un flux continu vers l'ensemble de l'organisme. La CML est une cellule spécifiquement adaptée au maintien du tonus vasculaire, grâce à ses propriétés contractiles naturelles. Il s'agit d'une cellule allongée sous forme de fuseau, dont la longueur peut atteindre plusieurs centaines de micromètres, contre 3-5 μm d'épaisseur. Cette polarité dimensionnelle oriente de fait le maximum de contractilité selon l'axe longitudinal. De plus, étant donné que les CML s'orientent selon la circonférence de l'aorte, selon une disposition hélicoïdale autour de la lumière du vaisseau, elles sont d'autant plus

performantes pour reprendre la composante circonférentielle des sollicitations mécaniques, autrement dit la direction principale des contraintes subies par la paroi. Par ailleurs, les CML sont organisées en plusieurs couches concentriques au sein même de la media, selon une organisation en unités lamellaires médiales (Medial Lamellar Unit, MLU), séparées les unes des autres par une lame élastique (elastic laminae), reliée aux CML par des microfibrilles élastiques. Cette disposition assure la transmission des efforts de façon optimale au travers de toute l'épaisseur de la media.

La CML dispose d'un appareil contractile particulièrement développé au sein de son cytosquelette, grâce à la présence de deux types de filaments d'actine : les filaments épais servant de support aux têtes de myosine, le moteur moléculaire activant le processus de contraction, et les filaments fins, composés de l'isoforme Alpha (Alpha Smooth Muscle Actin, α -SMA), venant renforcer le pouvoir contractile. Ces éléments forment dans leur ensemble ce qu'on appelle une « unité contractile », qui lorsqu'elle est activée par différents stimuli externes, induit une réponse mécanique active au sein de la paroi aortique. Ces stimuli peuvent être de nature électrique, électrochimique, biochimique ou même mécanique. Il en résulte une dépolarisation de la membrane cellulaire, qui laisse alors entrer une quantité d'ions calcium présents dans le milieu extracellulaire. La modulation de la concentration intracellulaire en ion calcium est connue pour activer la contraction en agissant sur les chaînes de myosine lorsqu'elle atteint un seuil suffisant. En conditions normales, la dépolarisation de la membrane se fait progressivement, à mesure que la pression exercée sur la paroi aortique augmente. Toutefois, lorsque la pression augmente au-delà des limites physiologiques, la membrane se dépolarise davantage, causant une altération de la réactivité cellulaire. La modulation de la teneur en ions calcium est également régie par un oscillateur cytosolique interne à la CML, contrôlant la libération du calcium présent dans des réservoirs intracellulaires. Cet oscillateur joue également un rôle dans la synchronisation des CML voisines en agissant sur la dépolarisation de leur membrane. Cette synchronisation est fondamentale pour induire une contraction homogène des CML de la media.

D'autres voies de signalisation sont également explorées par la revue, tels que des agents vasoconstricteurs (Angiotensine II) et vasodilatateurs (acide nitrique). L'acide nitrique reste un exemple de la physiologie réelle, car il est sécrété par les cellules endothéliales de l'intima et induit la relaxation des CML de la media. Par ailleurs, les cellules endothéliales sécrètent l'héparine (sulfate d'héparane) qui agit sur la quiescence des CML. Ces voies de signalisation montrent bien toute l'importance de la communication entre l'intima et la media dans la réponse contractile des CML.

Plusieurs modèles mentionnés dans la revue font état de la contraction cellulaire chez la CML, et mettent en valeur notamment la théorie du glissement des filaments d'actine (i.e. les filaments fins d' α -SMA sur les têtes de myosines portées par les filaments épais). Cette notion sera reprise dans le **Chapitre 3** lors de la modélisation apportée à nos premiers résultats de mesure de la contractilité des CML humaines.

A une échelle un peu moins focalisée, il est important de prendre en compte la communication intercellulaire entre CML voisines au sein de la media. Chaque cellule est entourée de ce qu'on appelle une lame basale, à savoir une fine couche de MEC constituée d'un certain type de collagène, de GAG et de protéines adhésives telles que la fibronectine et la laminine, permettant l'ancrage de la cellule à la MEC et la signalisation biochimique entre la MEC et la cellule. Cette couche est ajourée autour des jonctions gap permettant le passage de l'information d'une cellule à une autre, sous forme d'un stimulus électrochimique. Ce réseau permet de synchroniser la réponse contractile des CML, et

produire ainsi une réponse homogène au travers de la media. Cette synchronisation existe également entre les unités lamellaires les plus externes de CML avec l'adventice, grâce à l'innervation de cette dernière (i.e. le vasa vasorum). Dans les vaisseaux de gros calibre tels que l'aorte, le vasa vasorum sert également de complément par rapport à l'intima pour apporter les nutriments aux CML les plus excentrées. L'intima, en plus de son rôle nutritif, sécrète des neurotransmetteurs et des agents vasoactifs qui viennent contrôler la contraction des CML les plus internes qui la transmettent ensuite à leurs voisines. La réponse active de la paroi résulte donc bel et bien d'une symbiose entre les différentes couches de l'aorte.

Au final, la réponse passive est complétée par la réponse active apportée par la contribution des CML, et permet ainsi une uniformisation de la distribution des contraintes dans l'ensemble de la paroi aortique dans les conditions physiologiques. En dehors de cet état naturel d'équilibre entrent en jeu la mécanosensibilité de la CML face aux variations de son environnement, et des phénomènes de mécanotransduction, venant retranscrire les signaux perçus par la cellule au travers d'une réponse cellulaire adaptée. Cette réponse cellulaire peut se traduire par un comportement différent en termes de prolifération, migration, différenciation, apoptose (i.e. mort cellulaire induite par la cellule elle-même), contraction, ou encore synthèse de composants de la MEC.

La CML constitue ainsi un capteur hautement sensible de toute variation de son microenvironnement, et ce grâce aux ancrages qu'elle possède sur sa MEC : les adhésions focales. L'information mécanique se transmet ainsi au travers du cytosquelette jusqu'au noyau de la cellule, capable d'ordonner une modulation de la réponse cellulaire. Par ailleurs, le lien des CML aux fibres de la MEC et aux microfibrilles qui les connectent aux unités lamellaires voisines est fondamental pour la transmission des efforts de contraction. Tout dommage impactant l'un des éléments de la chaîne de transmission des efforts, que ce soit au niveau de la MEC ou du cytosquelette de la CML, vient rompre l'équilibre et risque d'entraîner le système entier dans un cercle vicieux. En effet, il a été montré que les CML étaient capables de programmer un changement de phénotype depuis un phénotype mature, contractile et quiescent, vers un phénotype synthétique, promouvant la prolifération, la migration, et la synthèse de composants de la MEC. Le phénotype synthétique est majoritairement présent lors des premiers stades du développement afin de bâtir l'aorte en devenir. A l'âge adulte, ce même phénotype n'apparaît plus que dans le cas de conditions hors de l'état d'homéostasie. Et lorsque ceci se produit, il devient alors difficile de revenir à l'équilibre : le système tend à entretenir le renforcement de la paroi aortique jugée « défailante » en cas de pathologie par la synthèse de collagène, et par conséquent, la paroi subit des changements permanents de ses propriétés mécaniques, qui à leur tour reviennent à signaler à la cellule une défaillance.

Ce phénomène est au cœur de la thématique de l'AATA étant donné les répercussions de la pathologie sur les propriétés de la paroi, et les causes de son apparition qui sont reliées à un dysfonctionnement de la MEC ou de la CML en elle-même. Cette revue dresse un tableau récapitulatif de ces causes et des effets qu'elles produisent pour en arriver à la formation d'un anévrisme (Table 2.1). Elle propose également un état de l'art des propriétés mécaniques déjà investiguées sur les CML vasculaires, pas forcément aortiques ni humaines (Table 2.2), afin de comprendre comment caractériser la CML en cas de changement de phénotype induit par la pathologie, et ce que cela produit en retour sur la paroi (Table 2.3).

Il en ressort au final que la CML semble s'adapter en cas d'AATA, de par l'éloignement de son état homéostatique. Cette conséquence engendre un cercle vicieux duquel il est difficile de s'échapper dès lors que les propriétés mécaniques de la paroi sont définitivement modifiées par la pathologie. D'une part, la paroi se rigidifie par l'adjonction de collagène par les CML devenues synthétiques, pour supporter les sollicitations les plus importantes, et se fragilise par la même occasion, ce qui la rend plus vulnérable à la dissection et la rupture. D'autre part, la perte de sensibilité des CML dérégule complètement le système initialement programmé pour maintenir l'homéostasie, et leur perte de contractilité diminue le pouvoir de la paroi à suivre les variations de pression. La CML se retrouve par conséquent à tenir un rôle majeur dans l'apparition et le développement de l'AATA. Il est donc désormais nécessaire d'investiguer les techniques permettant de caractériser la CML à l'échelle cellulaire voire subcellulaire (i.e. au travers de son cytosquelette), afin de percevoir les potentiels changements induits en cas d'AATA dans les propriétés mécaniques. La revue fait alors mention en guise de perspectives des techniques de Traction Force Microscopy (TFM) et de microscopie à force atomique (Atomic Force Microscopy, AFM), qui feront l'objet des chapitres suivants de ce mémoire.

3 Revue

Review of the essential roles of SMCs in ATAA biomechanics

Claudie Petit · S. Jamaledin Mousavi · Stéphane Avril

Mines Saint-Étienne, Univ Lyon, Univ Jean Monnet, INSERM, U 1059 SAINBIOSE Centre CIS, F - 42023 Saint-Étienne France

Published as a book chapter (6th) in *Advances in Biomechanics and Tissue Regeneration*, Editor : Mohamed H. Doweidar, Academic Press, 2019

3.1 Abstract

Aortic Aneurysms are among the most critical cardiovascular diseases. The present study is focused on Ascending Thoracic Aortic Aneurysms (ATAA). The main causes of ATAA are commonly cardiac malformations like bicuspid aortic valve or genetic mutations. Research studies dedicated to ATAA tend more and more to invoke multifactorial effects. In the current review, we show that all these effects converge towards a single paradigm relying upon the crucial biomechanical role played by smooth muscle cells (SMCs) in controlling the distribution of mechanical stresses across the aortic wall. The chapter is organized as follows. In section 3.3, we introduce the basics of arterial wall biomechanics and how the stresses are distributed across its different layers and among the main structural constituents: collagen, elastin, and SMCs. In section 3.4, we introduce the biomechanical active role of SMCs and its main regulators. We show how SMCs actively regulate the distribution of stresses across the aortic wall and among the main structural constituents. In section 3.5, we review studies showing that SMCs tend to have a preferred homeostatic tension. We show that mechanosensing can be understood as a reaction to homeostasis unbalance of SMC tension. Through the use of layer-specific multiscale modeling of the arterial wall, it is revealed that the quantification of SMC homeostatic tension is crucial to predict numerically the initiation and development of ATAA.

Keywords : Ascending thoracic aortic aneurysm · wall biomechanics · Smooth Muscle Cells · epigenetics · mechanotransduction · mechanosensing · homeostatic state · active cell contraction

3.2 Introduction

Aortic aneurysms (AA) are among the most critical cardiovascular diseases (Bown et al., 2002; Goldfinger et al., 2014). Although their detection is difficult, prevention and monitoring of AA is essential as large AA present high risks of dissection or rupture, which are often fatal complications (Goldfinger et al., 2014; Isselbacher, 2005). Monitoring consists in measuring the aneurysm diameter using medical imaging methods such as echography or CT-Scan (Goldfinger et al., 2014; Isselbacher, 2005). The present study is focused on ascending thoracic AA (ATAA). The risk of rupture of ATAA is

estimated clinically with the maximum aneurysm diameter, which consists in considering surgical repair for ATAA diameters larger than 5.5 cm. Other factors such as growth rate, gender or smoking can be taken into account (Fillinger, 2007; Goldfinger et al., 2014; Isselbacher, 2005). It is known that the criterion of maximum diameter relies on statistics of the global ATAA population. On an individual basis, many ruptures or dissections have been reported for aneurysms with diameters below the critical value (Fillinger et al., 2002). Other criteria based on biomechanics were suggested (Fillinger et al., 2002), but they still need to be validated clinically (Duprey et al., 2016; Romo, 2014; Trabelsi et al., 2015).

The main causes of ATAA are summarized in Table 2.1. ATAAs are a very specific class of AA due to the particularity of the ascending thoracic aorta. First, it contains the highest density of elastic fibers of all the vasculature, which have to resist to the mechanical fatigue induced by the wearing combination of pulsed pressure and axial stretching repeated every cardiac beat. As elastic fibers cannot be repaired in mature tissue (Arribas et al., 2006), the ascending aortic tissue is highly prone to mechanical damage (Isselbacher, 2005; Romo, 2014).

Second, a major role of the contractile function in smooth muscle cells (SMCs) is evident in the ascending aorta more than anywhere else as heterozygous mutations in the major structural proteins or kinases controlling contraction lead to the formation of aneurysms of the ascending thoracic aorta (Wolinsky and Glagov, 1964). Moreover, the outer curvature of the ascending thoracic aorta is constituted of a mix of Cardiac Neural Crest - and Second Heart Field -derived SMCs, distributed over the different Medial Lamellar Units (MLUs) (Fig. 2.1) (Sawada et al., 2017). This may be correlated with the observation that dilatations are more often located on the outer curvature of the ascending thoracic aorta (Tremblay et al., 2010).

Third, the ascending thoracic aorta experiences very complex flow profiles, with significant alterations (vortex, jet flow, eccentricity, peaks of wall shear stress) in case of bicuspid aortic valves (Choudhury et al., 2009; Michel et al., 2018; Pasta et al., 2013) or aortic stenosis (Barker et al., 2012; Michel et al., 2018; Schnell et al., 2016). It was shown that these complex hemodynamics patterns have major interactions with the aortic wall and correlate with local inflammatory effects or variations of oxidative stress in the aortic tissue (Dua and Dalman, 2010; Michel et al., 2018; Miller et al., 2002). Research studies dedicated to ATAA have always invoked one of the three previous particularities of the ascending thoracic aorta to account for the intrinsic mechanism leading to the development of an ATAA, even if recent studies tend more and more to invoke multifactorial effects.

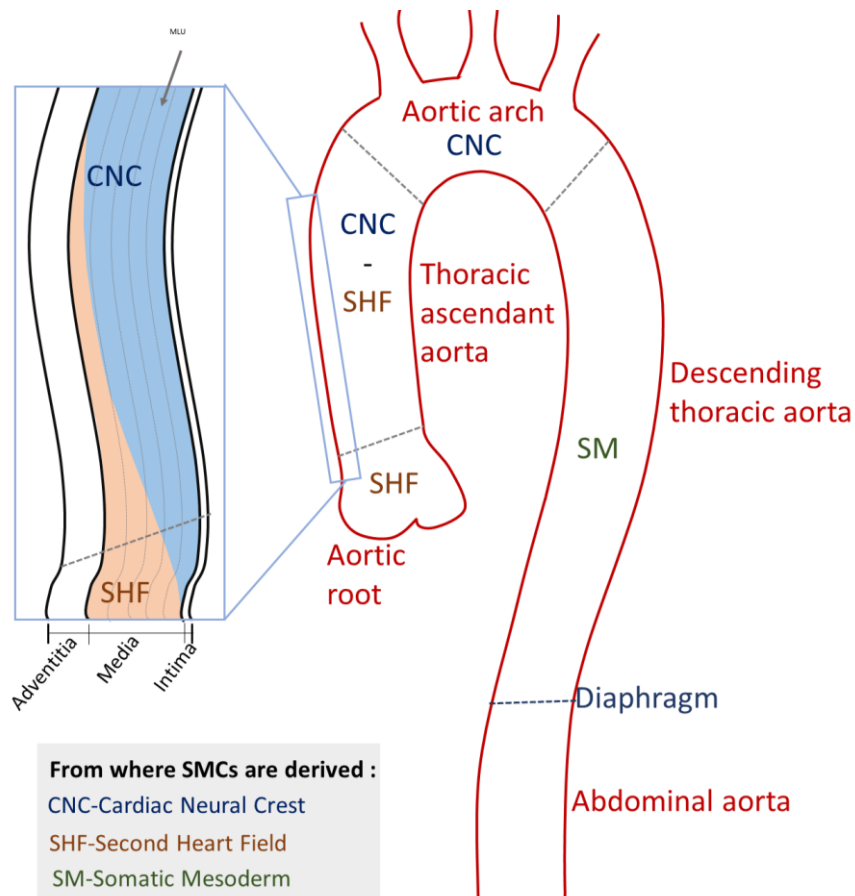


Figure 2.1 Anatomy of the whole aorta: The thoracic part is separated from the abdominal one by the diaphragm. The thoracic aorta is divided into four parts from different embryological origins. The ascending aorta is particularly subject to ATAAs, and contains a mix of CNC and SHF-derived SMCs. Inspired from the works of Isselbacher (Isselbacher, 2005) and Sawada et al. (Sawada et al., 2017)

In this review, we show that all these effects converge towards a single paradigm relying upon the crucial biomechanical role of SMCs in controlling the distribution of mechanical stresses across the different components of the aortic wall. The chapter is organized as follows. In section 3.3, we introduce the basics of arterial wall biomechanics and how the stresses are distributed across its different layers. In section 3.4, we introduce the biomechanical active role of SMCs and its main regulators and show how this can control the distribution of stresses across the aortic wall. In section 3.5, we review the different pathways of SMCs mechanotransduction and their mechanisms at the cellular and tissue level in the aortic wall. Finally, we review studies showing that SMCs tend to have a preferred homeostatic tension. We show that mechanosensing can be understood as the reaction to homeostasis unbalance of SMC tension. The review reveals though that the quantification of the SMC homeostatic tension in the ascending thoracic aorta is still an open question and the chapter 3.6 closes with possible directions for research in measuring this tension at the tissue level and at the cellular level.

3.3 Basics of aortic wall mechanics and passive biomechanical role of SMCs

3.3.1 Composition of arterie

3.3.1.1 *The extracellular matrix (ECM)*

The ECM of the aortic tissue is made of two main fibrous proteins participating to the passive response: collagen and elastin, which are responsible for 60% in dry weight of the entire wall (Humphrey et al., 2015). There are several types of collagen, but types I, III and V are primarily found in the media layer (see section below describing the layers of the aorta), where the SMCs are located, representing about 35% of global aortic wall in dry weight (Humphrey, 2002; Humphrey et al., 2015). Collagen fibers are not extensible and ensure the mechanical resistance of the tissue in case of overloading (Humphrey et al., 2015; Wagenseil and Mecham, 2009; Wolinsky and Glagov, 1964). If collagen fibers can be produced over the lifespan, elastic fibers are actively synthesized in early development, and there is a loss of efficiency for the ones created during adulthood (Arribas et al., 2006). Elastin has 40 years estimated half-life. It should last for an entire life in optimal conditions, but some pathological states or natural aging will necessarily affect it. Fibroblasts and SMCs can produce new ECM components but also matrix metalloproteases (MMPs) which degrade the current ECM. If the action of MMPs is not well regulated, the ECM may be remodeled, yielding a different mechanical behavior with possible ATAA development (Arribas et al., 2006; Papke et al., 2013). Likewise, the loss of elasticity may be related to an anomaly of elastic fibers. Elastic fibers are mainly composed of a core of amorphous elastin surrounded by microfibrils. The microfibrils comprise collagen VI and fibrillin (Kielty et al., 1992), a polymer encoded by the *fbn1* gene, whose mutation is involved in Marfan syndrome. The genetic mutations affecting the ECM in ATAAs are summarized in Table 2.1. Another important constituent, although with lesser mass fractions, are Glycosaminoglycans (GaGs) which can contribute to the compressive stiffness of the aortic tissue. As they represent about 3 to 5% of the total wall by dry weight (Humphrey et al., 2015), they do not participate markedly to the passive response except in specific cases, like for atherosclerosis, where GaGs are piled up during lesion development and increase therefore the wall stiffness. GaGs refer to different types of non-sulfated (hyaluronic acid) and sulfated (keratan sulfate, dermatan sulfate, and heparan sulfate) polysaccharides (Akgul and Mahendroo, 2014). The ECM contains also some glycoproteins that bind to cell membrane receptors, the integrins, and allow for cellular adhesion. Among these binding proteins, the fibronectin can also bind to collagen and heparan sulfate, and laminin is a major component of basal lamina which influences cell responses.

3.3.1.2 *A multilayered wall structure*

The aortic wall is divided into three main layers surrounding the lumen where the blood flow circulates (Fig. 2.2). Each layer has its function and proper mechanical properties (Finet, G. and Tabib, A., 1999; Humphrey, 2002; Pasta et al., 2013; Rapp, 1997; Romo, 2014; Wagenseil and Mecham, 2009).

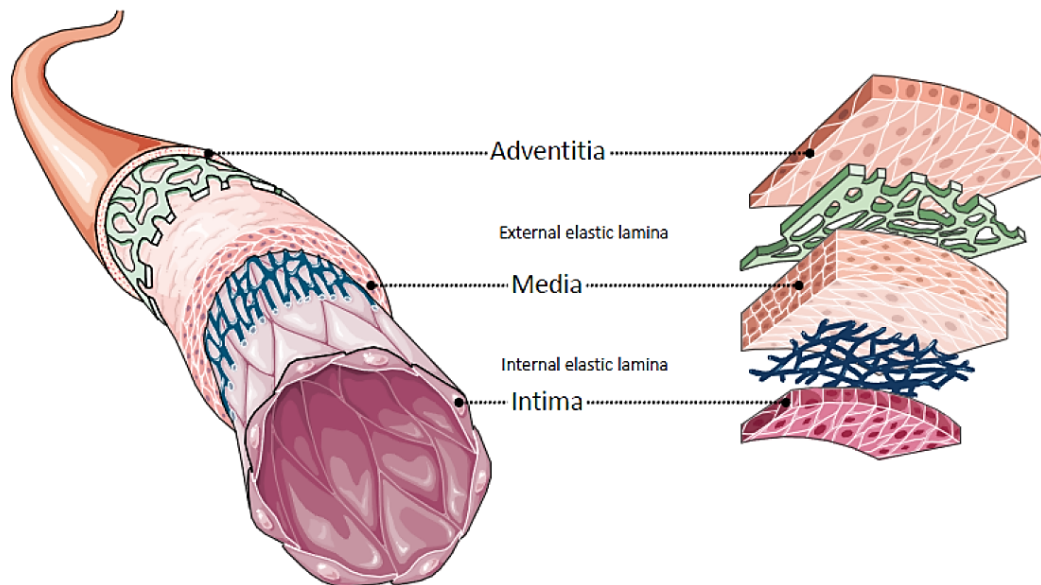


Figure 2.2 Structure of the arterial wall (courtesy of Gasser (Gasser, T. C., 2017))

The adventitia, which is the most external layer, contains fibroblasts and it is particularly collagen-rich, according to its protective role for the entire wall against high stress. The internal layer, called the intima, is directly into contact with the blood flow and constitutes a selective barrier of endothelial cells for preventing the wall from blood products infiltration and delivering oxygen and nutrients from blood to the internal wall.

The inner medial layer is separated from adventitia and intima by two elastic laminae, and represents about 2/3 of the whole thickness of the wall. All these layers have a passive mechanical response to the loading induced by the blood flow, but only the media can also act actively, due to the presence of contractile SMCs. The media is structured into several MLUs (Fig. 2.1) (Humphrey et al., 2015; Rapp, 1997) where a layer of SMCs is tight between two thin elastin sheets, through a complex network of interlamellar elastin connections (Wagenseil and Mecham, 2009). The SMCs are oriented in the direction of the ECM fibers in order to better transmit the forces to each other and to successive MLUs. The number of MLUs varies according to the diameter of the artery (Rapp, 1997) and the size of the organism : 6–8 for mice and 40–70 for human body (Humphrey et al., 2015).

3.3.2 Basics of aortic biomechanic

It is commonly assumed that only the adventitia and the media are involved in the mechanical response of the entire wall, neglecting the mechanical role of the intima. This assumption is not valid in the case of pathologies resulting in a thickening of the intima like atherosclerosis. The aorta is submitted to four types of mechanical stresses (Fig. 2.3).

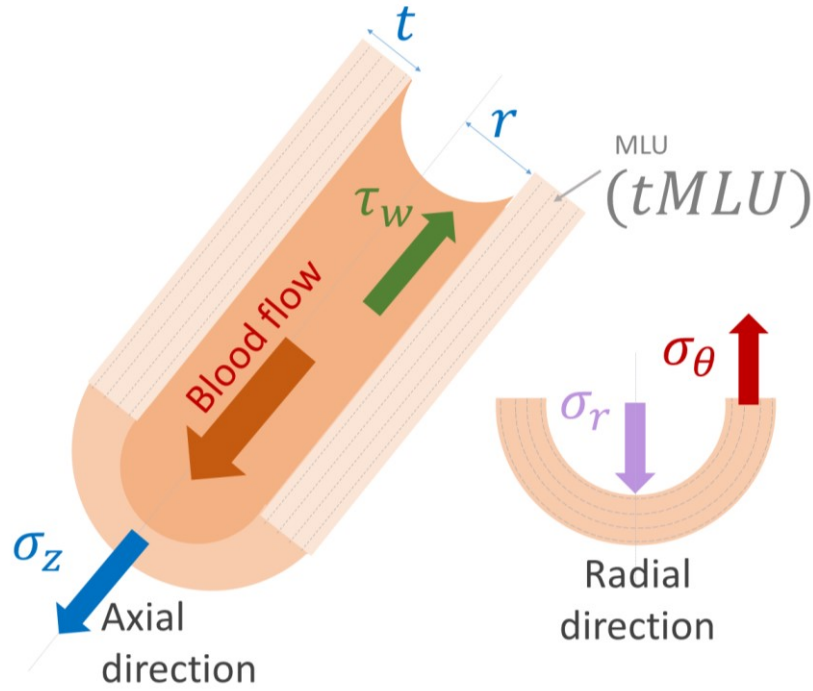


Figure 2.3 Schematic representation of the mechanical stresses in the aortic wall, and particularly in the media. The intima is neglected in the case of aneurysms, but it cannot be the case for pathologies resulting in an intimal thickening; t is the thickness of the wall, r the internal aortic radius, and P is the blood pressure and t_{MLU} the mean thickness of a MLU.

The two main components are the axial one, σ_z , and the circumferential one, σ_θ . The two other components are, namely σ_r (radial stress) and τ_w (wall shear stress). The wall shear stress results from the friction of the blood onto the wall. The circumferential stress is related to the distension of the aorta with the variation of the blood pressure. It can reach about 150 kPa under normal conditions [20]. It can be approximated by the Laplace law according to:

$$\sigma_\theta = \frac{P \cdot r}{t} \quad (6.1)$$

where P is the blood pressure, r the internal aortic radius and t the thickness of the wall. If the number of MLUs varies according to the arterial diameter and across species (Wolinsky and Glagov, 1967), the average tension per MLU was shown to remain constant at $T = 2 \text{ N/m}$ (Humphrey et al., 2015), and its average circumferential stress can be determined by:

$$\sigma_\theta = \frac{T}{t_{MLU}} \quad (6.2)$$

As the mean thickness of a MLU is about $t_{MLU} \approx 15 \mu\text{m}$, it was estimated that the average normal circumferential stress across the aorta is $\sigma_\theta = 133 \text{ kPa}$ (Humphrey et al., 2015).

3.3.3 6.2.3 Passive mechanics of the aortic tissue

The passive behavior refers to the behavior of the aortic wall in absence of vascular tone. It is mainly due to ECM components, namely elastin and collagen fibers. If the elastin is responsible for the wall elasticity, the collagen fibers are progressively tightened from their initial wavy configuration while the wall stress is increasing, and they tend to protect the other components from overstress (Humphrey et al., 2015; Wagenseil and Mecham, 2009; Wolinsky and Glagov, 1964). Given that the

tissue contains about 70 to 80% of water, it is often assumed as incompressible. As a heterogeneous composite material comprising a fluid part (i.e., water) and a solid part (i.e., ECM and cells) (Humphrey, 2002; Pasta et al., 2013), divided into several layers with different mechanical properties (see section 3.3.1.2), the aortic wall has a complex anisotropic mechanical behavior. To predict the rupture risk of ATAAs (Humphrey, 2002; Pasta et al., 2013; Wagenseil and Mecham, 2009), the passive mechanical behavior of the ECM is relevant. Numerous *in vitro* tests using the bulge inflation device (Brunon et al., 2011; Cavinato et al., 2017; Duprey et al., 2016; Kim et al., 2012; Romo et al., 2014; Trabelsi et al., 2015) confirmed that elastin in the media is the weak element of the wall towards rupture.

3.3.4 Multilayer model of stress distribution across the wall

Single-layered homogenized models of arterial wall mechanics have provided important visions of arterial function. For example, *Bellini et al.* (Bellini et al., 2014) proposed a bilayer model with different material properties for the media and adventitia layers. They split the passive contributions of elastin, SMC and collagen fibers (modeled with four different families). Eventually, the strain-energy function (SEF) at every position may be written as (Bellini et al., 2014; Humphrey and Taylor, 2008):

$$W = \rho^e W^e(I_1^e) + \sum_{i=0}^n \rho^{c_i} W^{c_i}(I_4^{c_i}) + \rho^m W^m(I_4^m) \quad (6.3)$$

where superscripts e , c_i and m represent respectively the elastin fiber constituent, the constituent made of each of the n possible collagen fiber families and the SMC constituent, all these constituents making the mixture. In Eq. 6.3, ρ^j refers to mass fraction, W^j stands for stored elastic energy of each constituent, depending on the first (I_1^j) and fourth (I_4^j) invariants of the related constituents of the mixture ($j \in \{e, c_i, m\}$). Let the mechanical behavior of the elastin constituent be described by a Neo-Hookean strain energy function as in (Bellini et al., 2014; Cardamone et al., 2009; Dorrington and McCrum, 1977; Holzapfel et al., 2000):

$$W^e(I_1^e) = \frac{\mu^e}{2} (I_1^e - 3) \quad (6.4)$$

where $I_1^e = \text{tr}(C^e)$ and μ^e is a material parameter and has a stress-like dimension. $C^e = F^{eT} F^e$ denotes the right Cauchy-Green tensor where $F^e = F G_h^e$ is the deformation gradient of the elastin constituent. F is the corresponding deformation gradient of the arterial wall mixture and G_h^e is the deposition stretch of elastin with respect to the reference configuration (Bellini et al., 2014; Cardamone et al., 2009). Therefore, using the concept of Constrained Mixture Theory (CMT) it is assumed that all constituents in the mixture deform together in the stressed configuration while each constituent has a different « total » deformation gradient based on its own deposition stretch.

The SEF of passive SMC and collagen contributions is described using an exponential expression such as (Bellini et al., 2014; Cardamone et al., 2009; Riveros et al., 2013; Rodríguez et al., 2008):

$$W^k(I_4^k) = \frac{D_1^k}{4D_2^k} \left[\exp\left(D_2^k (I_4^k - 1)^2\right) - 1 \right] \quad (6.5)$$

where $k \in \{c_i, m\}$. D_1^k and D_2^k are stress-like and dimensionless material parameters, respectively, and can take different values when fibers are under compression or tension (Bersi et al., 2016). $I_4^k = G_h^{k2} C : M^k \otimes M^k$ where G_h^k , $k \in \{c_i, m\}$, is the specific deposition stretch of each

collagen fiber family or SMCs, with respect to the reference configuration. M^k , $k \in \{c_i, m\}$, denotes a unit vector along the dominant orientation of anisotropy in the reference configuration of the constituent made of the i th family of collagen fibers or of SMCs. For SMCs, M^m coincides with the circumferential direction of the vessel in the reference configuration while for the i th family of collagen fibers $M^{c_i} = [0 \ \sin \alpha^i \ \cos \alpha^i]$, where α^i is the angle of the i th family of collagen fibers with respect to the axial direction. $C = F^T F$ is the right Cauchy-Green stretch tensor of the arterial wall mixture (Bellini et al., 2014; Cardamone et al., 2009). This model can capture the stress « sensed » by medial SMCs and adventitial fibroblasts. The model shows interestingly that the stresses split unevenly between the media and the adventitia (Fig. 2.4).

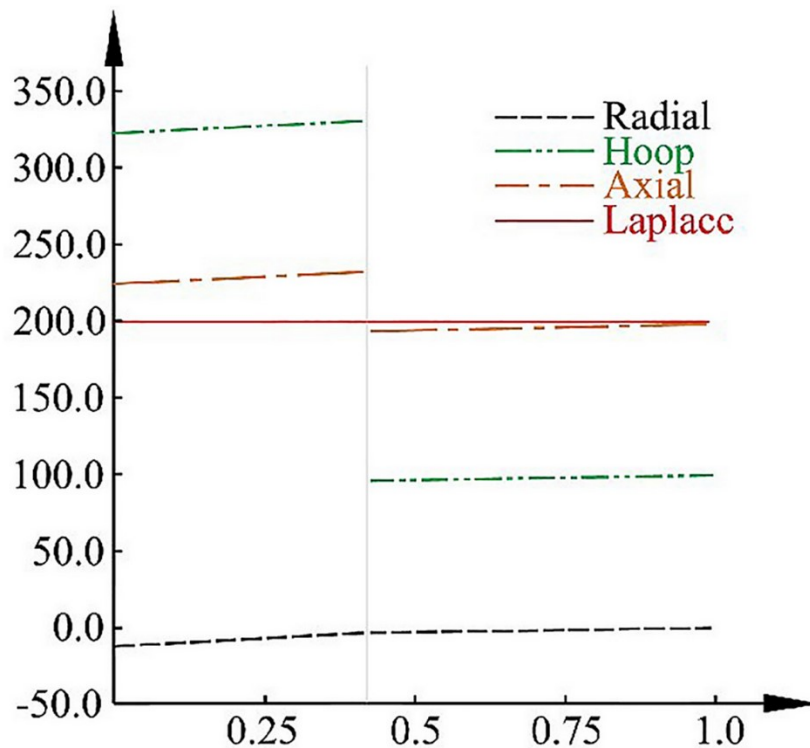


Figure 2.4 Predicted transmural distributions of different components of Cauchy stress at mean arterial pressure (MAP ~93 mmHg) by bi-layered model of (Bellini et al., 2014). The mean circumferential stress, as obtained from Laplace's relation, is shown for comparison. All components of stress are plotted versus the normalized current radius, with 0 and 1 corresponding to inner and outer radii, respectively.

For physiological pressures, the stress is significantly larger in the media but when the pressure increases, the stress increases faster in the adventitia. As this chapter is dedicated to SMCs, the model permitted to estimate that stresses taken by SMCs remain less than a modest 40 kPa for normal physiological pressures (Bellini et al., 2014).

3.4 Active biomechanical behavior

On top of its passive mechanical behavior, the aortic tissue exhibits an active component thanks to the tonic contraction of SMCs, permitting fast adaptation to sudden pressure variation during cardiac cycle.

3.4.1 Smooth Muscle Cells (SMC)

➤ *SMCs structure*

SMCs have an elongated, fiber-like shape. Their length is about 50–100 μm and their mean diameter is 3 μm , reaching 5 μm around the nucleus (Fujiwara and Uehara, 1992; Humphrey, 2002; Mecham and Schwartz, 1995; Miller et al., 1986). SMCs have an axial polarity. Their longest axis tends to align with the direction of the principal stress applied to the ECM (Fig. 2.2). Each MLU in the aorta contains a layer of SMCs that are connected to the elastic laminae thanks to microfibrils (Humphrey et al., 2015; Wagenseil and Mecham, 2009). They are circumferentially arranged throughout the media (Fujiwara and Uehara, 1992; Humphrey, 2002; Wagenseil and Mecham, 2009) and are particularly sensitive to σ_z and σ_θ components of the wall stress (Li and Xu, 2007). This specific structure may also explain the fact that the media has been revealed stronger circumferentially than longitudinally (Pasta et al., 2013) and that the forces produced by the SMCs are maximized in this direction (Fujiwara and Uehara, 1992). This ability of endothelial cells and SMCs to align along the direction of the applied stress has been confirmed by a number of *in vitro* studies (Bao and Suresh, 2003; Dartsch and Hämmerle, 1986; Kanda and Matsuda, 1994).

The arrangement of SMCs in the media used to be controversial (O'Connell et al., 2008). The most recent studies (1980's (Clark and Glagov, 1985; Wolinsky and Glagov, 1967), 1990's (Gaballa et al., 1998), 2000 (Dingemans et al., 2000)) describe SMC orientation as circumferential whereas a helical and oblique disposition was reported earlier (1960's (Keech, 1960), 1970's (Osborne-Pellegrin, 1978)). *Fujiwara & Uehara* showed an oblique orientation in 1992 (Fujiwara and Uehara, 1992). Likewise, data are controversial about alignment parallelly to the vessel surface: *Clark & Glagov* (Clark and Glagov, 1985) agree with this statement unlike *Fujiwara & Uehara* (Fujiwara and Uehara, 1992). Furthermore, some authors mention a change of SMC orientation in each subsequent MLU, creating a herringbone-like layout (Davis, 1993; Dingemans et al., 2000). *Humphrey* suggested the SMCs are oriented helically, closer to a circumferential direction (Humphrey, 2002), but *O'Connell* suggested the SMCs may also be slightly radially tilted (O'Connell et al., 2008). A recent study pointed out the importance of the helical disposition, suggesting that SMCs are oriented according to two intermingled helices (Tonar et al., 2015). This disposition was assumed in several tissue models (Holzapfel et al., 2002; Holzapfel and Gasser, 2001). Moreover, a tissue model for coronaries taking into account the orientation of SMCs suggested they contribute both to circumferential and axial stresses and tend to reorient towards the circumferential direction when blood pressure is increased (Chen et al., 2013). Other studies (Clark and Glagov, 1985; Hayashi et al., 2012) suggested that the almost circumferential orientation is only valid for inner MLUs of the ascending thoracic aorta because SMCs seem to orient more axially close to the adventitia. This pattern was also confirmed by *Fujiwara & Uehara* (Fujiwara and Uehara, 1992).

➤ *Principle of SMC contractility*

The contractility of SMCs is their defining feature, thanks to a strongly contractile cytoskeleton. SMCs have a well-developed contractile apparatus organized in cross-linked actin bundles, regularly anchored into the membrane with dense bodies (Balas, D. and Philip, P., 2002) (Fig. 2.5). This layout implies a bulbous morphological aspect during contraction (Fay and Delise, 1973).

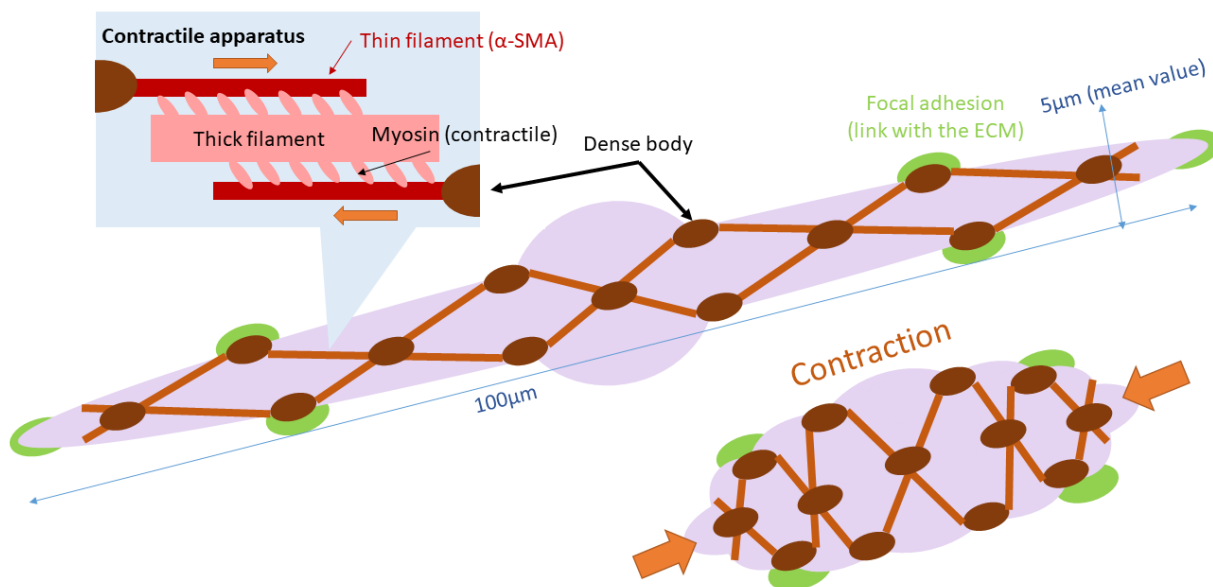


Figure 2.5 Cellular and subcellular architecture of the SMC.

There may be two types of actin filaments in the same bundle. The thick filament serves as a support for myosin heads and permits sliding of thin filaments during contraction, defining a so-called « contractile unit ». Thin filaments are made of Alpha Smooth Muscle Actin (α -SMA), an actin isoform specialized in the increase of cellular traction forces (Chen et al., 2007; Goffin et al., 2006a; Skalli et al., 1986). This isoform is specific to certain cell types, namely SMCs and myofibroblasts (Tomasek et al., 2002). The α -SMA filaments are created from their rod-like form, synthesized and assembled when focal adhesions (FAs) undergo high stresses (Chen et al., 2007; Goffin et al., 2006a). Genetic mutations may affect the genes encoding the components of the contractile apparatus (Fig. 2.6) and lead to ATAAs (Table 2.1).

The main signaling pathways controlling SMC contraction are summarized in Fig. 2.6. More details about these pathways may be found in (Berridge, 2008; Hill-Eubanks et al., 2011; Lacolley et al., 2012; Milewicz et al., 2016; Reusch et al., 1996; Somlyo and Somlyo, 1994). However, it is important to mention that SMCs contractility is controlled by the modulation of intracellular ionic calcium concentration $[Ca^{2+}]_i$. The SMC membrane has many invaginations called caveolae where extracellular Ca^{2+} ions can enter the cell (Taggart, 2001). The increase of $[Ca^{2+}]_i$ triggers the contraction above a certain threshold, activating myosin chains (Hill-Eubanks et al., 2011). Some studies revealed $[Ca^{2+}]_i$ is a reliable indicator of SMC contractility, because it increases from 100 nM in the relaxed state to 600–800 nM once fully contracted (Humphrey, 2002). But *Hill-Eubanks et al.* (Hill-Eubanks et al., 2011) underlined later that a 400 nM concentration is sufficient to cause a complete contraction. Calcium entries in the SMC after some stimuli resulting in membrane depolarization, widely studied *in vitro* with electrical (Fay and Delise, 1973), electrochemical (Karaki et al., 1984; Murtada et al., 2016a; Schildmeyer et al., 2000), chemical, or even mechanical stimulation (Balasubramanian et al., 2013; Davis et al., 1992).

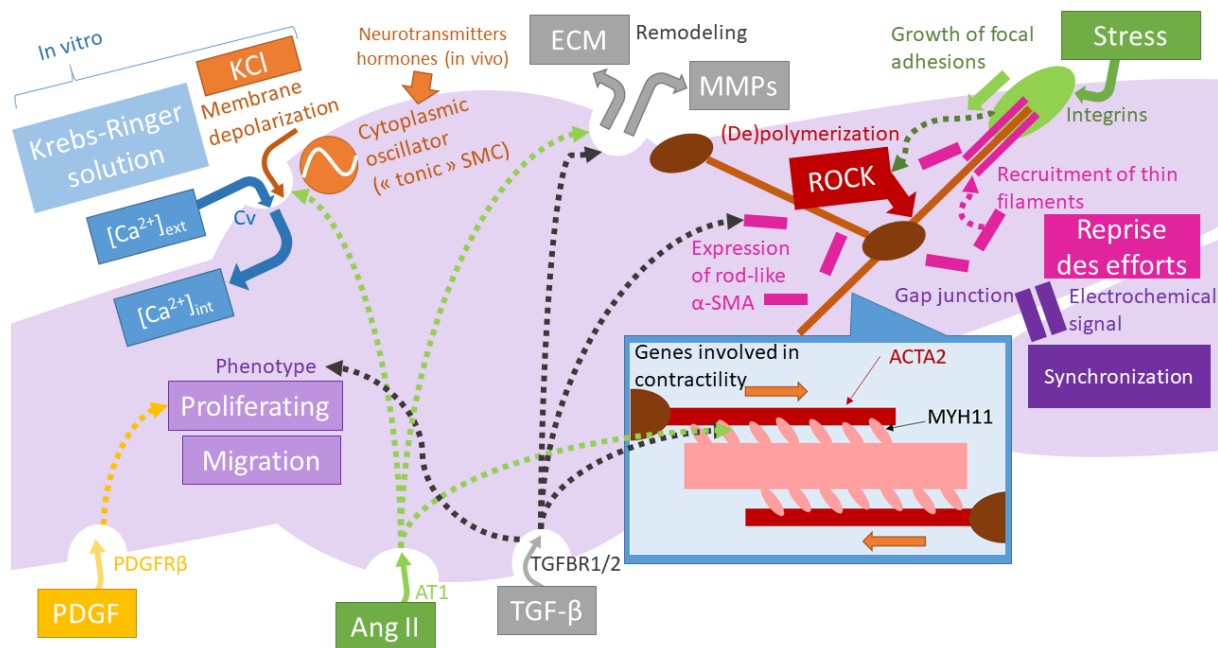


Figure 2.6 Summary of the main signaling pathways involved in SMCs contractility and phenotypic switching. α -SMA : Alpha Smooth Muscle Actin, Ang II : Angiotensin II, AT1: angiotensin receptor, Cv : caveola, PDGF : Platelet-Derived Growth Factor, PDGFR β : PDGF receptor, ROCK : Rho kinase involved in cytoskeleton turnover, TGF- β : Beta transforming growth factor, TGFBR1/2: TGF- β receptor. Specific genes mainly involved in the loss of contractility: ACTA2: encoding the α -SMA, MYH11 : encoding the Myosin Heavy chains. Shape and orientation of a SMC according to its ECM. The SMCs can synchronize their contraction along their strongest axis thanks to intercellular interactions: between several SMCs through gap junctions, or between endothelial cells from the intima and innermost MLUs of SMCs through vasoactive agonists, neurotransmitters or secreted GaGs.

In fact, some of these studies suggested that SMCs undergo a progressive membrane depolarization as intraluminal pressure increases under normal conditions (Balasubramanian et al., 2013; Davis et al., 1992; Hill-Eubanks et al., 2011). But when the mechanical stimulation becomes higher than normal, some studies have also highlighted that the SMCs undergo more depolarization, resulting in an alteration of their reactivity (De Moudt et al., 2017). The most common protocol used to control SMCs contraction *in vitro* remains the addition of potassium ions K^+ from a KCl solution with a 50 to 80 mM concentration, that depolarizes the membrane (De Moudt et al., 2017; Karaki et al., 1984; Malmqvist and Arner, 1999; Murtada et al., 2016a; Schildmeyer et al., 2000). The extracellular media must also contain a calcium concentration $[Ca^{2+}]_e$ to cause the activation of myosin heads by calcium entry into the cell. This is the reason for adding $CaCl_2$ solution to the media (Malmqvist and Arner, 1999), or immersing the cells in a physiological Krebs-Ringer solution (Murtada et al., 2016a). The latter has the advantage of keeping biological tissues alive. Calcium entry is also regulated thanks to a cytosolic oscillator which allows periodic release of calcium from intracellular reservoirs (i.e., endoplasmic reticulum) (Berridge, 2008; Berridge and Galione, 1988). The frequency is highly dependent on external stimuli like neurotransmitters, hormones or growth factors. If its primary role is to induce a single cell contraction, the secondary role of the cytosolic oscillator is also responsible for membrane depolarization of neighboring cells, in order to synchronize the contraction of several SMCs (Berridge, 2008; Brozovich et al., 2016). The Ca^{2+} signaling pathway was included in the mechanical cellular model of Murtada et al. (Murtada et al., 2012) to model SMCs contractility. The

Angiotensin II (Ang II) signaling pathway has been widely developed in mice models and its link with aneurysms is well explained by *Malekzadeh et al.* (Malekzadeh et al., 2013). It may lead to SMCs contraction and may be used as a vasoconstrictor agonist in mice models (Malekzadeh et al., 2013; Michel et al., 2018) or for isolated cells by addition in a bath (Hong et al., 2015). But the review of *Michel et al.* suggests that angiotensin II may also damage the intima (Michel et al., 2018). In this case, intimal degradation leads to the activation of other signaling pathways that have an influence on SMC tone. Moreover, some studies suggested very active biological role of the intima through the secretion of nitric oxide (NO) that is involved in a pathway controlling cell relaxation (De Moudt et al., 2017; Hong et al., 2015). Accordingly, the intimal integrity seems to have a strong influence on cell contractile response. The filament overlap involved in SMC contraction creates a « cross-bridge » whose function has been early described by some subcellular models based on the sliding filament theory (Hai and Murphy, 1988; Huxley, 1953). The cross-bridges have been assumed to be based on contractility activation/deactivation cycles through phosphorylation of the contractile unit. That is what *Dillon et al.* (Dillon et al., 1981) have called the « latch state » which was used later in association with the sliding filament theory to develop another subcellular model for the SMC contractile unit (Murtada et al., 2016a). Several other cellular models combine the proper active behavior of SMCs with the passive behavior of its ECM (Chen et al., 2013; Tan and De Vita, 2015; Zulliger et al., 2004). The SMC is protected from a too high lengthening thanks to the intermediate filaments (made of desmine), linking dense bodies together (Chen et al., 2007).

➤ *Intracellular connections*

Each SMC is covered by a basal lamina, a thin ECM layer (40–80 nm (Humphrey, 2002)) comprising type IV collagen, glycoproteins and binding proteins ensuring cell adhesion: the fibronectin and the laminin. The basal lamina represents about 12 to 50% of the volume of SMCs. This lamina is open around the gap junctions to allow cell communication (Balas, D. and Philip, P., 2002). These junctions allow the cells to exchange electrochemical stimuli required to synchronize the contraction of the whole MLU and to match with the successive MLUs (Challande, P. et al., 2007). SMCs are linked together thanks to thin collagen microfibrils permitting to transmit cell forces. Interactions between the media and the other layer (intima and adventitia) also have to be considered. The synchronization of the contraction is induced in the outermost MLU by their innervation thanks to the vasa vasorum present in the adventitia, and the nervous signal is transmitted to inner MLUs thanks to gap junctions. The vasa vasorum also provides nutrients in the thickest arteries to complete the action of the intima for innermost SMCs (Humphrey, 2002). Moreover, endothelial cells communicate with innermost SMCs (Fig. 2.7) secreting vasoactive agonists, neurotransmitters and GaGs, notably the Heparan Sulfate, which seems to influence the quiescence of the SMCs (Rubbia and Gabbiani, 1989; Tran-Lundmark et al., 2015). Further information about this topic can be found in (Lilly, 2014).

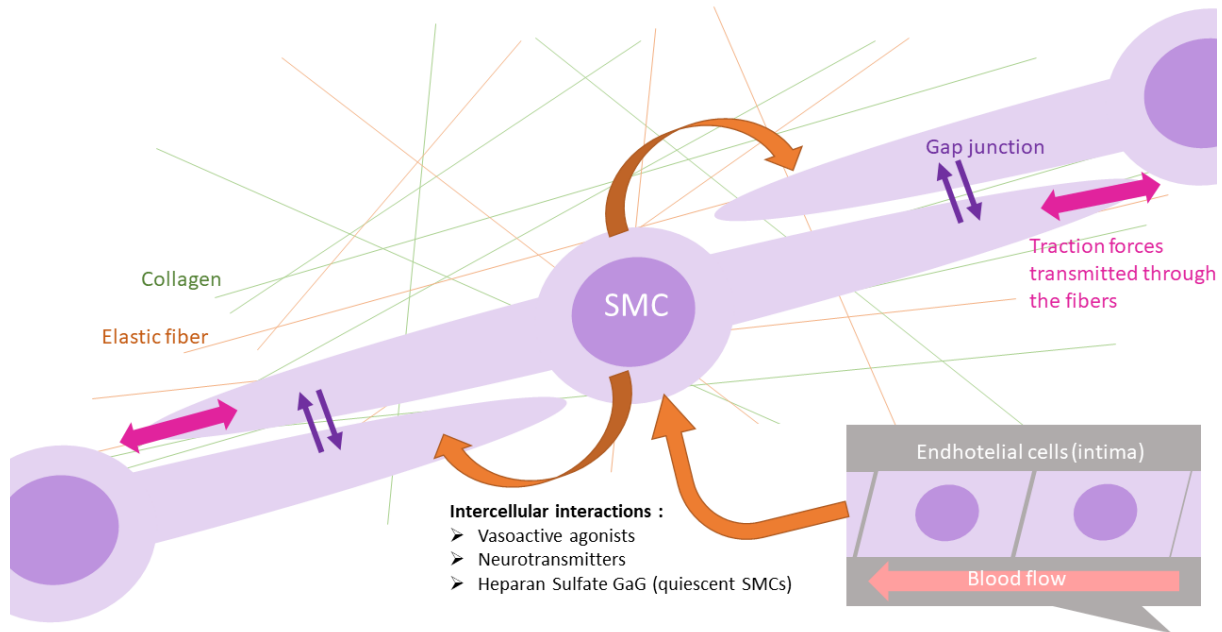


Figure 2.7 Shape and orientation of a SMC according to its ECM. The SMCs can synchronize their contraction along their strongest axis thanks to intercellular interactions: between several SMCs through gap junctions, or between endothelial cells from the intima and innermost MLUs of SMCs through vasoactive agonists, neurotransmitters or secreted GaGs.

3.4.2 Multiscale mechanics of SMC contraction

➤ Subcellular behavior

Many experiments were developed to characterize SMCs traction forces thanks to $[Ca^{2+}]_i$ measurements (Dillon et al., 1981) or Traction Force Microscopy (TFM) techniques, from common substrate deformation methods (Balasubramanian et al., 2013; Goffin et al., 2006a; Tolić-Nørrelykke et al., 2002) to uncommon specific microdevices (Hall et al., 2017; Tan et al., 2003a; Zhang et al., 2014). SMC stiffness is closely linked to their contractile state (Hong et al., 2015; Smith et al., 2005). The reported values depend strongly on the measurement method. Common magnetic twisting cytometry gives a range of $[10^0-10^2]$ Pa against $[10^3-10^5]$ Pa for Atomic Force Microscopy (AFM) (Laurent et al., 2002). Published stiffness and traction force values for SMCs are reported in Table 2.2. If the AFM was mainly used on the ECM of aneurysm samples (Chen et al., 2015; Lindeman et al., 2010), only *Crosas-Molist et al.* (Crosas-Molist et al., 2015) characterized aortic SMCs using AFM and showed an increase of their stiffness in the Marfan syndrome (from 3 kPa for healthy tissue to 7 kPa for pathological one). Interestingly, another team focused on rat vascular SMCs (without aneurysm) and tested them by AFM indentation with a functionalized tip to measure the adhesion forces to type I collagen. This work suggested that contracted (with Ang II) or relaxed SMCs regulate their focal adhesions (Hong et al., 2015).

➤ (Sub)cellular models for the SMC

A common mechanical model of the SMCs and their contractile apparatus is the sliding filament theory. The original sliding filament theory permitted to model the α -SMA filaments sliding on myosin heads. It was initially published by *Huxley & Huxley* in 1953 (Huxley, 1953). The filament

overlap (i.e., thin filaments linked to thick filaments by myosin heads) creates a « cross-bridge » modeling the contractile unit of a single SMC. Another important study was those of *Dillon et al.* (Dillon et al., 1981) where the latch state was introduced to describe the activation/blockage cycles of the contractile unit through phosphorylation process. In low phosphorylation states, the active force can be maintained by the SMCs (Hai and Murphy, 1988). *Dillon et al.* (Dillon et al., 1981) also highlighted that SMCs generate a maximal force when stretched at an optimal length. Gradually, further models took into account the orientation of the SMCs in the media [58] and the interaction between the cell and its ECM (Rachev and Hayashi, 1999; Tan and De Vita, 2015; Zulliger et al., 2004). Only *Murtada's* model (Murtada et al., 2012) has integrated the regulation of $[Ca^{2+}]_i$ controlling SMC contraction.

3.4.3 Effect of SMC contraction on the distribution of stresses across the aortic wall

The effects of SMCs contraction on the stress distribution across the wall were investigated in several studies, which the opening angle experiment. This permitted to assess the intramural stress induced by SMC contractility (Matsumoto et al., 1996; Rachev and Hayashi, 1999). Indeed the opening angle experiment reveals residual stresses, which can be related to passive ECM mechanics and to SMCs active contraction (Matsumoto et al., 1996; Rachev and Hayashi, 1999). It was shown that at physiological pressure, the pure passive response of the wall does not ensure uniform stress distributions, suggesting an essential role of the basal tone of SMCs to maintain a uniform stress distribution (Matsumoto et al., 1996; Rachev and Hayashi, 1999). But under the effects of a vasoactive agonist, SMCs contract through myogenic response and can provoke a rise of intraluminal pressure up to 200 mmHg. As they change the intraluminal pressure, SMCs may also induce nonuniform stress distributions across the wall (Matsumoto et al., 1996). In summary, SMCs are very sensitive to mechanical stimuli. They tend to keep the intramural circumferential stress as uniform as possible for physiological variations of the blood pressure, but the stress becomes non uniform for higher pressures (Matsumoto et al., 1996). They adapt their myogenic response, ranging from 50 kPa for the basal tone under normal physiological conditions to 100 kPa for maximal SMC contraction (Rachev and Hayashi, 1999).

3.5 Mechanosensing and mechanotransduction

Given its highly sensitive cytoskeleton and focal adhesions (Fig. 2.8), SMCs represent real sensors of the local mechano-chemical state of the ECM. Many experimental models have permitted to investigate this mechanosensing role and how it is involved in ATAAs and dissections (Michel et al., 2018). One of the main response to stimuli mechanosensing is mechanotransduction (Livne and Geiger, 2016; Park et al., 2011; Parker et al., 2002; Thyberg et al., 1995; Wang, 2017), which is the process of transducing wall stress stimuli into tissue remodeling (Ahmed et al., 2015; Humphrey, 2002; Humphrey et al., 2015; Li and Xu, 2007; Petit, C. et al., 2017).

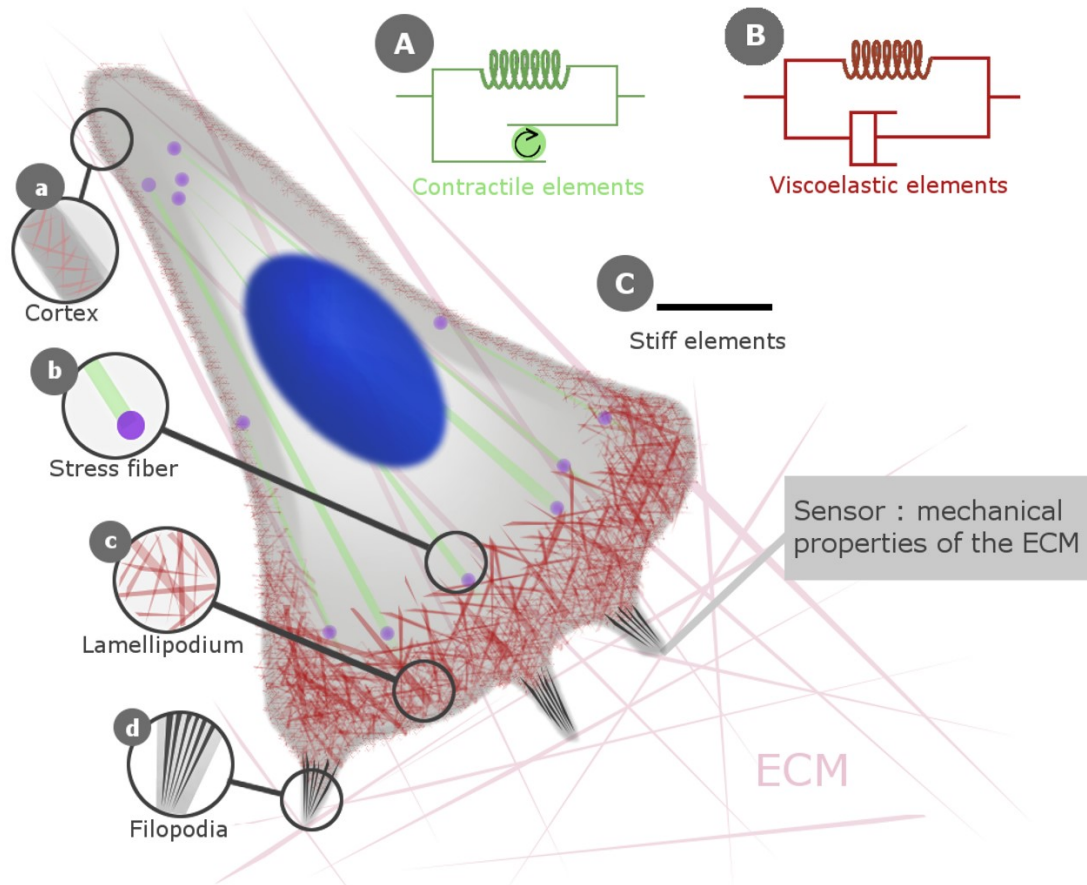


Figure 2.8 The cytoskeleton of the migratory cell is composed of a complex network of actin bundles where three specific structures are observed: (a) The cortex: a crosslinked network surrounding the cell and ensuring the modulation of cell shape by rapid turnover during migration. (b) Stress fiber: contractile structures made of antiparallel actin bundles linked to a molecular motor, the myosin. (c) Lamellipodium: large membrane extension made of crosslinked and branched bundles, pushing the cell forward. (d) Filopodia: thin membrane extension made of parallel bundles, and projected forward to sense the mechanical properties of the substrate. Each of these structures has its proper mechanical behavior: (A) Contractile elements activated by the myosin motor. (B) Viscoelastic elements based on a kelvin-Voigt model (viscous damper and elastic spring connected in parallel). (C) Stiff elements associated with filopodium. Here the cell is represented on a 2D substrate instead of the 3D real ECM. That is why the cell has adopted an apico-basal polarity. The apical side refers to the unattached membrane above the nucleus, and the basal one to the contact with the substrate, through focal adhesions. Inspired from the lecture of Planus (Planus, E., 2017).

3.5.1 Mechanosensing

Many recent studies have highlighted the effects of the environment on SMCs response, in terms of protein synthesis, proliferation, migration, differentiation or apoptosis, thanks to its mechanosensitive architecture (Livne and Geiger, 2016; Park et al., 2011; Parker et al., 2002; Saez et al., 2007; Thyberg et al., 1995; Wang, 2017). Mechanosensing relies on links between the ECM, focal adhesions and the cytoskeleton. The microfibrils provide an adhesive support to the SMCs through collagen VI (Kielty et al., 1992). Because of this, when the microfibrils are damaged, SMCs sense an increase in stiffness and are no more able to transmit forces to each other through elastic fiber. According to several studies, the elastin acts for the maturation of the contractile apparatus of the SMCs and may encourage their quiescent phenotype (Arribas et al., 2006; Karnik, 2003; Stadler et al., 1989). In the ECM, two proteins are mainly involved in mechanosensing: fibronectin and laminin. Fibronectin is known for being mainly present in the ECM of blood vessels during early development

and seems to encourage SMCs proliferation and migration in order to build the tissue (Reusch et al., 1996; Thyberg et al., 1990). On the contrary, the laminin may be required later for SMCs maturation towards a contractile phenotype (Tran et al., 2006). Since SMCs are dynamic systems, their cytoskeleton remains in constant evolution during cellular processes. This specific structure allows the cell for shape maintenance and generation of traction forces required notably during migration (Fig. 2.8). The cytoskeleton of SMCs is particularly rich in contractile α -SMA thin filaments (see section 3.4.1) that are used to enhance traction forces required for the cell function. SMC contraction involves a quick remodeling of its cytoskeleton in order to recruit contractile thin filaments in the direction of applied forces (Chen et al., 2007; Goffin et al., 2006a) and to follow its change of shape while renewing non-contractile cortical structures (Hong et al., 2015). In summary, the SMC may be considered as a powerful sensor of the mechanical state across the aortic wall. The high sensitivity of SMCs led many research teams to point out their implication in arterial disease, including aortic aneurysms (Brownstein et al., 2017; Guo et al., 2007; Humphrey, 2002; Karnik, 2003; Li and Xu, 2007; Mecham and Schwartz, 1995; Thyberg et al., 1990).

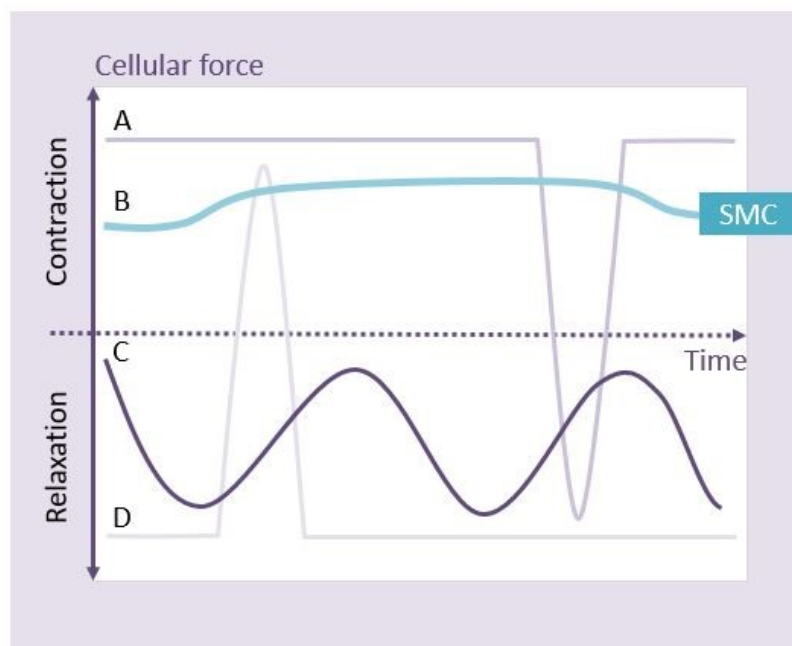
3.5.2 The key role of SMCs in ATAAs

The role of SMCs in the development of ATAAs is now well accepted (Fujiwara and Uehara, 1992; Wagenseil and Mecham, 2009). Several studies have already mentioned the change of SMC behavior in cardiovascular disease, and the consequences on the arterial wall. It was shown that hypertension is perceived by SMCs as permanent stimuli through the increase of wall stress, which induces collagen synthesis to reinforce the wall resulting in an increasing thickness (Hayashi and Naiki, 2009; Humphrey, 2002; Lacolley et al., 2012; Michel et al., 2018). In atherosclerosis and restenosis, the growth of plaques between the media and the intima is due to SMCs proliferation and migration towards the intima, forming a neointima (Karnik, 2003; Raines and Ross, 1993). The neointimal SMCs are also able to gather lipids, increasing the stiffness and weakening the wall. Intimal integrity may also control the quiescence of SMCs thanks to Heparan Sulfate (Rubbia and Gabbiani, 1989; Tran-Lundmark et al., 2015) or vasoactive agonists (Hong et al., 2015; Humphrey, 2002) synthesis. Hence, the degradation of the endothelial cell layer leads to SMC proliferation and ECM synthesis until whole intimas repair (Thyberg et al., 1997). All of these changes suggest that SMCs can switch to another phenotype, in order to repair the damaged tissue through migration towards the injured region, proliferation and ECM synthesis (Thyberg et al., 1997). Under normal conditions, mature SMCs acquire a « contractile » (C) phenotype from an immature « synthetic » (S) one, which is mainly present in early development (Karnik, 2003; Mecham and Schwartz, 1995; Raines and Ross, 1993). But SMCs demonstrate a high plasticity as they are not fully differentiated cells, and they can return to a (S) phenotype in response to many stimuli. The phenotypic switching is due to a number of factors summarized Table 2.3. The cytoplasm of (S) SMCs has more developed synthetic organelles like endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, leading to hypertrophy (Humphrey, 2002). The phenotypic switching does not radically change the cytoskeleton as microtubules remain intact, but the contractile apparatus (i.e., α -SMA thin filaments) is clearly affected (Chen et al., 2007; Karnik, 2003; Rubbia and Gabbiani, 1989; Skalli et al., 1986; Stadler et al., 1989; Thyberg et al., 1997). SMC contractility involves a reorganization of their contractile apparatus. In other words, high traction forces require high adhesion to the ECM, hence it is suggested that SMCs undergo a regulation of their focal adhesions (Anderson et al., 2004; Chen et al., 2007; Goffin et al., 2006a; Hong et al., 2015),

evolving towards super focal adhesions (suFAs) in the direction of the applied stress (Chen et al., 2007; Goffin et al., 2006a). Hyperplasia concerns the loss of SMCs' quiescence in favor of a proliferating and migrating behavior (Humphrey, 2002; Mecham and Schwartz, 1995). During hypertension, the increase in wall thickness has been shown to result in more from hypertrophy than hyperplasia (Lacolley et al., 2012; Owens et al., 1981), but the two phenomena are involved in several pathological states (Humphrey, 2002). ATAAs also involve a reduction of the elastin/collagen ratio in the aortic wall, inducing stiffness increase and leading to phenotypic switching of SMCs (Mao et al., 2015). But the whole thickness is not uniformly affected: *Tremblay et al.* (Tremblay et al., 2010) have assessed SMC densities across ATAAs and deduced it was greater in the outer curvature. The reduced contractile behavior suggests more phenotypic switching in this area.

3.5.3 SMC mechanotransduction

As previously highlighted in several studies (Bellini et al., 2014; Humphrey et al., 2015), SMCs tend to remain in a specific mechanical state called homeostasis. It is considered as a reference value for the stress they undergo into the wall under normal physiological pressure. During any cardiac cycle, SMCs do not activate suddenly their contractile apparatus according to the short variations of blood pressure. In fact, they always remain partially contracted and tend to adapt gradually to any constant increase of the mean pressure (Fig. 2.9).



A : Normally contracted : Sphincters

B : Normally partially contracted (tone) : Blood vessels, airways

C : Phasically active : Stomach, intestines

D : Normally relaxed : Esophagus, urinary bladder

Figure 2.9 All the smooth muscle have not the same behavior. The SMCs are normally partially contracted and adapt their contractile response and maintain it for a long time. Figure inspired of (Koeppen and Stanton, 2009).

Facing a constant rise of wall stress, SMC response may be divided into two main categories according to time. In the short term, SMCs react in a progressive contraction until they reach maximal contraction, permitting to regulate the blood flow through arterial diameter control. But beyond a given stress threshold, collagen fibers from the adventitia are recruited to protect the cells and the medial elastic fibers from higher stress values (Bellini et al., 2014; Humphrey, 2002). In the long term, the remaining mechanical stimuli of SMCs lead to phenotypic switching or apoptosis. In this way, SMCs tend to coordinate the renewal of ECM, and particularly synthesizing collagen fibers to increase the wall resistance to high stress.

3.5.4 Mechanical homeostasis in the aortic wall

Mechanical homeostasis means that SMCs try to regulate their contractile apparatus and their surrounding ECM to maintain a target wall stress corresponding to a certain mechanobiological equilibrium. The presence of a mechanobiological equilibrium was first proposed by the constant mean tension of a single MLU in a stressed aorta in spite of different species and aortic diameter (Humphrey et al., 2015; Wolinsky and Glagov, 1967). *Humphrey* estimated that the circumferential stress per MLU is about $\sigma_\theta = 133$ kPa (Humphrey et al., 2015). It is assumed that SMCs and fibroblasts tend to maintain a preferred mechanical state through homeostasis. *Kolodney et al.* showed that cultured fibroblasts on unloaded gel substrates generate a steady tension of 3.2 kPa (Kolodney and Wysolmerski, 1992). Moreover, *Humphrey* (Humphrey et al., 2015) suggested that homeostasis expression is similar throughout scales, from organ level (vessel mechanoadaptation), tissue level (ECM prestressing and synthesis/degradation), cellular level (traction forces applied onto the ECM), subcellular level (focal adhesions and actin/myosin bundles) and even molecular level ($[Ca^{2+}]_i$). These findings suggest that the cell is able to adapt its proper stress state through the regulation of $[Ca^{2+}]_i$, cytoskeleton and focal adhesions turnover, and by controlling its surrounding ECM as well. Experimental studies of *Matsumo et al.* (Matsumoto et al., 1996) showed a change of the intramural strain distribution in response to SMCs contraction (and relaxation) on radially cut aortic rings and confirm that SMCs actively adapt their contractile state to keep the intramural stress uniform. In summary, SMCs can both work actively (through contraction/relaxation) and passively by deposition and organization of the ECM (Humphrey et al., 2015). That is why SMCs may undergo a phenotypic switching towards a synthetic one under several stimuli (see section 3.5.2). Through phenotypic switching, SMCs tend to remodel their ECM to go back to a preferred state and facing the variations of their environment. *Humphrey* has well described this equilibrium state saying: « When a homeostatic condition of the blood vessel is disturbed the rate of tissue growth is proportional to the increased stress » (Humphrey, 2002). But SMCs lose their contractility in return and may irrevocably affect the wall vasoactivity in which they may have a key role (Humphrey et al., 2015; Kuang et al., 2012; Schildmeyer et al., 2000). In fact, *Humphrey* suggests in his review that fully contractile SMCs can react mainly to circumferential wall stress (150 kPa in physiological conditions) with a 100 kPa equivalent traction forces exerted on their ECMs while synthetic SMCs may only apply 5–10 kPa (Humphrey et al., 2015).

3.5.5 Consequences for aortic tissue

Reduction or loss of SMC contractility alters the stress distribution across the aortic wall (Hong et al., 2015; Owens et al., 2004; Skalli et al., 1986; Stadler et al., 1989). In reaction, the development of synthesis abilities ensures recovery processes by ECM remodeling. SMCs keep a key role in the aortic

wall remodeling. In ATAAs, they tend to adapt their response through complex signaling pathways. An important one is Rho kinase (ROCK), mainly involved in cytoskeleton turnover for the control of cell shape and movement during migration (Kuang et al., 2012). The Rho kinase seems to influence the formation of α -SMA thin filaments and the regulation of FAs that are involved in SMCs contractility and anchoring to the ECM (Anderson et al., 2004; Chen et al., 2007; Goffin et al., 2006a; Somlyo and Somlyo, 2003). Moreover, the oxidative stress induced by ATAAs enhances the inflammatory response of SMCs, increasing MMP synthesis and further disruption of elastin fibers (Miller et al., 2002). Remodeling was shown to be uneven in human (Choudhury et al., 2009) and porcine (Tremblay et al., 2010) aortic tissues. Authors highlighted that the outer curvature of ATAAs is more affected. Remodeling implies phenotypic switching towards a synthetic phenotype able to synthesize both ECM compounds (i.e., collagen and glycoproteins) and MMPs to degrade the « dysfunctional » ECM, leading to ECM wear (Humphrey, 2002; Owens et al., 2004; Raines and Ross, 1993; Rubbia and Gabbiani, 1989). Likewise, elastin degradation results in a permanent decrease of the elastin/collagen ratio since elastic fibers cannot be regenerated in adulthood (Arribas et al., 2006). On top of the induced stiffening, the ability of SMCs to restore a healthy state is altered as well as it was shown that elastin is also important for activating actin polymerization (Petit, C. et al., 2017). Moreover, SMCs undergo a general apoptosis to reduce their number when they sense an inappropriate chemo-mechanical state, inducing further reduction of elasticity and mechanical resistance through a vicious circle loop (Li and Xu, 2007; Mao et al., 2015; Miller et al., 2002; Riches et al., 2013).

3.5.6 Towards an adaptation of SMCs in ATAAs?

Any disruption of the mechanical or chemical homeostasis is interpreted by the SMCs as a distress signal, and several recovery processes can be activated in reaction, but the regulation loop is similar to a vicious circle because of the complexity to return naturally to equilibrium (Fig. 2.10). Interestingly, in hypertension, the increase of wall stress results in an increase in the arterial diameter (Hayashi and Naiki, 2009; Humphrey, 2002). Conversely, a decrease in mean wall stress leads to an atrophy (Humphrey, 2002). Since the (S) SMCs can recover their (C) phenotype once the tissue returns to its original homeostatic stress, the phenotypic switching seems to be a reversible process (Ahmed et al., 2015; Owens et al., 2004; Stadler et al., 1989). These observations suggest a two-way mechanoadaptive process. But once affected by ATAAs, remodeled aortic ECM is known not to reach complete recovery, particularly because disrupted elastic fibers can not be rebuilt in adulthood (Arribas et al., 2006). Aortic tissue would, therefore, evolve more or less quickly according to some factors that may slow it down.

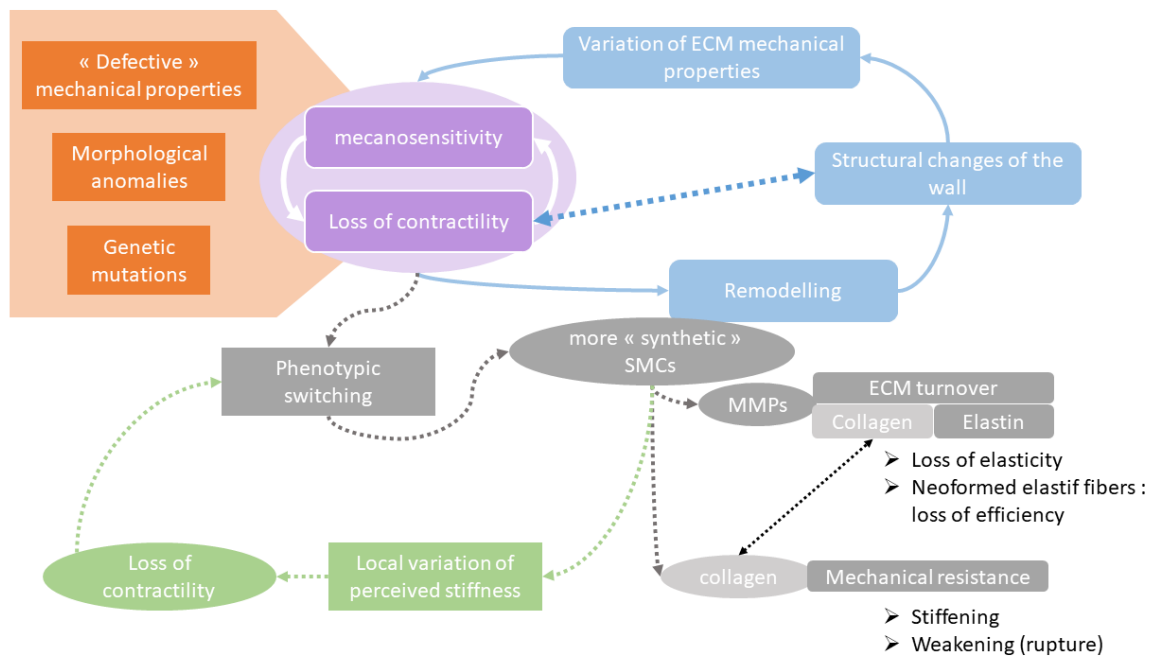


Figure 2.10 A vicious circle: under some stimuli (orange box), the homeostatic state is endangered and the cell (violet circle) sets up complex chain reactions. Several regulation loops cross each other (blue, grey, green) and thus the equilibrium is difficult to reach again, especially as the elastin degradation leads to a permanent loss of elasticity and this effect is amplified with the duration of the pathological state. Hence, although the phenotypic switching may be reversible, the permanent alteration of the ECM may prevent the cells to go back to homeostatic conditions, that enhances the pathology.

As the review study of *Michel et al.* (Michel et al., 2018) has already pointed it out, ATAAs may result in some epigenetic modifications that have an influence on the cellular response. It could be defined as the acquisition of new constant and heritable traits without requiring any change in the DNA sequence, which results for instance in gene modulation. The suggested theory explains that SMCs reprogramming is likely to induce a progressive dilatation of the aorta without dissection, whereas no reprogramming SMCs promote acute rupture of the wall (Michel et al., 2018). Finally, it is well accepted that SMCs play a major role in controlling the wall evolution after aortic injury, either toward partial recovery of initial mechanical properties or fatal rupture through dissection. However, quantification of levels of SMC contractility that result in one type of evolution or another is still an open issue. There is still a pressing need to characterize the basal tone of SMCs in healthy aortas ATAAs at the cellular scale.

3.6 Summary and future directions

Mechanobiology and physiopathology of the aorta have received much attention so far but there is still a pressing need to characterize the roles of SMCs at the cellular scale. Despite the difficulties of characterizing cells having complex dynamics and fragility, techniques such as Atomic Force Microscopy or Traction Force Microscopy could permit important progress about SMC nanomechanics and provide relevant information on how SMC biomechanics is related to the irreversible alteration of stress distribution in ATAAs. This will also imply the development of new biomechanical models of the aortic wall taking into account the contractility of SMCs.

3.7 Liste des tables

Table 2.1 Causes principales de l'ATAA affectant d'une part l'ECM et d'autre part les SMC

Causes of ATAAs		Effects
Genetic mutations		
Affecting the ECM	FBN1 (Marfan syndrome)	Microfibrils anomalies => wrong force transmission and alteration of the mechanotransduction (Brownstein et al., 2017; Isselbacher, 2005)
	types I and III Collagen	Anomalies of collagen fibers (Humphrey et al., 2015)
Affecting the SMC	ACTA2 (α -SMA)	Dysfunction of the contractile apparatus. This mutation represents about 12% of ATAAs (Brownstein et al., 2017; Guo et al., 2007)
	MYH11 (myosin light chain)	Dysfunction of the contractile apparatus (Brownstein et al., 2017; Kuang et al., 2012)
	TGFB (TGF- β)	Anomalies of TGFB receptors TGBFR1/2. Wrong regulation of traction forces (Brownstein et al., 2017; Chen et al., 2007; Gillis et al., 2013)
	MYLK (myosin light chain kinase)	Alteration of myosin RLCs (regulatory light chains) phosphorylation, and thus force generation (Milewicz et al., 2016)
	PRKG1	Kinase activation resulting in SMCs relaxation (Milewicz et al., 2016)
	MMP genes	The deletion of these genes orders MMPs synthesis to stop => improving ATAAs (Papke et al., 2015)
Phenotypic switching		Contractile (C) => Synthetic (S)
Stiffening and weakening of the arterial wall	Pathologies (atherosclerosis, arteriosclerosis, arteritis, ageing...)	The SMCs move on to synthetic phenotype (S) (hypertrophy), they lose their quiescence (hyperplasia), they order wall remodeling by the synthesis of MMPs (degradation) and ECM (renewal). Moreover, atheroma plaques contain many SMCs. (Humphrey, 2002; Isselbacher, 2005; Mao et al., 2015; Rubbia and Gabbiani, 1989; Tsamis et al., 2013)
Chronic overstress	Hypertension, dissection, ATAAs...	The (C) SMCs move on to (S) : remodeling, hypertrophy, hyperplasia (Arribas et al., 2006; Owens et al., 1981)
Contact with blood flow	Initial injury	The (C) SMCs move on to (S), formation of a neointima containing SMCs and GAGs through hyperplasia (Thyberg et al., 1995)

Change in ECM chemical composition	Laminine/fibronectine ratio	The (C) phenotype may be favored on laminin or Matrigel (collagen+laminin) in vitro. (Chen et al., 2015; Reusch et al., 1996; Thyberg et al., 1997, 1990)
	Elastin/collagen ratio	An high elastin concentration may activate actin polymerization and thus the development of the contractile apparatus. (Wang and Lin, 2007)
Cell culture in vitro	High passage Substrate (physical properties)	Wrong development of the contractile apparatus => more (S) SMCs as cell passage increases. Necessity to use some stimuli like vasoactive agonists or suitable substrates. (Murray et al., 1990; Murtada et al., 2016a; Raines and Ross, 1993; Stadler et al., 1989; Thyberg et al., 1997)
Partially identified causes		
Biochemical imbalance	Signaling pathways involved in cell contraction	Angiotensin II Growth factors : TGF- β , PDGF,... (Goldfinger et al., 2014; Humphrey et al., 2015; Li and Xu, 2007; Milewicz et al., 2016; Park et al., 2011; Reusch et al., 1996; Somlyo and Somlyo, 2003; Tomasek et al., 2002)
		Ca ²⁺ ionic channel (Berridge, 2008; Davis et al., 1992; Hill-Eubanks et al., 2011; Malmqvist and Arner, 1999; Murtada et al., 2016a; Schildmeyer et al., 2000; Somlyo and Somlyo, 1994)
Intercellular interactions	Vasoactive agonists, neurotransmitters, hormones, ions, mechanical stimuli	Interaction with endothelial cells from the intima (Hong et al., 2015; Humphrey, 2002; Lilly, 2014; Rubbia and Gabbiani, 1989; Thyberg et al., 1997; Tran-Lundmark et al., 2015)
		Synchronization of several SMCs (Berridge, 2008; Brozovich et al., 2016; Humphrey, 2002)
Local changes in hemodynamics	Bicuspid aortic valve, dissection, ATAAs	Disturbance of the mechanotransduction through endothelial cells and SMCs (Humphrey, 2002; Isselbacher, 2005; Owens et al., 2004)
Embryonic origin of the SMCs	Transition area between aortic root and arch : the media combines SMCs from different origin	Outermost SMCs are from second heart field and innermost ones from neural crest. This area is prone to ATAAs and dissections. (Sawada et al., 2017)

Table 2.2 Stiffness and traction force values for in vitro SMCs

SMCs mechanical properties	Pa equivalent	Description	References (SMCs type)
Stiffness			
$10^3 - 10^5 Pa$		AFM technique	(Laurent et al., 2002)
Viscoelastic properties		In response to a vasoactive agonist (serotonin)	(Smith et al., 2005) (Airway SMCs)
Storage modulus G' (elastic part)		150% increase	
Loss modulus G'' (viscous part)		67% increase	
Hysteresis		28% decrease after AFM stimulus : The cell elasticity prevails gradually more (« latch state »)	
Elastic properties		Comparison between control an Marfan induced aneurysm tissue	(Crosas-Molist et al., 2015) (aortic SMCs)
Young Modulus	3k	Increase in SMCs and ECM stiffness in the pathological case	
	7k		
		Increase in focal adhesions size	
		Comparison between control and stimulated tissue with Angiotensine II (vasoconstrictor)	
Young Modulus	13,5k	Increase in SMCs stiffness after having their contraction induced (after 2 min)	(Hong et al., 2015) (arteriol SMCs) *Smith et al. 2005
	18,5k		
	22k	After 30 min (*actin polymerisation dynamics)	
		Increase in focal adhesions size (Stronger adhesion to functionalized AFM tip with type I collagen)	
$10^0 - 10^2 Pa$		Magnetic twisting cytometry	(Laurent et al., 2002)
Increase in SMCs stiffness with substrate rigidity			(Hubmayr et al., 1996) (Airway SMCs)
$12,6 \pm 1,6 N/m^2$	12,6	“Hard” substrate : high density collagen	
$4,3 \pm 0,3 N/m^2$	4,3	“Soft” substrate : low density collagen	

Increase in SMC stiffness with contraction		More effect on « soft » substrate	(Hubmayr et al., 1996)
		Increase linked to myosin heads activation and actin polymerisation	(An et al., 2002) (Airway SMCs)
$9,91 \pm 0,75 \text{ N/m}^2$	9,9	Unstimulated	
$14,27 \pm 0,85 \text{ N/m}^2$	14,3	Vasoconstrictor agonist : serotonin	
Traction forces			
Traction forces measured according to the calcium concentration of the KCl bath : stimulus électrochimique sur un ensemble de cellules ?			(Dillon et al., 1981) (carotid SMCs)
$2,9 \pm 0,4 \times 10^5 \text{ N/m}^2$	290k	$[Ca^{2+}] = 1,6 \text{ mM}$	
$3,9 \pm 0,2 \times 10^5 \text{ N/m}^2$	390k	$[Ca^{2+}] = 25 \text{ mM}$	
TFM on a PDMS micro needles array with a fibronectin coating, simulating a soft material : cellular stress applied by the entire cell			
SMCs applied stress, adhering to the pattern, unstimulated	4,6k	Inhibition of the myosin contractility and the actin polymerisation	(Tan et al., 2003b) (Airway SMCs)
Increase in the applied stress per needle with cell spreading	10k	Weakly spread ($440 \mu\text{m}^2$)	
	30k	Strongly spread ($1520 \mu\text{m}^2$)	
TFM on a gel substrate including fluorescent and magnetic microbeads with fibronectin coating: Traction forces measurement and mechanical stimulus			(Balasubramanian et al., 2013) (renal vascular SMCs)
1 N/m^2	1	Unstimulated SMCs	
$1,6 \text{ N/m}^2$	1,6	Stimulated SMCs : 60% increase	
Standard TFM on gel substrate with fluorescent microspheres : measurement of the deformation field after a chemical stimulus			(Tolić-Nørrelykke et al., 2002) (Airway SMCs)
Increase in mean traction force (mean vector of the deformation field)	50	Unstimulated	
	100	Vasoconstrictor agonist : histamine	
The contractile apparatus is made of non-contractile thick filaments, linked to classic focal adhesions (FA), and highly contractile α -SMA filaments, linked to super focal adhesions (suFA)			(Goffin et al., 2006b) (myofibroblasts)
	8,5k	Stress produced by suFAs	
	3,1k	Stress produced by classic FAs	

Table 2.3 SMCs phenotypic switching characteristics

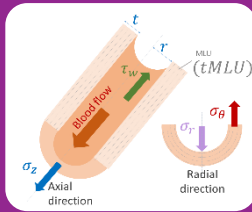
SMCs phenotypic switching	Effects	References
High plasticity	The SMCs are not entirely differentiated when they reach maturity through contractile (C) phenotype, and can move on to a synthetic (S) phenotype (The (S) phenotype is mainly present in the aorta during early development)	(Humphrey, 2002; Humphrey et al., 2015; Mecham and Schwartz, 1995; Owens et al., 2004; Thyberg et al., 1997, 1995, 1990)
ECM synthesis and degradation (through MMPs synthesis)	The SMCs undergo an increase in volume (hypertrophy), with the development of their synthetic organelles (Golgi apparatus and endoplasmic reticulum)	(Humphrey, 2002; Owens et al., 2004; Raines and Ross, 1993; Rubbia and Gabbiani, 1989)
Loss of quiescence : hyperplasia	(S) SMCs tend to proliferate and migrate	(Mecham and Schwartz, 1995)
Loss of contractility	Stress produced into the wall : (C) SMCs : 100kPa ; (S) SMCs : 5-10kPa	(Humphrey et al., 2015)
Degradation of the contractile apparatus	The cytoskeleton is not entirely remodeled (undamaged microtubules), but there are weaker actin and myosin concentrations (contractile fibers) in (S) SMCs	(Karnik, 2003; Rubbia and Gabbiani, 1989; Stadler et al., 1989; Thyberg et al., 1997)
Modification of the basal side	Regulation of the focal adhesions (They grow according to the traction force direction, ensuring a strong adhesion to the ECM in response to high stress)	(Hong et al., 2015; Owens et al., 2004; Stadler et al., 1989) ((Chen et al., 2007; Goffin et al., 2006b))
Decrease in α -SMA concentration	Degradation of the thin filaments that are responsible for amplifying and regulating the cell traction forces	(Chen et al., 2007; Skalli et al., 1986)
Reversible process	Once the tissue is repaired, the SMCs return to a contractile phenotype	(Owens et al., 2004; Stadler et al., 1989; Thyberg et al., 1995)
General apoptosis	Decrease of SMCs number and degradation of the ECM => loss of wall elasticity and resistance	(Li and Xu, 2007; Mao et al., 2015; Riches et al., 2013)

Conclusion

Désormais conscients du rôle fondamental joué par la CML dans l'apparition et le développement de l'AATA, et sur la base d'un état de l'art relativement large à propos des mécanismes de mécanosensibilité et de mécanotransduction mis en place par la CML au travers de son cytosquelette, la voie semble toute tracée en direction de la caractérisation à l'échelle cellulaire et même subcellulaire de la CML aortique humaine saine et anévrismale. Il s'agit d'une étude qui vient s'insérer dans un contexte où les connaissances actuelles ne font apparaître que très peu de données quantitatives à propos des propriétés mécaniques de la CML aortique, et encore moins humaine, puisqu'aucune étude n'a, à notre connaissance, investigué de CML aortique humaine saine ou anévrismale. L'enjeu du travail expérimental de cette thèse est donc d'investiguer les propriétés biophysiques de la CML, et de dégager un ensemble de données quantitatives suite à la caractérisation de leurs forces de tractions, puis de leur rigidité, dans le cas sain comme anévrismal.

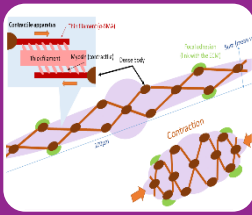
Le passage au chapitre suivant marque une frontière nette entre le travail préparatoire de bibliographie présenté dans ce chapitre, et la partie expérimentale. Les prochains chapitres seront construits sur la base des publications élaborées dans le sens des travaux menés sur la caractérisation des propriétés mécaniques de CML, notamment leur contractilité et leur rigidité, par des méthodes d'ingénierie instrumentale connues. Le **Chapitre 3** présentera la méthode élaborée pour la caractérisation des forces de traction de la CML, et le **Chapitre 4** exposera l'étendue de cette application à plusieurs échantillons de CML saines et anévrismales. Le **Chapitre 5** sera dédié à la caractérisation de la rigidité des CML saines et anévrismales par nanoindentation. Le **Chapitre 6** constituera la synthèse de ces travaux et proposera une discussion sur la base des résultats obtenus, avant d'ouvrir le champ sur de nouvelles perspectives de recherche.

Mécanique de la paroi



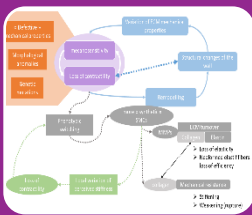
- Structure multicouche et multiéchelle
- Les trois couches fonctionnent en symbiose entre elles et possèdent chacune des propriétés complémentaires
- La media participe majoritairement à la réponse mécanique de la paroi
- Constituants principaux de la MEC : élastine (élasticité) et collagène (résistance mécanique)
- Anisotropie due à la structure fibreuse orientée de la MEC
- Réponse passive de la MEC face aux sollicitations mécaniques

Role biomécanique actif de la CML



- La CML possède un appareil contractile fortement développé
- Les CML demeurent toujours partiellement contractées : tonus basal
- Phénotype mature contractile contribuant au tonus basal de la paroi aortique
- Répartition homogène des contraintes au travers de la paroi par contraction synchronisée des CML
- Homéostasie : équilibre biophysique et biochimique entretenu en conditions physiologiques par les CML

Plasticité phénotypique : témoin de la défaillance de la paroi



- Possibilité de changement de phénotype en conditions pathologiques
- Phénotype synthétique immature apte à synthétiser la MEC en vue de réparer un tissu jugé "défaillant"
- Le remodelage tissulaire augmente la teneur en collagène afin de protéger la paroi contre les sollicitations élevées
- Cela augmente la résistance mécanique de la paroi, mais la rigidifie fragilise en contrepartie et la rend plus sujette à la rupture
- La perte d'élasticité est un phénomène permanent et irréversible
- La CML perçoit ces changements comme une défaillance et entretient davantage un phénotype synthétique : un cercle vicieux s'établit en défaveur de la réponse élastique naturelle de la paroi saine

CHAPITRE 3

Mesure de contractilité par Traction Force Microscopy

Petit, C., Guignandon, A., Avril, S. Traction Force Measurements of Human Aortic Smooth Muscle Cells Reveal a Motor-Clutch Behavior. *Molecular & Cellular Biomechanics* (2019). *16(2)*, 87–108.

1. Introduction

Ce chapitre porte sur la caractérisation expérimentale de la contractilité des cellules musculaires lisses (CML) aortiques humaines. Cette caractérisation s'appuie sur le principe de la Traction Force Microscopy (TFM), servant à mesurer les forces de traction exercées par la cellule sur un substrat déformable. Ce premier développement expérimental a fait l'objet d'une publication dans le journal *Molecular & Cellular Biomechanics (MCB)* en 2019, qui sera reprise dans le développement de ce chapitre. A noter que nous avons noté a posteriori une erreur dans les résultats publiés et que nous présentons dans ce chapitre une version mise à jour où les erreurs ont été corrigées.

2. Résumé de la publication

La CML aortique est capable de maintenir une contraction permanente, sous forme d'un tonus basal essentiel au bon fonctionnement de l'aorte pour faire face aux variations de pression sanguine dues au cycle cardiaque. Par ailleurs, compte tenu de l'importance des phénomènes de mécanosensibilité et de la mécanotransduction sur la réponse cellulaire, une meilleure compréhension de la variation du comportement de la CML en lien avec son environnement est essentielle. Dans un premier temps, nous avons observé les effets de la variation de la rigidité du substrat sur le tonus basal des CML. Pour ce faire, une lignée commerciale de CML a été utilisée, afin de nous familiariser à la manipulation de ce type cellulaire particulièrement fragile. La lignée commerciale AoSMC fournie par le fabricant Lonza, reçue à passage 3, et utilisée entre les passages 4-7, s'est avérée suffisamment robuste pour ce premier développement. Ces cellules ont été cultivées dans deux types de milieux :

- le milieu complet (SmGM-2) à 10% de serum, afin de promouvoir dans un premier temps leur prolifération,
- le milieu basal, afin de promouvoir leur différenciation vers un phénotype contractile par privation de SVF.

Au bout d'une semaine de différenciation, les CML ont étéensemencées sur des hydrogels de différentes rigidités (4, 8, 12 and 25 kPa) contenant des microbilles fluorescentes vertes de 0.2 μm de

diamètre, ainsi qu'un revêtement de collagène pour améliorer l'adhérence des cellules à leur surface. Ces hydrogels prêts à l'emploi ont été commandés auprès du fabricant Matrigen sous forme de plaques de 24 puits habituellement utilisées pour la culture cellulaire en biologie. Deux jours de culture supplémentaires sont nécessaires afin de laisser aux cellules le temps d'adhérer à leur substrat et d'adopter une morphologie naturelle. D'autres échantillons ont été préparés sur des micromotifs adhésifs de fibronectine, fournis par CYTOO, afin d'observer la morphologie des CML adhérentes, ainsi que leur architecture interne.

Les échantillons cellulaires sur hydrogels ont ensuite été utilisés sous un microscope à fluorescence possédant une fonction vidéomicroscopie, afin de « filmer » les cellules au cours de l'expérience. La plateforme de microscopie est également équipée d'une chambre d'incubation permettant de maintenir une atmosphère contrôlée à 37°C et 5% de CO₂ telle que celle d'un incubateur de culture standard. L'expérience a donc pu se dérouler dans les conditions optimales pour des cellules vivantes, et ce même pendant les 4h nécessaires pour l'acquisition d'une plaque de 24 puits. Le protocole de mesure s'est ensuite établi de la manière suivante :

- sélection du puit pour la mesure,
- aspiration du milieu de culture et rinçage au PBS,
- en lumière blanche, sélection de la zone d'intérêt contenant 1 à 4 cellules suffisamment isolées,
- mise au point sur les billes fluorescentes sur le canal adéquat (Green Fluorescent Protein, GFP),
- lancement de l'acquisition pour une durée de 5 min avec une image prise toutes les 30s,
- après la première image, ajout de trypsine afin de décoller les cellules du substrat,
- acquisition jusqu'à détachement complet des cellules (3 à 5 min),
- recommencer sur chacun des puits de la plaque.

Les images prises sur les microbilles fluorescentes permettent de remonter à leur champ de déplacement suite au détachement des cellules par trypsinisation. Cette méthode permet donc de quantifier le tonus basal des CML, qu'elles appliquent naturellement après adhésion, et ce sans stimulus externe. Pour ce faire, le traitement des images issues de la microscopie à fluorescence s'appuie tout d'abord sur la technique de corrélation d'image (Digital Image Correlation, DIC), qui permet de calculer le champ de déplacement des billes et de contraintes dans le gel sur la zone d'intérêt sélectionnée.

Ensuite, les matrices de champs de contraintes pour chacun des puits sont traitées par un code Matlab développé spécifiquement pour cette application lors de la thèse. Ce code effectue la comparaison du champ expérimental avec le champ théorique calculé à partir de fonctions de Green, s'appuyant sur la solution de Boussinesq pour une force ponctuelle appliquée sur un demi-espace infini. En pratique, la force exercée ponctuellement par une cellule en ses points d'ancrage se traduit par l'apparition sur le champ de contraintes d'un motif à double lobe orienté selon le grand axe de la cellule. C'est sur ce type de motif que la comparaison expérience-modèle s'effectue. Il en résulte alors le calcul de la force correspondante par minimisation de l'écart entre le modèle et l'expérience.

En termes de résultats obtenus lors de cette première phase d'expérimentation, nous avons observé premièrement une tendance des CMLs à adopter une morphologie naturellement très

allongée, et établi un critère de comparaison morphologique appelé « spindle-shapness », correspondant au ratio largeur sur longueur des CML. Avec une valeur moyenne de 0.07, les CML de la lignée commerciale s'avèrent particulièrement allongées, et majoritairement uniaxiales. Elles sont donc bien adaptées à la mesure de forces de traction unidirectionnelles appliquées aux deux points d'ancrage principaux de la CML, et orientées selon sa longueur.

Concernant la mesure des forces de traction, deux grandes observations ressortent des résultats. D'une part, les valeurs mesurées varient selon les cellules, mais semblent concorder avec la dynamique de remodelage des adhésions focales au cours de la contraction. En effet, la distribution des valeurs de forces de traction montre une tendance exponentielle décroissante, avec une certaine variabilité, telle que le prévoit le modèle motor-clutch avec la prise en compte des cycles d'accrochage/déaccrochage des adhésions focales sur le substrat au cours du temps. Cela se traduit par une fraction variable (5 à 45 %) des valeurs inférieures à 10 nN, et 2% à 16% de valeurs supérieures à 100 nN. Cette tendance rejoint celle du modèle probabiliste du « motor-clutch » développé par Chan & Odde (Chan and Odde, 2008). D'autre part, les valeurs mesurées dépendent de la rigidité du substrat, puisque la fraction de forces les plus faibles tend à décroître à mesure que la rigidité augmente, tandis que la fraction de forces les plus élevées atteint un maximum à 12 kPa.

Puisque la variabilité et la dépendance à la rigidité se retrouvent dans le modèle "motor-clutch", et que celui-ci permet également de prévoir la distribution des valeurs mesurées, nous en avons conclu que ce modèle s'appliquait aux CML, ouvrant ainsi la voie vers une quantification du comportement contractile naturel des CML aortiques humaines.

Cette étude comporte tout de même certaines limitations, étant donné que la caractérisation *in vitro* des CML se fait ici en 2D, et sur des rigidités relativement faibles par rapport à la réalité du tissu aortique. Par ailleurs, l'étude de la cellule isolée nous intéresse particulièrement, mais il demeure que l'interaction entre plusieurs cellules voisines influence également le comportement d'une CML. Le type de revêtement utilisé (collagène) ne représente pas non plus la matrice extracellulaire réelle, ce qui peut aussi constituer un biais dans cette analyse. Toutefois, ce développement permettra de disposer d'une base expérimentale commune pour l'étude de cellules saines et anévrismales par la suite.

D'autres limitations apparaissent dans le choix des hypothèses considérées pour l'application du modèle mécanique et du choix de la solution analytique. En effet, selon les choix de simplification et de modèle, les valeurs mesurées peuvent varier considérablement. La solution de Boussinesq peut paraître inadaptée pour des substrats fins, puisque nous ne disposons pas réellement d'un demi-espace infini dans le cadre de ces expériences. Toutefois, la vérification par éléments finis présentée dans cette publication nous a permis de conserver cette solution.

Une des perspectives envisagées est de généraliser le modèle « motor-clutch » aux CML anévrismales, et déterminer les paramètres essentiels pour déceler la modulation de la réponse contractile, afin d'évoluer vers une prédiction de la défaillance des CML en cas de pathologie.

3. Contenu de la publication

Traction Force Measurements of Human Aortic Smooth Muscle Cells Reveal a Motor-Clutch behavior

Claudie Petit¹, Alain Guignandon², Stéphane Avril¹

¹Mines Saint-Etienne, Université de Lyon, INSERM, U 1059 SAINBIOSE, F - 42023 Saint-Etienne France

²Université Jean Monnet, Université de Lyon, INSERM, U 1059 SAINBIOSE, F - 42023 Saint-Etienne France

Published in *Molecular & Cellular Biomechanics (MCB)*, Vol.16, No.2, pp. 87-108, 2019

3.1. Abstract

The contractile behavior of smooth muscle cells (SMC) in the aorta is an important determinant of growth, remodeling, and homeostasis. However, quantitative values of SMC basal tone have never been characterized precisely on individual SMCs. Therefore, to address this lack, we developed an in vitro technique based on Traction Force Microscopy (TFM). Aortic SMCs from a human lineage at low passages (4-7) were cultured 2 days in conditions promoting the development of their contractile apparatus and seeded on hydrogels of varying elastic modulus (4, 8, 12 and 25 kPa) with embedded fluorescent microspheres. After complete adhesion, SMCs were artificially detached from the gel by trypsin treatment. The microbeads movement was tracked and the deformation fields were processed with a mechanical model, assuming linear elasticity, isotropic material, plane strain, to extract the traction forces formerly applied by individual SMCs on the gel. Two major interesting and original observations about SMC traction forces were deduced from the obtained results: 1. they are variable but driven by cell dynamics and show an exponential distribution, with 40% to 80% of traction forces in the range 0-20nN. 2. They depend on the substrate stiffness: the fraction of adhesion forces below 20 nN tend to decrease when the substrate stiffness increases, whereas the fraction of higher adhesion forces increases. As these two aspects of cell adhesion (variability and stiffness dependence) and the distribution of their traction forces can be predicted by the probabilistic motor-clutch model, we conclude that this model could be applied to SMCs. Further studies will consider stimulated contractility and primary culture of cells extracted from aneurysmal human aortic tissue.

Conflict of interest: none.

Keywords: Cell biomechanics · Aortic Aneurysm · Mechanotransduction · Mechanosensitivity, Smooth Muscle Cells (SMC) · Fluorescent Microscopy (FM) · Traction Force Microscopy (TFM) · Isolated cells

3.2. Introduction

It is now widely acknowledged that the biomechanical behavior of smooth muscle cells (SMCs) in the aorta, through mechanosensitivity and mechanotransduction, is an important determinant of growth, remodeling, and homeostasis (Cox and Erler, 2011; Hayashi et al., 2012; Hong et al., 2014; Humphrey, 2002; Humphrey et al., 2015; Lacolley et al., 2012; Mecham and Schwartz, 1995).

Aortic SMCs are highly sensitive to:

- biochemical (Chen et al., 2015; Reusch et al., 1996; Thyberg et al., 1997, 1990; Tran et al., 2006; Wang and Lin, 2007)
- and mechanical stimuli from the surrounding extracellular matrix (ECM) (Arribas et al., 2006; Humphrey, 2002; Mao et al., 2015; Owens et al., 2004, 1981; Rubbia and Gabbiani, 1989; Tsamis et al., 2013).

In pathologies such as aortic aneurysms, the function of aortic SMCs may be altered by:

- genetics ((Brownstein et al., 2017; Chen et al., 2007; Gillis et al., 2013; Guo et al., 2007; Kuang et al., 2012; Milewicz et al., 2016; Papke et al., 2015; Regalado et al., 2015; Schildmeyer et al., 2000)),
- hemodynamics ((Choudhury et al., 2009; Pasta et al., 2013))
- or biomechanics ((Brownstein et al., 2017; Humphrey et al., 2015; Isselbacher, 2005)),

This may induce manifestations such as

- SMC apoptosis (Li and Xu, 2007; Mao et al., 2015; Riches et al., 2013)
- or phenotype switch from a mature quiescent and contractile phenotype towards a synthetic one (Humphrey, 2002; Mecham and Schwartz, 1995; Owens et al., 2004; Thyberg et al., 1997, 1995, 1990).

A synthetic SMC is able to proliferate and migrate more than a contractile one. It can induce ECM synthesis and degradation (Hayashi et al., 2012; Owens et al., 2004; Papke et al., 2015; Rubbia and Gabbiani, 1989). This remodeling of the aortic structure is often irreversible, with

- a permanent change of mechanical properties (Arribas et al., 2006; Hayashi et al., 2012; Humphrey, 2002; Tsamis et al., 2013)
- and possible vulnerability to rupture (Choudhury et al., 2009; Hayashi and Naiki, 2009; Tremblay et al., 2010).

Moreover, synthetic SMCs lose their contractile abilities and are no longer able to contribute actively to the wall biomechanics (Chen et al., 2007; Humphrey et al., 2015; Owens et al., 2004; Rubbia and Gabbiani, 1989; Schildmeyer et al., 2000).

Nevertheless, they can synthesize collagen fibers that compensate possible damage to elastic fibers, which are not renewed in adulthood (Arribas et al., 2006; Bellini et al., 2014; Hong et al., 2015; Owens et al., 2004; Skalli et al., 1986; Stadler et al., 1989).

This may lead to a vicious circle as elastin is required for the development of the contractile apparatus in SMCs (Karnik, 2003; Wang and Lin, 2007).

At homeostasis, SMCs tend to have a basal tone through their contractile behavior which maintains a preferred tension on the ECM (Bellini et al., 2014; Humphrey et al., 2015; Schildmeyer et al., 2000). Any biochemical and biophysical imbalance may alter this tension, and this may lead to a vicious circle. In this way, the SMC is a fundamental key player of aortic biomechanics and mechanobiology (Humphrey et al., 2015; Lacolley et al., 2012; Michel et al., 2018). However, quantitative values of SMC basal tone have never been characterized precisely.

In summary, there is a pressing need to investigate the biomechanical behavior of isolated cell, and particularly on human primary SMCs, as most of published studies:

- focused on animal SMCs (Balasubramanian et al., 2013; Sazonova et al., 2015; Tan et al., 2003b)
- and characterized only biological markers of SMC contractility such as Alpha Smooth Muscle Actin (α -SMA), myosin light chain, or calcium entry and release (Chen et al., 2007; Goffin et al., 2006b; Guo et al., 2007; Papke et al., 2013; Skalli et al., 1986).

The only study ever published to our best knowledge on mechanical quantification of contractility in human primary aortic SMCs is by Hall et al. (Hall et al., 2017).

This study was based on the traditional traction force microscopy (TFM) technique, which did not permit to focus on individual cells. In the present study, we present an augmented TFM technique to measure the traction forces applied by individual SMCs and relate them to relevant biological data about the contractile apparatus. After describing the new methodology in large details, from development to validation, we show original results quantifying the adaptation of aortic SMCs contractility to the substrate stiffness.

3.3. Material and methods

3.3.1. Cell culture

For this study, we used Aortic Smooth Muscle Cells from a human lineage (AoSMC, Lonza). After thawing, cells were put in culture in a T-75 flask for an entire week in a medium (SMGM-2, Lonza) promoting proliferation thanks to high (10%) fraction of Fetal Bovine Serum (FBS) and other specific components including growth factors. The cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ to maintain the pH at 7.2-7.4. In our study, SMCs were used between passages 4-7, and cultured one week more in a basal medium (SbBM, Lonza), containing low (2%) FBS and 0.04% heparin, according to the manufacturer's instructions.

Since they were from primary culture, AoSMCs were delivered at third passage, and therefore they reached passage 5 after two weeks of culture. Firstly, the cells were passaged at the end of the first week when they reached 70-80% confluence in growth medium, and transferred in three other T-75 flasks containing basal medium that reduced their proliferation. As primary cells are particularly sensitive, HEPES-Buffered Saline Solution (HEPES-BSS) (ReagentPack, Lonza) was used instead of standard Phosphate Buffered Saline (PBS) for a softer initial cell washing and low trypsin (0.025%) – EDTA solution (ReagentPack, Lonza) was used to break down the focal adhesions in the culture dish. Once they reached 50-70% confluence in basal medium (approximately one week), the cells could be used both for another subculture or for sample preparation at fifth passage.

3.3.2. Sample preparation and staining

We observed firstly the cell internal architecture with fluorescent microscopy, and particularly the α -SMA expression that constitutes the contractile thin filaments. We used fluorescent staining on fixed AoSMCs adhering to a CYTOO™ fibronectin coated chip (Fig. 3.1.B). All the fluorescent dyes and staining protocol are detailed in Appendix S3.1.

For the TFM tests, previously starved AoSMC (see subsection 3.3.1) were transferred in the 24-well plates containing ready-to-use hydrogels with different stiffness properties (Cell Guidance System, Softwell™ 24, collagen pre-coated, Softrack 0.2 μ m diameter microbeads labelled with yellow-green fluorescent dye) (Fig. 3.1.A). Then, we used 24-well plates of intermediary stiffness values: 4, 8, 12 and 25 kPa for our experiments. These hydrogels were made of a 400 μ m-thick layer of polyacrylamide, which was assumed to be linear elastic under the range of strains considered in our study. The gel dimensions (12mm diameter) were assumed to be infinitely large with respect to the cell size. Moreover, the collagen I coating added during the manufacturing process provides a ready-to-use physiological surface for cell adhesion and culture.

Cells were incubated in basal medium two days before TFM experiments, providing an amount of 10 000 per well which seemed not to saturate the gels. Two days were sufficient for a good spreading of SMCs, which adopted their specific elongated spindle shape. This shape was a good indicator of fully contractile SMCs, unlike synthetic ones, as they tend to exert traction forces along their length. That is the reason why we introduced the morphological criterion of “spindle-shapeness” that corresponds to the ratio between the wider part of the cell (around the nucleus) and its length. Cells at low passages (4-7) and cultured in basal medium tend to elongate more, making these specific conditions well suited for our TFM experiments.

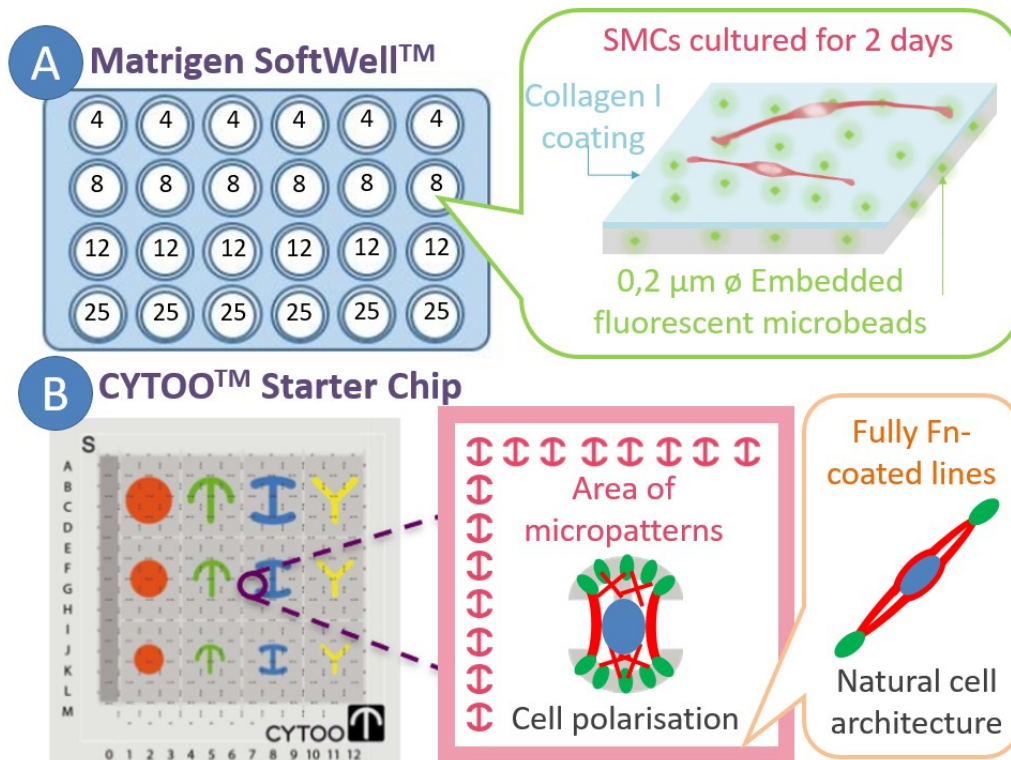


Figure 3.1 A) The Matrigen 24-well plate consists in 4 lines of 6 hydrogel samples with the same stiffness. The gels are delivered with a collagen I adhesive pre-coating and yellow-green fluorescent microbeads whose diameter is 0.2 μ m, B) The CYTOO chip is divided into several areas of fibronectin (Fn) adhesive micropatterns, where the cell architecture is constrained to polarize according to the shape of the pattern. Each area is surrounded by fully Fn-coated lines where the cells adhere with a natural shape.

3.3.3. Traction Force Microscopy (TFM) to measure SMC basal tone

Previously cultured gels were put under a Carl Zeiss Axio Observer.Z1 station with the Zen software while remaining incubated at 37°C, 5% CO₂ in a chamber. The gels were firstly imaged through the GFP (Green Fluorescent Protein) channel to adjust the focus on the fluorescent microbeads that are already labelled with a Yellow-Green fluorophore. Then we used the phase contrast channel to look at the cell morphology and orientations. The best magnification was obtained with the Plan-Neofluar 20x/0.4 objective, which resulted in a resolution of 0.323 μ m per pixel. This resolution was kept for all further data processing.

The method consisted in provoking SMC detachment from substratum using trypsin. The medium was first removed from the well and the cells were gently washed once with warm PBS, as some medium components tended to inhibit the trypsin effect. A little amount of PBS remained in the dish in order to keep the cells hydrated. The field of view of the objective allows for selecting an area of interest around 2-4 cells per well showing a clear spindle shape. Then the beads were imaged through the GFP channel that served also as a reference for the autofocus throughout the whole experiment. The autofocus enabled keeping the correct focus although other liquids were added to the medium. That was useful in our case when we added gently the trypsin solution at the third stage of the experiment. We paid attention not to touch the border of the well plate with the syringe, because any horizontal displacement could compromise the whole experiment. Then, the cells were let in trypsin until the end of the experiment. Normally, cells detached from the gels after a minute or two, and a deformation was observed in the gel with localized motions of the microbeads. The

positions of microbeads were tracked during 5 min with a frequency of 1 frame per 30s. Once the cells were detached by trypsin treatment, the well is not reusable. This process was therefore repeated on every well of the plate successively.

3.3.4. Traction force fields

3.3.4.1. *Extracting the experimental displacement fields*

After acquisition, images were processed using the Zen software for contrast adjustment of the GFP channel on the microbeads, and were exported in TIFF format. We chose to export individually images of both the phase contrast and GFP channels, the first one for locating the cells and the second one for measuring gel deformations. The latter was achieved with the Digital Image Correlation (DIC) method, which is based on maximization of a cross-correlation criterion between images in reference and deformed states. The DIC algorithm is detailed in Appendix S3.2.

3.3.4.2. *Generating theoretical displacement fields*

Green functions are the expressions of displacement fields for a concentrated force. Given their slender shape, contractile SMCs apply traction forces along their length axis, making an angle θ with the x axis of the global coordinate system. Actions in the z direction (normal to the surface of the gels) are also neglected. Therefore, the force vector may be written:

$$F(x_0, y_0) \begin{Bmatrix} \cos(\theta) \\ \sin(\theta) \end{Bmatrix} \quad (1)$$

where $F(x_0, y_0)$ is the unknown traction force applied at (x_0, y_0) . Videomicroscopy images of the phase contrast channel were used to estimate θ for each cell in our experiments. For any ROI, the displacement fields may be related to $F(x_0, y_0)$ with the Green functions such as:

$$\begin{Bmatrix} u(x, y) \\ v(x, y) \end{Bmatrix} = \begin{bmatrix} Gr_{xx}(x - x_0, y - y_0) & Gr_{xy}(x - x_0, y - y_0) \\ Gr_{xy}(x - x_0, y - y_0) & Gr_{yy}(x - x_0, y - y_0) \end{bmatrix} \begin{Bmatrix} \cos(\theta) \\ \sin(\theta) \end{Bmatrix} F(x_0, y_0) \quad (2)$$

where u and v are the displacement components at (x, y) , F_x and F_y are the force components for a concentrated force at (x_0, y_0) and Gr_{ij} are the Green function components.

Assuming plane strains and assuming that the Boussinesq theory for an infinite isotropic half-space (L.D. Landau & E.M. Lifshitz, n.d.) was relevant here (thickness of Matrigen's gel is about 400 μ m whereas adhesion forces are concentrated on surfaces of units of μ m²), we obtained:

$$Gr_{xx} = \frac{1+\nu}{\pi E} \left(\frac{1-\nu}{r} + \frac{\nu}{r^3} x^2 \right) \quad Gr_{xy} = \frac{1+\nu}{\pi E} \left(\frac{\nu}{r^3} xy \right) \quad Gr_{yy} = \frac{1+\nu}{\pi E} \left(\frac{1-\nu}{r} + \frac{\nu}{r^3} y^2 \right) \quad (3)$$

where $r = \sqrt{(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2}$, ν is the Poisson ratio of the gel and E is the Young's modulus.

3.3.4.3. Deducing the local traction force value

From every ROI, to find the traction force applied by a single cell (Fig. 3.2.A), we had to adjust the displacement fields predicted by the Green function against the experimental displacements obtained by DIC. As displacement fields may be subject to rigid body motions, we decided to work with strain fields (Fig. 3.2.B).

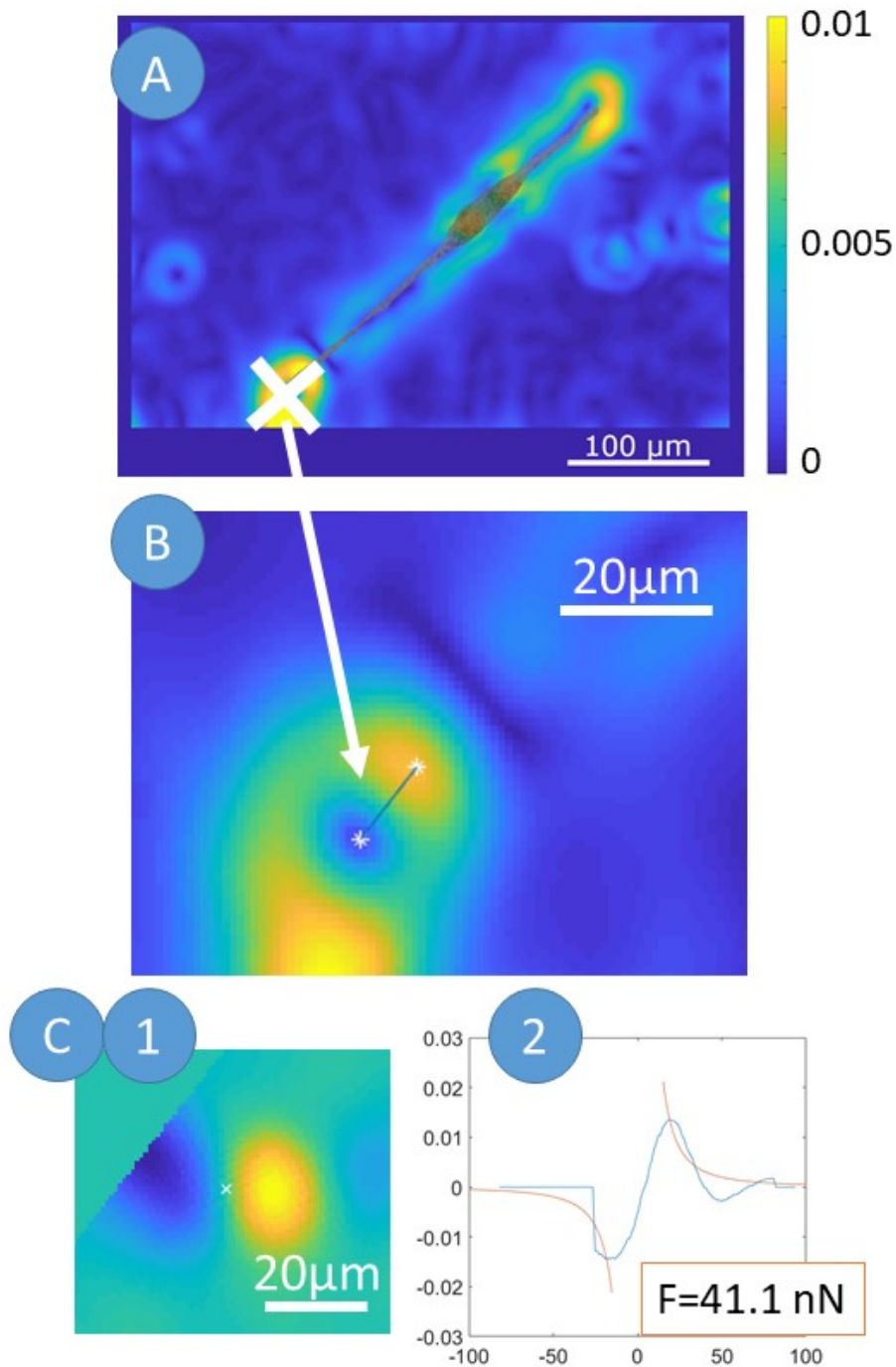


Figure 3.2 A) Image in phase contrast of a single cell binding to the gel, superposed on Von Mises Strain field EVM, measured after debonding of the same cell on a gel of stiffness 25 kPa (Microscope Axio Observer.Z1/7, Objective LD Plan-Neofluar 20x/0.4 Korr Ph 2 M27. Image size: 1040*1388 px). B) Zoom on the selected pattern, with selection of the center of the two

hotspots. Experimental (C.1) and theoretical (C.2) strain fields obtained by tracking the motion of fluorescent microbeads with DIC after debonding of AoSMC. Because C.2 has to be multiplied by the calculated force to obtain C.1 (eq. 4), the figures show normalized strain fields.

We performed a tensor rotation to express the strains in a rotated coordinate system where the first axis (direction 1) was aligned with the cell axis (θ direction) (Fig. 3.2.C.1). We derived the strain component $\overline{\varepsilon}_{11}$ (Fig. 3.2.C.2) resulting from a unit force by differentiation of Eq. 2 and adjusted it against the same strain ε_{11} component derived from DIC measurements (Fig. 3.2.C.1). Then, the traction force was obtained as:

$$F(x_0, y_0) = \frac{\sum_{n=1}^{N_{\text{ROI}}} [\varepsilon_{11}(x_n, y_n) * \overline{\varepsilon}_{11}(x_n, y_n)]}{\sum_{n=1}^{N_{\text{ROI}}} [\overline{\varepsilon}_{11}(x_n, y_n) * \overline{\varepsilon}_{11}(x_n, y_n)]} \quad (4)$$

where (x_n, y_n) denote all the pixels of the ROI, $1 \leq n \leq N_{\text{ROI}}$.

3.3.4.4. Model validation and verification

As our method was based on an analytical solution, we performed a validation using simulated data obtained with a 3D Finite Element (FE) model of the gels, on which we applied a concentrated force along the x direction.

The gel was modelled as a 5x5x0.4 mm³ parallelepiped in the Abaqus® software. A quadratic tetrahedral mesh was defined with refinement along the z direction and around the central point in order to have a sufficient resolution near the concentrated force. The mesh consisted of 425747 elements and 583726 nodes for the half parallelepiped (symmetric boundary conditions were assumed with respect to the x-axis).

The material was assumed to have a linear elastic behavior and to remain nearly incompressibility ($\nu=0.45$). Forces were applied in the (x,y) plane (upper surface of the gel), at the central node of the mesh. Then we interpolated the displacement values on a grid mimicking the pixel grid of experimental measurements. After deriving the strain fields, we applied Eq. 4.

We validated the use of the analytical solution with the FE model. We obtained deformation fields resulting from a local force of 200 nN with different orientations. In Table 3.1, we report the forces obtained from Eq. 4 with the data generated by these FE models. An excellent agreement with the true value of the force was obtained, showing that the plane strain assumption of the model used in Eq. 4 was valid.

Table 3.1: Traction forces obtained with FE simulated strain data for different orientations of the applied force.

Theta (°)	0	20	30	45	60	75	85	Mean
Force (N)	2.0306 x10 ⁻⁷	2.0243 x10 ⁻⁷	2.0268 x10 ⁻⁷	2.0064 x10 ⁻⁷	1.9958 x10 ⁻⁷	1.9969 x10 ⁻⁷	1.9856 x10 ⁻⁷	2.0095 x10 ⁻⁷

3.3.4.5. Statistical analysis

We performed statistical analysis on the TFM measurements from the 24-well plates. This sample format allowed to obtain the cell traction force values on 6 wells of each stiffness value (4, 8, 12 and 25 kPa), and to increase the number of measurements. We used a Mann-Whitney non-parametric test in order to compare the distribution of two independent samples, with different sample size. The null hypothesis is that data from the two tested populations are from continuous distributions with equal medians. We tested our four populations two by two successively and displayed the results as a boxplot using Matlab[®]. The significance was stated when the p-value remain inferior to 5%, namely when the null hypothesis is rejected at this significance level.

For this second series of experiments, we also examined the distribution of the traction force values according to each gel stiffness by plotting histograms in Matlab[®]. These histograms represented the probability according to ten classes of forces between 0 and 100 nN. Then, we fitted them with an exponential law such as:

$$y_{model} = \lambda e^{-\lambda x} \quad (5)$$

where x represents a random variable and y is its distribution, while λ is a parameter to be determined, which corresponds to a simplification of the motor-clutch model (eq.8, eq.9)

The experimental data were fitted using the Levenberg-Marquardt algorithm in Matlab[®]. More specifically, the fitting algorithm was applied between the experimental data x_{exp} and y_{exp} , respectively central position of each bar of the histogram and its related probability. Then, after identifying the optimal λ parameter, the results yielded the theoretical x_{mod} for every traction force value x_{exp} .

3.4. Results

3.4.1. SMC morphology

The morphology of AoSMCs showed a pronounced uniaxial spindle-shape with low mean cellular area on the hydrogels coated with collagen (Fig. 3.3.A). Conversely, a non-elongated shape and large mean cellular area would indicate a hypertrophic morphology, characteristic of the synthetic phenotype (Timraz et al., 2015). The spindle-shapeness was measured on 120 cells used in the TFM experiments. The mean value, standard deviation, minimal and maximal values are gathered in Table 3.2 below.

Table 3.2: Mean value, standard deviation, minimum and maximum

Mean	StD	Min	Max	N
0.0719	0.0332	0.0126	0.2824	120

On the CYTOO[™] chips, SMCs still presented in most cases an elongated shape and were randomly spread on the fully fibronectin coated line of the chip (Fig. 3.3.B). But SMCs also tended to spread naturally in other directions depending on the pattern of fibronectin coating (Fig. 3.3.B). On CYTOO[™] micropatterns, the cell could not develop focal adhesions out of the fibronectin coating due

to the cytophobic PEG coating out of the fibronectin. Fluorescent imaging of these cells allowed to superimpose the two actin isoforms namely F-Actin and α -SMA and showed that the α -SMA specific isoform of SMCs was concentrated into long thin fibers all along the cell length (Fig. 3.3.B). The F-Actin was dispersed into the whole cell volume and defined the cell shape (Fig. 3.3.B). The CYTOO™ chips remain useful even if they have not the same stiffness than the hydrogels, because we do not use them for quantitative mechanical measurement, but for cell component localization, cell polarization, and for assessment of the α -SMA expression in SMCs adhering on a 2D environment. The main advantage of the CYTOO chip is to provide different mechanical environments, and we can observe the polarization of its cytoskeleton according to each of them. The aim is to show that the SMC's cytoskeleton is particularly dense around the focal adhesion at the ending parts of the cell, and forms long stress fibers concentration at each side of the cell. On the hydrogels, the cells freely adhere to the collagen coating, and we can make a parallel with CYTOO results in order to localize the cell components.

In the following, TFM experiments have been achieved only on AoSMCs adhering to hydrogels coated with collagen. These SMCs were artificially detached from the collagen by a trypsin treatment, which removed the traction forces they exerted on the gel initially. These forces were localized on the focal adhesions and oriented according to the direction of the α -SMA thin filaments (See subsection 3.3.2).

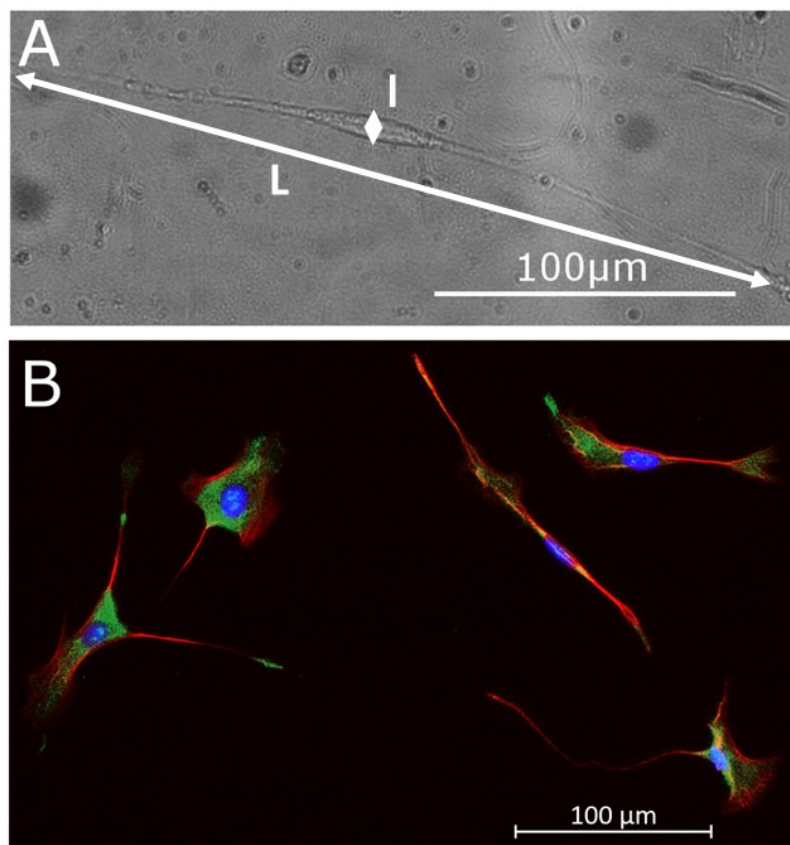


Figure 3.3 Observation of cell morphology and internal architecture for human aortic SMCs (AoSMC, Lonza). The cells were observed in phase contrast on a soft hydrogel (A) The cells were observed with fluorescent microscopy on a CYTOO™ fully coated line (B). The spindle-shapeness corresponds to the ratio between the wider part of the cell (I) and its length (L) on uniaxial SMCs.

3.4.2. First TFM experiments with trypsin forced-detachment

We showed in Fig. 3.2.B typical strain patterns obtained after AoSMC forced-detachment due to trypsin. It can be noticed that the patterns showed two hotspots of strain around each focal adhesion, each hot spot being nearly semicircular. One hotspot is blue and relates to the gel under compression, whereas symmetrically, the other hotspot is red and relates to the gel under tension. If we plot a line joining the center of both associated hotspots, we notice it is aligned with the AoSMC, confirming that traction forces are well aligned with the AoSMC main axis.

Applying Eq. 4 onto these strain fields, we could measure the traction forces on gels of different elastic moduli (from 0.5 to 50 kPa).

We noticed during previous experiments that gels with very low stiffness, such as 0.5, 1 or 2 kPa, presented several cracks after cell seeding, as shown in Fig. 3.4.A. That was not the case for the gels over 4 kPa (Fig. 3.4.B). These cracks disturbed the uniform distribution of the fluorescent microbeads and could induce artifacts in force assessment. Conversely, the stiffest gel (50 kPa) presented lower deformations due to their stiffness, resulting in lower signal to noise ratios for the DIC method. AoSMC seem to have higher traction forces compared to fibroblasts (10-30nN), but globally smaller than cardiomyocytes (70nN) previously tested on 12 kPa substrates by Balaban et al. (Balaban et al., 2001). AoSMCs also revealed smaller traction forces than stem cells (0-200nN (Heo et al., 2017)) but higher than neurons (0.01-10 nN (Athamneh and Suter, 2015)) for instance. In fact, the cells adapt to the stiffness of their substrate, and stem cells tend to differentiate into neurons-like cells on substrates that have an elastic modulus close to those of the brain (0.1-1kPa) or myoblast-like on intermediate stiffness (around 17kPa) (Heo et al., 2017). This may explain why gels with low stiffness properties, far from the natural stiffness of arteries, were inappropriate here for AoSMCs.

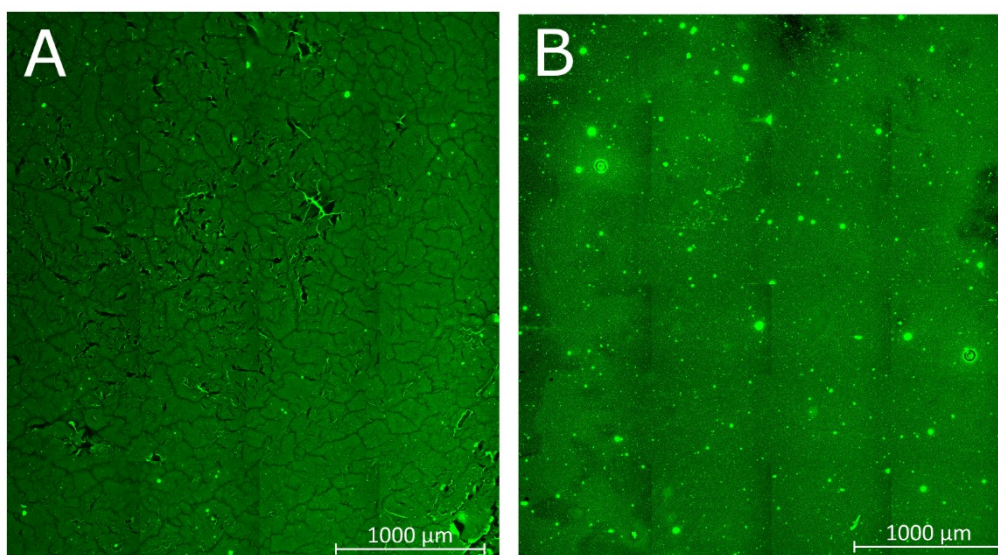


Figure 3.4 The most compliant gels (0.5, 1, 2 kPa, (A): 0.5kPa) presented several cracks after cell seeding, but not the stiffest gels (from 4 to 50 kPa, (B): 25 kPa). Microscope Axio Observer.Z1/7, Objective Ec Plan-Neofluar 10x/0.30 Ph1. These images consist in 25 tiles each, which are merged by postprocessing in the Zen 2.3 Software. The black lines are due to a difference of exposure on the different tiles.

Finally, this first analysis showed that optimal measurements of adhesion forces could be obtained for gel stiffness varying in a range between 4 kPa and 25 kPa. That is the reason why we chose this range of stiffness values for the design of the well plates.

A statistical analysis was performed for these experiments on the intermediate stiffness values (4, 8, 12 and 25 kPa) of the well plates. For each of the wells, we measured the adhesion forces for about 1 to 4 cells. For each cell, N measurements were achieved, where the displacement field showed the specific traction/compression pattern, namely at the anchorage points of the cell that have been affected efficiently by the trypsin. We plotted the traction force values individually according to each stiffness value, and the distributions are compared thanks to the Mann-Whitney non-parametric test. These results are given in Fig. 3.5 below.

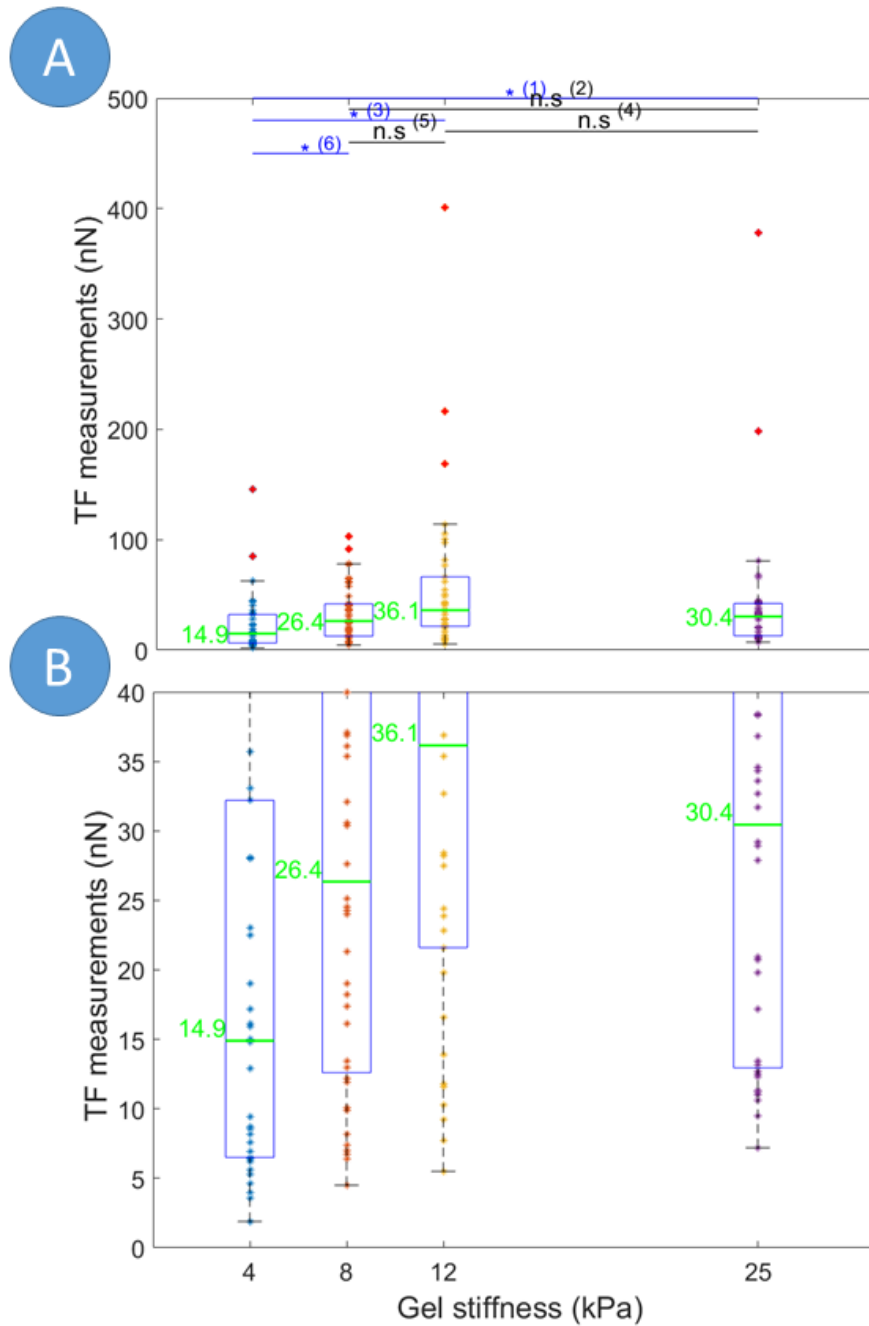


Figure 3.5 Cell traction force (TF) values obtained for different gel stiffness (4, 8, 12, and 25 kPa) on 24-well plates for 0-500 nN range (A) and 0-40 nN (B). 38, 44, 38, and 36 measurements were performed respectively on different focal adhesion sites and a number of cells between 1 and 4 per well. Significance was found using a Mann-Whitney test for (1), (3) and (6). Corresponding p-values: (1) 0.0045, (2) 0.6989, (3) 0.0001, (4) 0.1614, (5) 0.0727, (6) 0.0099. Significance level: * $p < 0.05$, n.s.: non-significant. Median value is reported on the green horizontal bar.

3.4.3. Measurement of cell traction force

Three 24-well plates containing 6 wells of each stiffness values (4, 8, 12, 25 kPa) were used to measure AoSMC adhesion. For each of these wells, we measured the adhesion forces for about 1 to 4 cells depending on their location. For each stiffness value, we could finally evaluate the traction forces for a number of cells varying between 36 and 44.

For some of them, we chose several measurement points on the same cell, considering different points where the unbinding focal adhesion led to a clear traction-compression pattern. Results are reported in Appendix S3.1 (Table S3.1). There is a rough increase of mean adhesion forces with the stiffness, although the mean force value for 8kPa is very close to the one of 25 kPa. Moreover, standard deviations are relatively large and the difference of adhesion forces between each stiffness are not significant.

Histograms of the adhesion forces highlight the variable behavior of adhesion forces (Fig. 3.5). The distribution is an exponential distribution. Depending on the stiffness, between 5% to 45% of cells have adhesion forces below 10 nN, (Table 3.3 below) but a fraction between 5% to 16% of them have adhesion forces that can go up to 100 nN. For the most compliant substrate, the fraction of lower forces is significantly higher than other stiffness values. On the contrary, the fraction of higher forces is maximal for the 12 kPa stiffness. As the adhesion forces do not follow a normal distribution, it is not possible to analyze the means in Table S3.1 to compare the different stiffness properties.

Table 3.3: Fraction of traction force values under 10 nN and up to 100 nN for each substrate stiffness

	4 KPA	8 KPA	12 KPA	25 KPA
F < 10 NN	44.7 %	18.2 %	7.9 %	5.6 %
F > 100 NN	2.6 %	2.3 %	15.8 %	5.6 %

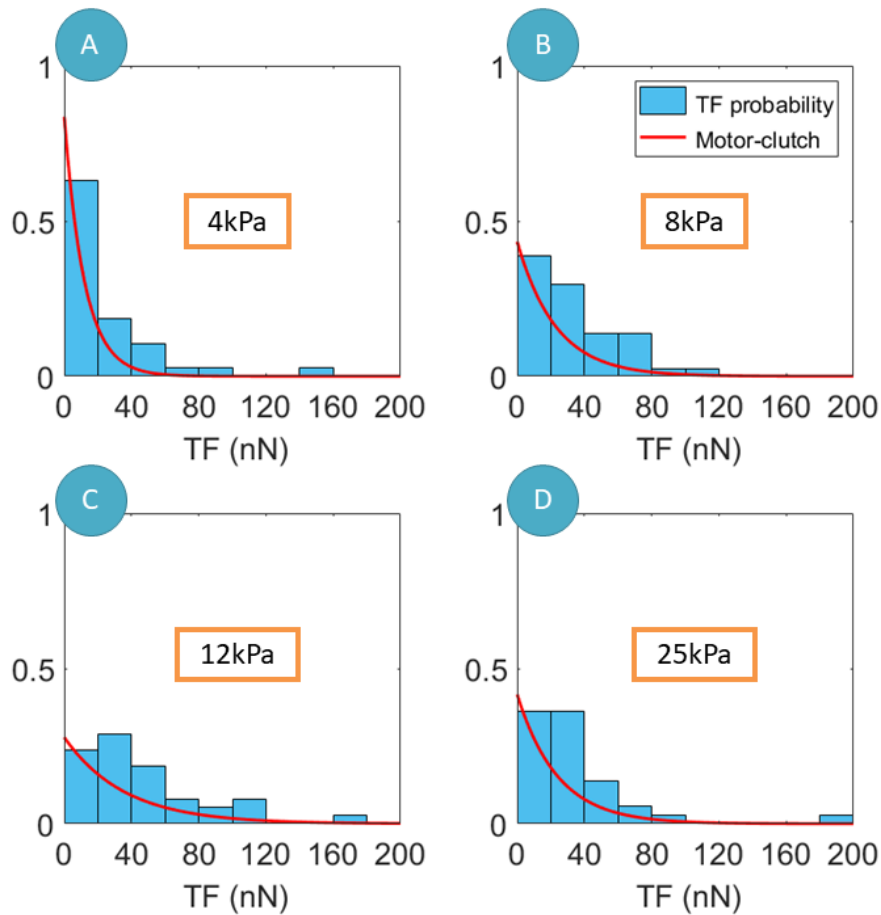


Figure 3.6 Histograms showing the probability distribution of the measured traction forces (TF) for each stiffness value: A) 4kPa, B) 8kPa, C) 12kPa, D) 25 kPa (width of each bar: 10 nN). The red curves represent the fitted exponential motor-clutch model.

By fitting the distribution of adhesion forces with an exponential function (Fig. 3.6), we identified the λ parameter of Eq. 5 for each stiffness. Values are reported in Table 3.4 below.

Table 3.4: Fitting coefficient according to the substrate stiffness.

Stiffness (kPa)	λ
4	0.8362
8	0.4336
12	0.2784
25	0.4166

It can be noticed that the λ parameter decreased for stiffness varying between 4kPa and 12kPa. This is in agreement with histograms showing that the distribution shifted progressively from lower to higher adhesion forces when the stiffness was increased until 12 kPa. In other words, when the stiffness increased, the fraction of cells having adhesion forces lower than 10 nN was decreased. However, the fraction of forces higher than 100 nN is not significantly different except for the 12 kPa hydrogels. These results showed that the substrate stiffness impacted significantly the adhesion forces of AoSMCs. Globally, higher adhesion forces were obtained for the 12 kPa substrate.

3.5. Discussion

3.5.1. Preserving the contractility of SMC

In the current study, we studied the contractile behavior of AoSMCs from human primary culture delivered at third passage and used at passages 5 to 7. This range of passages did not affect significantly the cell contractility as shown in a previous study from Murray et al. (Murray et al., 1990). All conditions ensured sufficiently fresh and healthy cells (i.e. not from too many subdivisions) to generate a significant contractility.

SMCs may be subject to phenotypic switch (Raines and Ross, 1993; Stadler et al., 1989; Thyberg et al., 1997), from contractile to synthetic which is the phenotype of early aortic development (Reusch et al., 1996; Thyberg et al., 1990; Tran et al., 2006). Consequently, we avoided phenotypic switching by adapting the cell culture conditions. More specifically, we followed the supplier's instructions for cell culture in order to preserve the maximal contractile abilities of the cells, using a differentiation medium containing low FBS and heparin. If both the heparin (Rubbia and Gabbiani, 1989; Tran-Lundmark et al., 2015) and the serum starvation have an influence on the cell quiescence, only the starvation affects its contractility (Ma et al., 1998; Wanjare et al., 2013a). This is a crucial point for mechanical experiments on single SMC.

Good indicators for a well-preserved contractile behavior of AoSMCs were also their clear spindle-shape on hydrogels and the high expression of specific actin isoform α -SMA (Timraz et al., 2015) under the shape of long thin filament all along the cell length. These filaments are well known for their high contractility and are present only in cell types that need to contract strongly in the human body, like myofibroblasts and SMCs (Anderson et al., 2004; Chen et al., 2007; Goffin et al., 2006b)

We have found a significant effect of the substrate stiffness on the adhesion forces generated by cells and measured using TFM. Under stress free conditions, normal aortic walls have a stiffness around 40 kPa and increase until 110 kPa in atherosclerosis (Sazonova et al., 2015). The stiffness can reach several MPa in pressurized arteries. Therefore, the Matrigen™ substrates used in our study, having elastic modulus in the range 0.5 to 50kPa, are more compliant than a normal aortic wall. However, it is difficult to extrapolate *in vivo* conditions to 2D *in vitro* culture and we found that AoSMCs showed the most interesting stiffness dependence between 4 and 25 kPa.

Not only the stiffness is important but also the composition of the substrate (binding proteins), with respect to cell adhesion. We have used pre-coated gels with type I collagen. The cells seemed to keep a very elongated shape on this type of coating. Previous studies have interpreted the SMC spindle shape as a preservation of its contractile phenotype (Raines et al., 2000; Rzucidlo, E. M. et al., 2007). Other studies highlighted the diversity of SMC responses depending on the type of binding proteins used in the substrate, such as fibronectin or laminin (Hedin et al., 1988; Roy et al., 2002; Thyberg et al., 1997). If the fibronectin is mainly present in the ECM of blood vessels during early development and seems to induce SMCs proliferation, migration and ECM synthesis (Reusch et al., 1996; Thyberg et al., 1990), the laminin is required further for SMCs maturation towards a contractile phenotype (Tran et al., 2006). Fibrillar type I collagen is naturally present in the media (Raines et al., 2000) and SMCs

tend to align along collagen fibrils (Wagenseil and Mecham, 2009). Collagen seems to reduce the cell proliferation on softer gel (25 kPa) relatively to stiffer one (135kPa) or soft gel coated with laminin (Sazonova et al., 2015). SMCs also tend to align naturally with the direction of maximum principal stress (Fujiwara and Uehara, 1992; Humphrey, 2002; Wagenseil and Mecham, 2009). Moreover, another study has already investigated the regulation of the focal adhesions on type I collagen in response to a vasoactive agonist (Hong et al., 2015). Hence, since we tried to define suitable biological conditions to preserve SMC contractility, type I collagen coating remains relevant for TFM experiments. Further investigations could consider gels with fibronectin or laminin instead of simply collagen I. We did some preliminary tests of ASMC culture on fibronectin, which showed multidirectional spreading of SMCs (Fig. 3.2.b), tending to confirm that fibronectin may promote phenotypic switching towards synthetic SMCs (Hedin et al., 1988; Roy et al., 2002; Thyberg et al., 1997; Tran et al., 2006).

Another important aspect of our experiments is the highly photosensitive behavior of AoSMCs (Gomer et al., 1988; Megson et al., 1995). Even when not exposed to bright light, they have demonstrated the same effect with fluorescent light on Hoescht channel (Andrews et al., 2003; Megson et al., 1995). And since the Hoescht stain of the nuclei requires an UV excitation wavelength, TFM experiments will always induce some damage to exposed SMCs. A special attention was paid to avoid exposing twice the same area in successive experiments.

3.5.2. Traction force measurements

The measured adhesion forces are lower than previous TFM data on vascular SMCs (Balasubramanian et al., 2013; Sazonova et al., 2015), in the range of 1-10 μ N. Nevertheless, previous data were not obtained on individual cells, but from a population of them. Interestingly, we can relate these traction force values to those from the study of Balaban et al. (Balaban et al., 2001), which revealed force values of 10-30 nN for a single focal adhesion in human fibroblasts and 70 nN for cardiac myocyte when tested on 12 kPa substrates. They also mentioned that the orientation of the force was correlated with that of the focal adhesion and actin fibers. But the range of measured forces strongly varies with the experimental conditions and measurement method, as a 100-400nN range was also reported for fibroblasts (Tong et al., 2016), and 10-800nN for cardiomyocytes (Hersch et al., 2013). In the work of Tan et al. (Tan et al., 2003b) on bovine airway SMCs, traction forces were in a 10-60 nN range per adhesion site on a single fibronectin-coated post. But instead of removing the cells completely as we did in our study, they chose to disrupt components of the actin-myosin cytoskeleton or to stimulate its contraction by drug inducing.

As we measured traction forces on a relatively large number of cells, two major interesting observations could be drawn:

1. traction forces are variable and show an exponential distribution, with 5% to 45% of traction forces in the range 0-10 nN, and 2% to 16% up to 100 nN.
2. They depend on the substrate stiffness. The fraction of adhesion forces below 10 μ N tend to decrease when the substrate stiffness increases, whereas the fraction of higher adhesion forces increases until 12 kPa, where it reaches a maximum.

These two aspects (variability and stiffness dependent) and these distributions of cell adhesion are well predicted by the motor-clutch model of Chan & Odde (Chan and Odde, 2008). Molecular

clutches are the binding proteins constituting the focal adhesion. For every actin filament of the cytoskeleton, which is bound to the substrate, there is a traction force exerted through the myosin molecular motor onto the substrate via the associated clutch. In other words, molecular clutches link F-actin to the substrate and mechanically resist myosin-driven (motor) F-actin retrograde flow. When the binding fails, the traction force of the clutch comes to zero as shown in Fig. 3.7.

The variable behavior comes from the thermally activated kinetics of the clutches combined with the myosin-driven F-actin retrograde flow. We assume this flow is maintained at a constant speed v (Fig. 3.7). As explained by Chan & Odde (Chan and Odde, 2008), the time it would take from clutch association until the adhesion force F is reached would write:

$$\Delta t = \frac{F}{k v} \quad (6)$$

Where k is the stiffness of the substrate. As Δt is inversely proportional to k , the smaller the stiffness, the larger Δt .

The probability of survival of a bond over a duration Δt would write:

$$P(\Delta t) = \frac{1}{T_{off}} \exp\left(-\frac{\Delta t}{T_{off}}\right) \quad (7)$$

Where T_{off} is the lifetime of the bond.

Then combining Eq. 7 and Eq. 8, the probability to be able to reach an adhesion force F is given by:

$$P(F) = \frac{1}{k v T_{off}} \exp\left(-\frac{F}{k v T_{off}}\right) \quad (8)$$

This equation could be simplified and used as an exponential law as shown in eq.5, by taking:

$$\lambda = \frac{1}{k v T_{off}} \quad (9)$$

Eq. 10 shows that the probability of adhesion forces is going to satisfy an exponential distribution and that it depends on the stiffness of the substrate, exactly as observed in our experiments.

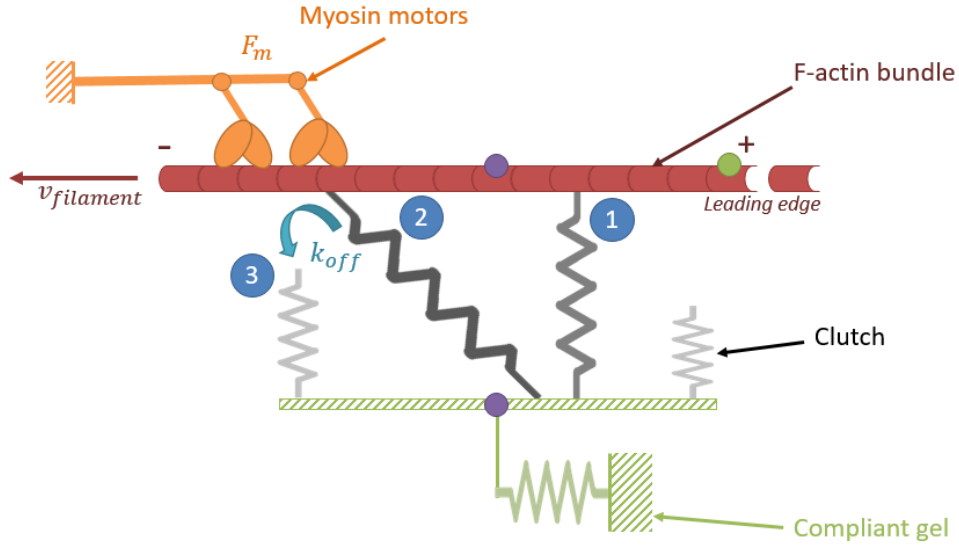


Figure 3.7 Schematic representation of the motor-clutch model. Once engaged (1), the clutch undergoes a load (2) and fail (3) cycle. The frequency of unbinding is named k_{off} .

However, in the experiments, we observed that for stiffness increasing between 12 to 25 kPa, the change was not as significant as for stiffness increasing between 4 to 8 kPa for instance. This may be due to the fact that generally T_{off} is not a constant but it depends on the force. Indeed, according to Isabey et al. (Isabey et al., 2016), the lifetime of a bond may be written such as:

$$T_{off} = T_0 \exp\left(-\frac{F}{F_0}\right) \quad (10)$$

In other words, the rate of dissociation increases exponentially with the bonding force. Clutches with high forces have a very short lifetime. This effect may become significant for larger stiffness and should be investigated further.

3.5.3. Limitations

Cell traction force values have to be assessed carefully, because they strongly depend on the TFM process, namely the chosen scale and mechanical assumptions. The work of Zündel et al. (Zündel et al., 2017) focused on the scale of the single focal adhesion and highlighted the results are misestimated when assuming a linear elastic substrate and neglecting the out-of-plane effects. They suggested to think about another way to characterize the mechanical behavior of the substrate, including the non-linearity, which seemed to improve the robustness of the reconstruction of the focal adhesion forces at this very high resolution. Our results may be immune to these artifacts as our study focuses on the cellular scale (i.e. several focal adhesions at the same measurement point), but in that case we have to keep in mind that we did not measure individual traction force values of each focal adhesion, but more the global SMC traction forces.

Moreover, for our current algorithm, we used the Boussinesq solution to model the theoretical displacement fields. Since the Boussinesq solution is valid for a half space, the study of Yang et al. showed it is less efficient for a thin plate (Yang, 2011). In our case we proved with a 3D finite-element

model that the Boussinesq solution was satisfactory, but the finite-element model considered the effect of a nodal force and not of a real SMC pulling on the gel. This could be refined in the future for a more thorough validation.

Another limitation is related to the analysis of single isolated cells. Cell to cell interactions may be important in arteries but they are not considered here. Moreover, extrapolation traction forces measured on 2D gels to 3D is very challenging and will require further work in order to represent the full 3D nature of cellular forces within the real ECM (Legant et al., 2013).

The type of coating could also have an influence on the phenotypic switching of the SMCs. In fact, the fibronectin tends to increase a change toward synthetic phenotype, but not the laminin (Thyberg et al., 1997; Timraz et al., 2015). But for collagen I, the density of the coating seems to influence the cellular area, which is reduced for high concentration of collagen I (Timraz et al., 2015). Consequently, the use of fully pre-coated gels with collagen I correlates with the spindle shape we observed for our cells during TFM experiments. However, for our observation of the cellular architecture on fibronectin coating, we should compare our results on a laminin coating. Nevertheless, since the CYTOO™ protocol requires few hours between seeding and fixation steps, the phenotypic change may have not the time to occur. We have to compare our results with unhealthy cells (that are suspected to be synthetic and so to involve a decreasing α -SMA expression). In this case, a change in α -SMA expression for the same fibronectin coating would be sufficient to show that the cells had not enough time to differentiate on a CYTOO™ chip.

Finally, although we measured the traction forces for about 50 cells, the distribution of traction forces versus the gel stiffness would probably show significantly more consistent patterns if we had analyzed at least 500 cells, to increase the number of measures for each bar of the histogram. However, our experiments did not permit to achieve such sample size in a reasonable time and we believe that current results already show highly interesting trends despite the small sample size.

3.6. Conclusion

The contractile behavior of SMCs being an important determinant of growth, remodeling, and homeostasis in the aorta, we applied a TFM technique to measure traction forces of individual human aortic SMCs. The two major results were that: 1. SMC traction forces are variable and show an exponential distribution, with 5% to 45% of traction forces in the range 0-10 nN, and 2% to 16% up to 100 nN. 2. They depend on the substrate stiffness: The fraction of adhesion forces below 10 μ N tend to decrease when the substrate stiffness increases, whereas the fraction of higher adhesion forces increases until 12 kPa, where it reaches a maximum.

As these two aspects (variability and stiffness dependence) and the distribution of traction forces can be predicted by the probabilistic motor-clutch model, we conclude that this model could be applied to predict the basal tone of SMCs. Further studies will consider stimulated contractility and primary culture of SMCs extracted from aneurysmal human aortic tissue in order to test the possible generalization of the motor clutch model to the diverse SMC states and to detect potential mechanobiological dysfunctions of aneurysmal SMCs.

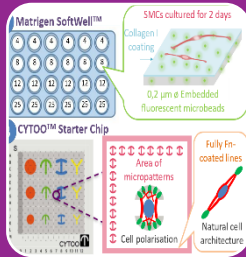
4. Conclusion

Cette première étude expérimentale a permis d'établir une base commune pour la caractérisation comparée de CML saines et anévrismales. Le protocole ainsi défini peut être repris pour être étendu à l'étude de CML issues de cultures primaires. En effet, la lignée Lonza est extraite d'un sujet jeune (femme, 30 ans), peu représentatif de la réalité face à des échantillons d'anévrismes récupérés généralement sur des patients plus âgés (60-80 ans).

Par ailleurs, ces premiers résultats de mesure ont été corrigés par rapport à la version initiale publiée dans MCB, suite à des améliorations dans le traitement de données issues de la microscopie à fluorescence. Une des améliorations concerne la suppression du pourtour du point d'application de la force avant de comparer le champ théorique avec le champ expérimental, car la solution de Boussinesq n'est pas fiable pour modéliser le champ de contraintes sur cette région.

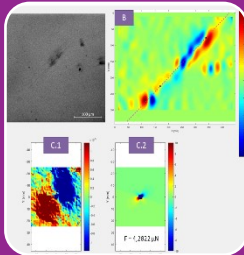
Le **Chapitre 4** reprend donc la base du protocole établi dans ce chapitre avec les améliorations nécessaires, et présente l'étendue de cette application à une plus grande population de données, comprenant plusieurs lignées saines et anévrismales d'âges et de genres correspondants. Ces lignées ne seront donc plus commandées auprès d'un fournisseur, mais directement extraites d'échantillons aortiques, afin de s'approcher de la réalité des cellules impactées par le vieillissement naturel ou par une pathologie.

Etablissement d'un protocole de culture et d'acquisition



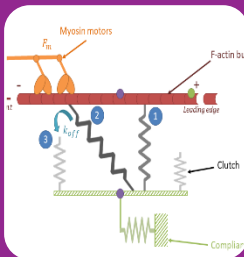
- Culture des CMLs en deux temps : prolifération et différenciation
- Familiarisation avec la manipulation des CML aortiques humaines
- Détermination du type de substrat nécessaire, avec les caractéristiques souhaitées (rigidités 4, 8, 12 et 25 kPa, revêtement de collagène, microbilles fluorescentes)
- Protocole d'acquisition du déplacement des billes en microscopie à fluorescence suite au décollement des CMLs par trypsinisation
- Un protocole simple pour la caractérisation du tonus basal des CMLs

Mesure des forces de traction à l'échelle cellulaire



- Digital Image Correlation (DIC) pour l'obtention des champs de contraintes principales (on travaille ensuite avec le champ E11)
- Génération d'un champ théorique à base de la solution analytique de Boussinesq
- Comparaison des champs expérimental et théorique
- Calcul de la force ponctuelle associée par minimisation de l'écart
- Données obtenues pour 30 à 50 cellules par rigidité

Modèle "motor-clutch" et réponse contractile de la CML



- Les valeurs de forces de traction sont variables entre les cellules
- Elles varient également avec la rigidité du substrat
- Leur distribution suit un modèle exponentiel décroissant
- Les trois points précédents peuvent être prédits par le modèle "motor-clutch"
- Il s'agit d'un modèle probabiliste, qui se rapproche de la réalité de la dynamique de l'adhésion cellulaire au cours de la contraction : il existe un remodelage des adhésions focales qui cèdent et se recréent successivement
- Ce modèle pourrait être généralisé aux CMLs anévrismales et évoluer vers une détection des défaillances cellulaires en cas de pathologie.

CHAPITRE 4

Comparaison de la contractilité des CML saines et anévrismales

Petit, C., Karkhaneh Yousefi, A.-A., Ben Moussa, O., Michel, J.-B, Guignandon, A., Avril, S., Regulation of SMC traction forces in human aortic thoracic aneurysms. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology (BMMB)* (2021). 20,717-731.

1. Introduction

Ce chapitre vient enrichir le volume de données expérimentales de cette thèse, en présentant les mesures des forces de traction de CML saines et anévrismales. Au total, 759 mesures sont prises sur trois lignées anévrismales et trois saines, pour des donneurs d'âges et de genres correspondants. L'objectif est d'apporter à la communauté scientifique une première population de données quantitatives à propos de CML aortiques humaines, et de comprendre les variations induites par la pathologie sur la réponse contractile. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le journal *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology (BMMB)* en 2020, qui servira de base au développement de ce chapitre.

2. Résumé de la publication

L'Anévrisme de l'Aorte Thoracique Ascendante (AATA) reste parmi les pathologies cardiovasculaires les plus critiques, puisqu'elle entraîne une fragilisation de la paroi aortique et donc un risque accru de dissection ou de rupture. A l'heure actuelle, le critère de décision pour ordonner une réparation chirurgicale demeure le diamètre aortique, mesuré par CT-scan. Néanmoins, plusieurs cas de rupture ayant été constatés en-dessous de la limite fixée à 55mm, la mécanobiologie semble également à prendre en considération dans l'évaluation du risque de rupture.

De plus, comme énoncé dans le **Chapitre 2**, la défaillance des processus de mécanosensibilité et de mécanotransduction cellulaire semble jouer un rôle majeur dans l'apparition et le développement de l'AATA. Les causes répertoriées de la formation d'un AATA, à savoir les mutations génétiques, et les modifications hémodynamiques ou biomécaniques au sein de l'aorte, affectent la réponse contractile cellulaire. Les CML ont en effet la particularité de pouvoir changer de phénotype afin de réparer le tissu qu'elles perçoivent comme étant défectueux. Les CML dites synthétiques servent à bâtir le tissu aortique dans les premiers stades du développement, mais à l'âge adulte, leur présence est un signe de défaillance, car les CML matures présentent un phénotype contractile et

quiescent. Le phénotype synthétique conduit notamment à une perte de contractilité, qui en cascade affecte les propriétés mécaniques du tissu à court terme (baisse du tonus basal), comme à plus long terme (modification permanente de la rigidité tissulaire suite au remodelage induit par les CML synthétiques). Ces conséquences ont pour effet de se répercuter en retour sur la mécano-sensibilité des CML, et le phénomène engendre un cercle vicieux dont il est difficile de sortir pour retrouver l'équilibre biomécanique initial du tissu aortique.

La quantification de cette éventuelle régulation du comportement contractile de CML aortiques humaines, qui sont par ailleurs issues de cultures primaires à partir d'échantillons d'AATA, semble ne pas avoir été documentée par de précédentes publications. Cette présente étude présente par conséquent un ensemble de données quantitatives unique à propos du tonus basal des CML saines et anévrismales, issues de donneurs d'âges et de genres correspondants. La méthodologie décrite dans le **Chapitre 3** demeure la même, à l'exception d'une amélioration apportée à la partie modélisation, où le modèle analytique ne s'avérait pas performant pour modéliser correctement la zone du pourtour du point d'application des forces de traction cellulaire. Cette zone est donc exclue de l'analyse, afin d'augmenter la fiabilité du code de calcul des forces de traction.

L'apport principal de ce chapitre par rapport au précédent, est de présenter l'utilisation de lignées cellulaires plus représentatives de la réalité, pour mieux comprendre les défaillances éventuellement observées chez la CML face au vieillissement naturel ou à la pathologie. Dans ce sens, nous utilisons dans cette étude 3 lignées d'origine anévrismale, et 3 lignées issues de donneurs sains, d'âges et de genres correspondants afin de s'affranchir des effets de ces paramètres. Les lignées anévrismales sont développées sur place au laboratoire, suite à l'isolement de la media sur des échantillons d'AATA issus d'une chirurgie réparatrice, et à l'extraction des CML par digestion enzymatique des composants de la MEC, et par filtration. Les lignées saines proviennent de la biobanque de l'Hôpital Bichat (INSERM U1148, Bichat Hospital, Paris, France), mais sont extraites selon le même protocole.

Les protocoles expérimentaux de culture cellulaire, de préparation d'échantillon, et de mesure restent identiques au **Chapitre 3**. La partie modélisation des résultats de forces de tractions repose également sur le modèle motor-clutch, pour lequel l'étude propose une variation des paramètres principaux afin de prédire la dépendance des résultats médians à la rigidité du substrat pour les lignées saines et anévrismales. Les paramètres étudiés pour la simulation sont le nombre de moteurs activés et de clutches engagés sur le substrat, notés n_m et n_c , et les taux d'engagement k_{on} et de désengagement k_{off} des clutches liés au substrat.

En termes de résultats, la distribution des forces de traction suit globalement une loi exponentielle, de la même manière que les résultats précédemment obtenus sur la lignée commerciale de chez Lonza (**Chapitre 3**). Des variations inter-individuelles apparaissent entre les différentes lignées, même au sein des groupes sains ou anévrismaux sur le même substrat. Globalement, le tonus basal médian des CML semble significativement plus élevé sur les rigidités les plus importantes. Par ailleurs, les CML anévrismales paraissent exercer plus de force sur la même rigidité que les saines, dont les valeurs médianes restent entre 30-70 nN. Les lignées anévrismales 2 et 3 sont particulièrement au-dessus, avec des valeurs médianes atteignant 100 nN, voire même 300 nN pour le substrat de rigidité 12 kPa. Ce maximum établi à cette rigidité se retrouve également pour la lignée commerciale de chez

Lonza précédemment étudiée. Toutefois, étant donné que ces mêmes lignées proviennent de donneurs présentant des défaillances de la valve aortique, la piste des modifications hémodynamiques induites par cette particularité peut également expliquer ces forces de traction significativement plus élevées que chez les autres lignées.

Un certain nombre de résultats sont disponibles en suppléments afin de montrer la dépendance du tonus basal médian à la rigidité du substrat, et la distribution des valeurs de force les plus faibles et les plus hautes. Les résultats principaux comme supplémentaires proposent une grille de lecture d'un volume de données conséquent, pour un premier apport de données quantitatives à propos du tonus basal des CML aortiques saines et anévrismales.

Un autre type de résultat est également abordé dans ces travaux, à savoir une comparaison morphologique et architecturale des CML saines et anévrismales. En effet, tandis que les CML saines ont tendance à adopter une morphologie très allongée et uniaxiale, les anévrismales se sont montrées plus élargies et multipolaires, avec des extensions membranaires plus larges. Cette observation permet de pressentir que l'augmentation des forces de traction chez les CML anévrismales pourraient être liées à cette différence morphologique. De plus, les CML anévrismales pourraient adopter le comportement de cellules sénescentes. Par conséquent, les CML anévrismales semblent maintenir une rigidité plus importante sur leur substrat. Puisque les myofibroblastes modulent leurs forces de traction en fonction de leur réponse synthétique, cette particularité des CML anévrismales pourrait témoigner d'un changement de phénotype, ou du moins d'une reprogrammation cellulaire. Ainsi, les CML anévrismales en viendraient à réguler leur réponse contractile en raison d'une défaillance dans leurs processus de mécanosensibilité et de mécanotransduction.

Ces travaux expérimentaux présentent certaines limites, principalement en raison de la reproduction largement imparfaite de la physicochimie du bioenvironnement des CML *in vitro*, en termes de propriétés mécaniques et biologiques différentes du tissu aortique naturel. Une autre limitation provient de la variabilité des résultats, qui pourrait être expliquée par le fait du faible nombre d'échantillons et de leurs caractéristiques différentes en dehors de l'âge et du genre. De plus, l'analyse morphologique présentée dans cette étude gagnerait à être enrichie par l'ajout de marqueurs supplémentaires tels que la myosine ou la smootheline, afin de mieux distinguer un changement de phénotype. De ce fait, les perspectives envisagées concernent l'étendue de cette analyse à des marqueurs plus spécifiques tels que la myosine ou les adhésions focales des CML. Une autre perspective proposée serait de travailler avec des mesures de force par unité de surface, en tenant compte de la surface d'adhésion des CML, en utilisant par exemple des micromotifs.

3. Contenu de la publication

Traction Force Measurements of Human Aortic Smooth Muscle Cells Reveal a Motor-Clutch behavior

Petit, C.¹, Karkhaneh Yousefi, A.-A.¹, Ben Moussa, O.¹, Michel, J.-B.³, Guignandon, A.², Avril, S.¹

¹Mines Saint-Etienne, Université de Lyon, INSERM, U 1059 SAINBIOSE, F - 42023 Saint-Etienne France

²Université Jean Monnet, Université de Lyon, INSERM, U 1059 SAINBIOSE, F - 42023 Saint-Etienne France

³UMR 1148, Laboratory for Translational Vascular Science, Inserm and Paris 7- Denis Diderot University, Xavier Bichat Hospital, 75018 Paris, France

Published in *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology (BMMB)*, 2020 (In press)

3.1. Abstract

Smooth muscle cells (SMCs) usually express a contractile phenotype in the healthy aorta. However, aortic SMCs have the ability to undergo profound changes in phenotype in response to changes in their extracellular environment, as occurs in ascending thoracic aortic aneurysms (ATAA). Accordingly, there is a pressing need to quantify the mechanobiological effects of these changes at single cell level. To address this need, we applied Traction Force Microscopy (TFM) on 759 cells coming from three primary healthy (AoPrim) human SMC lineages and three primary aneurysmal (AnevPrim) human SMC lineages, from age and gender matched donors. We measured the basal traction forces applied by each of these cells onto compliant hydrogels of different stiffness (4, 8, 12, 25 kPa). Although the range of force generation by SMCs suggested some heterogeneity, we observed that: 1. the traction forces were significantly larger on substrates of larger stiffness; 2. traction forces in AnevPrim were significantly higher than in AoPrim cells. We modelled computationally the dynamic force generation process in SMCs using the motor-clutch model and found that it accounts well for the stiffness dependent traction forces. The existence of larger traction forces in the AnevPrim SMCs were related to the larger size of cells in these lineages. We conclude that phenotype changes occurring in ATAA, which were previously known to reduce the expression of elongated and contractile SMCs (rendering SMCs less responsive to vasoactive agents), tend also to induce stronger SMCs. Future work aims at understanding the causes of this alteration process in aortic aneurysms.

Conflict of interest : none

Keywords: Cell biomechanics · Ascending Thoracic Aortic Aneurysm (ATAA) · Mechanotransduction · Smooth Muscle Cells (SMC) · Traction Force Microscopy (TFM) · Single cell

3.2. Introduction

Ascending Thoracic Aortic Aneurysms (ATAA) remain among the most critical cardiovascular diseases. They constitute significant weakening of the aortic wall and increase the risk of dissection or rupture, which constitute the most fatal complication (Goldfinger et al., 2014; Isselbacher, 2005). Currently, the standard criterion for surgical interventions is the aortic diameter, measured by echography or CT-scan (Goldfinger et al., 2014; Isselbacher, 2005). Nevertheless, a significant number of dissections or ruptures were reported for small aneurysms (Hagan et al., 2000). Therefore, the diameter appears insufficient to characterize rupture risk in the aortic wall, and several supplemental criteria, accounting for biomechanical properties of the aortic wall, have been proposed recently (Choudhury et al., 2009; Duprey et al., 2016; Farzaneh et al., 2019; Hayashi et al., 2012; Humphrey et al., 2015; Trabelsi et al., 2015). Mechanobiology of ATAA also appears to be determinant. The aorta, like any other biological tissue, is composed of cells embedded in an Extracellular Matrix (ECM). Cells synthesize and remodel this ECM according to stimuli they receive or sense from their environment. Mis-sensing of mechanical stimuli, such as stress, strain or stiffness, was typically shown to play a major role in ATAA (Humphrey et al., 2015; Milewicz et al., 2016). The aorta is composed of three layers, namely (from internal to external) the intima, the media, and the adventitia. The media typically represents 2/3 of the whole thickness of the wall, and contains the Smooth Muscle Cells (SMCs) that have a key role in both the passive and active mechanical response of the aortic tissue (Humphrey et al., 2015; Lacolley et al., 2012; Michel et al., 2018). SMCs are normally highly contractile and may react to both biochemical (Chen et al., 2015; Reusch et al., 1996; Thyberg et al., 1997, 1990; Tran et al., 2006; Wang et al., 2007) and mechanical stimuli from the surrounding ECM (Arribas et al., 2006; Humphrey, 2002; Mao et al., 2015; Owens et al., 2004, 1981; Rubbia and Gabbiani, 1989; Tsamis et al., 2013). Nevertheless, in the ATAA pathology, genetics (Brownstein et al., 2017; Chen et al., 2007; Gillis et al., 2013; Guo et al., 2007; Kuang et al., 2012; Milewicz et al., 2016; Papke et al., 2015; Regalado et al., 2015; Schildmeyer et al., 2000), hemodynamics (Choudhury et al., 2009; Pasta et al., 2013), or biomechanics (Brownstein et al., 2017; Humphrey et al., 2015; Isselbacher, 2005) may alter the contractile function of aortic SMCs. This may result in increased apoptosis (Li and Xu, 2007; Mao et al., 2015; Riches et al., 2013) and phenotype switching from a mature quiescent and contractile phenotype towards a synthetic one (Humphrey, 2002; Mecham and Schwartz, 1995; Owens et al., 2004; Thyberg et al., 1990). Synthetic SMCs have the ability to synthesize structural proteins like collagen and glycosaminoglycans (GaGs) and to remodel the ECM (Cox and Erler, 2011; Hayashi et al., 2012; Hong et al., 2014; Humphrey, 2002; Humphrey et al., 2015; Lacolley et al., 2012; Mecham and Schwartz, 1995). They are present normally during early stages of development: they are able to proliferate and migrate in order to build tissue (Humphrey, 2002; Thyberg et al., 1990). In adulthood, they remodel the aortic structure under pathological conditions through ECM production and degradation (Arribas et al., 2006; Bellini et al., 2014; Hayashi et al., 2012; Owens et al., 2004; Papke et al., 2015; Rubbia and Gabbiani, 1989). Moreover, previous studies reported an alteration of the contractile apparatus, suggesting that an increasing number of synthetic SMCs decreases the responsiveness to vasoactive agents or stimuli (Chen et al., 2007; Humphrey et al., 2015; Owens et al., 2004; Rubbia and Gabbiani, 1989; Schildmeyer et al., 2000). This fact is particularly important because traction forces of certain types of cells such as myofibroblasts play a key role in remodelling the matrix and modulate the activities of neighbouring cells (Layton et al., 2020). Therefore, any perturbation may lead to a vicious circle (Karnik, 2003; Wang et al., 2007), leading to unstable situations where the aortic wall never

recovers stress homeostasis (Mao et al., 2015; Thyberg et al., 1997). However, dysfunctions in the mechanical behavior of SMCs have never been quantified in ATAAs. Only one study to our best knowledge characterized the impairment of SMC contractility in abdominal aortic aneurysms using Electric Cell-substrate Impedance Sensing (ECIS). This study was achieved for a significant cell population, but traction forces were not characterized at the single cell level (Bogunovic et al., 2019). Characterizations at the single cell level were sometimes achieved on aortic SMCs, but never on primary human SMCs. Recently, (Sugita et al., 2019) introduced a photoelasticity-based method using retardation, which is related to the difference between the first and second principal stresses and their orientation, to evaluate cellular contractile force. They showed that SMCs of low passage, which are more contractile, develop higher traction forces than SMCs of high passage. This also completes previous results obtained by (Ye et al., 2014) who carried out Traction Force Microscopy (TFM) experiments on engineered SMCs and showed that elongated SMCs have smaller traction forces but they facilitate tone modulation by increasing its dynamic contractile range. Accordingly, there is a still pressing need to quantify the mechanobiological changes occurring in ATAAs at single cell level with primary human cells. To address this need, we developed an in vitro technique, based on Traction Force Microscopy (TFM), to quantify SMC basal tone and compare primary SMCs from aortic aneurysms and healthy aortas. After presenting the approach which was initially tested on a commercial cell lineage (Petit et al., 2019a), we report results on three primary healthy (AoPrim) human SMC lineages and three primary aneurysmal (AnevPrim) human SMC lineages, obtained from age and gender matched donors. Eventually, we propose interpretations of the different mechanical responses of AoPrim and AnevPrim using morphological analyses and the motor-clutch model.

3.3. Materials and methods

3.3.1. Healthy and aneurysmal cell lineages

Human aortic samples were harvested on 3 deceased organ donors (with the authorization of the French Biomedicine Agency - PFS 09007 - and in accordance with the declaration of Helsinki) and, after informed consent, on 3 patients undergoing ATAA surgical repair according to protocols approved by the CHU-SE ethics committee (Centre Hospital-Universitaire – Saint-Etienne, France). After macroscopic examination, the 3 aortas of deceased organ donors were classified into healthy aortas according to Stary classification (Stary et al., 1994) and the Virmani list (Bentzon Jacob Fog et al., 2014).

Just after harvest (within 2h), aortic samples were stored in physiological serum and put into the incubator at 37°C. The extraction of SMCs was performed immediately after, by cutting the aortic tube according to its length and transferring the plane sample into a Phosphate Buffer Saline (PBS) bath. With tweezers, the adventitia was gently removed in order to remove fibroblasts, as they may grow faster than SMCs and contaminate the culture. Then, we removed the intima, in order to have only the media remaining in the Petri dish. We cut the media into small pieces and immersed them in tubes containing both elastase (Elastase, Lyophilized ESL, Worthington) and collagenase (Collagenase, Type I, powder, Gibco™) in PBS. The tubes were heated to 37°C and shaken slowly during 3h until the final solution looked cloudy (Didelot, 2018).

In parallel, we coated the culture flask with fibronectin (Fn), using 10% Human Fn (Human Fn, Promocell) in PBS: we let the solution 3h at room temperature or 30 min at the incubator before

removing it from the flask. This coating was necessary for enhancing cell adhesion for aortic SMCs from primary culture. Then, we filtered the solution successively into 70 μ m and 40 μ m strainers in order to eliminate the remaining ECM components and keep only the SMCs. We carefully rinsed the tube that contained the solution to filter three times with 10mL PBS. After each filtration, we centrifuged the tube that contained the filtered solution during 5min at 1500 rpm, we eliminated the supernatant, and we suspended again the pellet with 10mL PBS for the first time, and in 5mL growth medium (SmGM-2, Lonza) at last. This medium promotes proliferation thanks to high (5%) fraction of Fetal Bovine Serum (FBS) and other specific components including growth factors.

Finally, we transferred the cell suspension into the flask and completed with 5mL of growth medium. The flask was put into the incubator at 37°C 5% CO₂ for 2 weeks for sufficient cell growth, during two passages. At the end of this initial step of primary culture, we froze the SMCs at passage 2 into 1.5mL aliquots containing a freezing solution composed of 80% complete medium, 10% SVF, and 10% DMSO, and stored them into liquid nitrogen. Each aliquot contained between 2 and 6 million SMCs.

Aliquots of cells coming from healthy donors, named AoPrim onwards, were extracted according to the same protocol and stored in a biobank (INSERM U1148, Bichat Hospital, Paris, France) and shipped to our lab for the purpose of this study. Aliquots of cells coming from ATAA patients, named AnevPrim onwards, were stored in similar conditions directly in our lab (INSERM U1059, Saint-Etienne, France). Characteristics of the donors are reported in Table 4.1. In order to minimize the effects of gender and age, all donors were of the same age range (65-79 years old).

Table 4.1 Characteristics (Gender, age) of the donors for the 3 healthy SMC lineage and for the 3 aneurysmal SMC lineage. The aortic diameter, the type of aortic valve and the presence of hypertension is also reported for the 3 donors harboring an ATAA.

SMCs lineage	Gender, age	Aortic diameter (mm)	Aortic Valve	Hypertension
AoPrim1	H, 74	N/A	N/A	N/A
AoPrim2	H, 65	N/A	N/A	N/A
AoPrim3	F, 69	N/A	N/A	N/A
AnevPrim1	H, 72	57	Tricuspid	Yes
AnevPrim2	H, 69	48	Tricuspid	No
AnevPrim3	F, 79	56	Mechanical prosthesis for 34 years	Yes

3.3.2. Cell culture

After thawing, the cells were transferred into a T-75 flask for an entire week in growth medium (SmGM-2, Lonza). The cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ to maintain the pH at 7.2-7.4. Then, SMCs were cultured one week more in a basal medium (SmBM, Lonza), without FBS and containing 0.04% heparin for differentiation. Once they reached 50-70% confluence, we used a standard cell detachment protocol using a trypsin treatment with a low trypsin – EDTA solution (0.025% Trypsin and 0.75mM EDTA (1X), Sigma) to break down the focal adhesions in the culture dish without damaging the cells. Then, the cells in suspension were used for subculturing or for sample preparation.

3.3.3. Sample preparation

Previously starved SMCs (see subsection 3.3.2) at passage 3 were transferred in Petri dishes (Fig. 4.1a) or 24-well plates (Fig. 4.1b) containing ready-to-use hydrogels with different stiffness properties (Cell Guidance System : Petrisoft™ 35, collagen pre-coated and Softwell™ 24, collagen pre-coated, Softrack 0.2µm diameter microbeads labelled with yellow-green fluorescent dye, customized stiffness values). These hydrogels were made of a 400µm-thick layer of polyacrylamide, which was assumed to be linear elastic within the range of strains considered in our study, and to have the same behavior in both tension and compression. The gel plates were 12 mm diameter, which is sufficiently large with respect to the cell size (about 0.4mm long). Moreover, the collagen I coating provided a physiological surface for cell adhesion and culture. Since the coating is a protein monolayer, whereas the hydrogels are 400µm thick, we assumed that the coating only affects marginally the mechanical behavior of the substrate.

According to previous observations with gels from 0.5 to 50 kPa (Petit et al. 2019a), we used 24-well plates of intermediate stiffness values: 4, 8, 12 and 25 kPa, as these stiffness values allowed reproducible quantification of bead displacements whilst lying within a range compatible with soft tissue stiffness. The stiffness values indicated by the supplier were verified using AFM indentation before performing the experiments.

About 50 000 cells per Petri dish and 20 000 cells per well were seeded on the hydrogels and incubated in basal medium for two days before the experiments. This duration was sufficient to ensure a good spreading of SMCs, which generally adopted a specific elongated spindle shape.

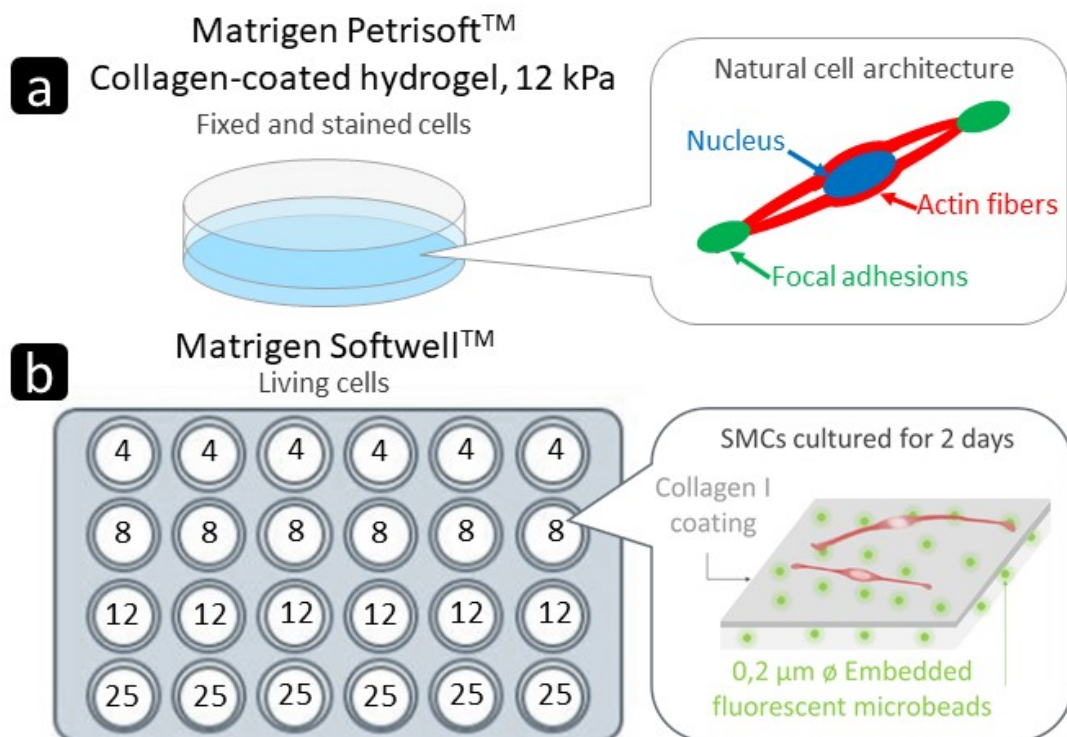


Figure 4.1 (a) Collagen-coated 12kPa hydrogel in a Petri dish containing adhering SMCs and schematic of a single SMC adopting the natural spindle shape. (b) The Matrigen 24-well plate contained 4 lines of 6 hydrogel samples with the same stiffness (4, 8, 12, and 25 kPa). The gels were previously covered by a collagen I adhesive pre-coating and included yellow-green 0.2µm diameter fluorescent microbeads.

3.3.4. Traction Force Microscopy (TFM) to measure SMC basal tone

We used a Carl Zeiss Axio Observer.Z1 station with the Zen software. The station fits an incubating chamber in which we maintained the previously cultured hydrogels at 37°C, 5% CO₂. The Green Fluorescent Protein (GFP) channel was used to track the displacement of the green fluorescent microbeads embedded in the gels. Then we used the phase contrast channel to image the cells and to measure, for each of them, their morphology. The best magnification was obtained with the Plan-Neofluar 20x/0.4 objective, which resulted in a resolution of 0.323 μm per pixel. This resolution was kept for all further image acquisition.

The method consisted in recording one frame per 30s throughout 3-5 min total duration, until the cells detach completely from the surface after trypsin treatment. In order to obtain the trypsin-induced detachment of SMCs, the medium was first removed from the well and the cells were gently washed once with PBS, as some medium components tended to inhibit the trypsin effect. A little amount of PBS remaining on the surface of the hydrogels was sufficient to keep the cells hydrated before trypsin treatment. Then we focused with the microscope on an area of interest around several adhering and sufficiently isolated cells. The field of view of the objective allowed the selection of 1-4 cells per well at the same time.

Normally, cells detached from the gels within 1-2 min, and a deformation was observed in the gel, with localized motions of the microbeads that was induced by the release of SMCs initial basal tone. Once the cells were detached by trypsin treatment, the well was not reusable. This process was repeated for every well of the plate successively, on at least 2 plates for each cell line. The resulting images were processed using Digital Image Correlation (DIC) first, to obtain the corresponding displacement and strain fields on all the deformed images. Then we applied a custom Matlab® code for selecting an area around each cell anchorage point and we derived the traction force value. The full theory and method related to traction force measurement are explained in a previous paper (Petit et al., 2019a).

3.3.5. Cell morphology

We also performed morphological and histochemical characterizations in the same conditions as the TFM experiments (adhering on collagen-coated gels of 12 kPa stiffness). From the phase contrast channel images obtained with the microscope (Fig. 4.3), the contours of isolated cells selected for TFM measurements were segmented manually and used to measure the cell length, width, orientation and surface area (Fig. 4.5). For multidirectional cells, we determined the principal axis and measured the length along this axis and the width along the perpendicular direction. Moreover, we imaged supplemental AoPrim and AnevPrim SMCs (only on 12kPa hydrogels) using fluorescent microscopy in order to characterize the distribution of filamentous actin (F-actin) and of the α-SMA actin isoform, which is known to be involved in the contractile apparatus of SMCs. More details about the fluorescent microscopy protocol are provided in the supplemental materials (Fig. S4.1, Appendix S4.1).

3.3.6. Statistics

For each cell population, we performed statistical analyses on the TFM measurements. We obtained traction forces on 6 wells for each stiffness value (4, 8, 12 and 25 kPa), which corresponds in

total to 16-24 cells for AoPrim on each stiffness and 27-54 cells for AnevPrim on each stiffness. We used a Mann-Whitney non-parametric test in order to compare the distribution of two independent samples, with different sample size. The null hypothesis was that data from the two tested populations were from continuous distributions with equal medians. We tested populations (one per stiffness value) two by two successively and displayed the results as a boxplot using Matlab®. A p-value below 0.05 was interpreted as a significant result, namely that the null hypothesis was rejected at this significance level.

3.3.7. The motor-clutch model

Firstly introduced by Chan & Odde (Chan and Odde, 2008), the motor-clutch model simulates the filopodium dynamics involving the main components of the cytoskeletal structure (Bangasser et al., 2013; Bangasser and Odde, 2013). In this model, it is assumed that myosin molecular motors drag actin bundles, resulting in filament sliding. Cell traction forces are then transmitted to the compliant substrate through the focal adhesions, which consist in a certain number of molecular clutches. A clutch is represented by a single spring which can fail following a probabilistic law. A schematic of the model is represented in Fig. 4.2.

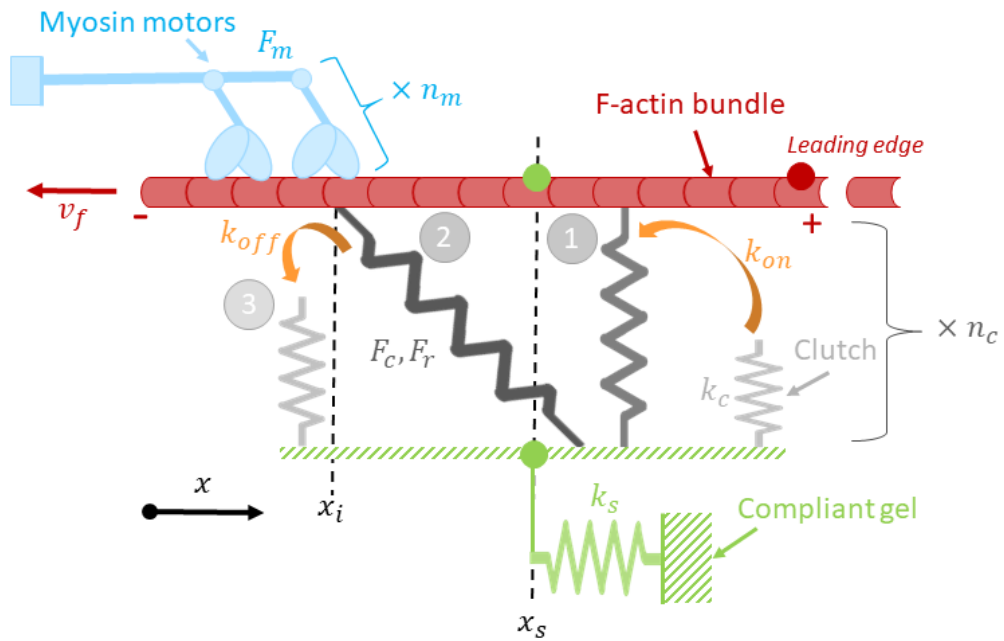


Figure 4.2 Schematic representation of the motor-clutch model. Once engaged (1), the i th clutch undergoes a load (2) and fail (3) cycle. This can be generalized to n_m myosin motors and n_c clutches (Bangasser et al., 2013; Chan and Odde, 2008).

While the clutch is still engaged on the substrate, the cytoskeletal tension keeps increasing until failure. Consequently, each clutch undergoes successive cycles of loading/failure, but the behavior depends on the stiffness of the substrate. Therefore, the model relies on the probability that a single considered clutch is bound or unbound at a given time. The motor-clutch Matlab code available online (Odde 2017) simulates binding and unbinding events of a fixed duration using the Monte Carlo method. The temporal change in the probability of binding for a single clutch is given by,

$$\frac{dp_{b,i}}{dt} = (1 - p_{b,i}) \cdot k_{on} - p_{b,i} \cdot k_{off,i}^* \quad (1)$$

where pb,i is the probability that the i th clutch is bound, and kon is the binding rate. The dissociation rate $koff,i^*$ for a single clutch follows an exponential law as in the Bell model (Bell, 1978),

$$k_{off,i}^* = k_{off} \cdot e^{F_{c,i}/F_r} \quad (2)$$

where k_{off} is the unbinding rate of the unloaded clutch, $F_{c,i}$ is the tension undergone by the clutch, and F_r is the rupture force of the bond. According to the assumption of a single linear elastic spring, $F_{c,i}$ is linked to the spring constant k_c and the spring extension ΔL such as,

$$F_{c,i} = k_c \cdot \Delta L = k_c \cdot (x_i - x_s) \quad (3)$$

where ΔL is the difference between the position of the actin-clutch interface x_i and the position of the substrate-clutch interface x_s . At the anchorage point of the cell that contains a total number of clutches n_c , we can express the equilibrium such as,

$$F_c + F_s = 0 \quad (4)$$

where F_c is the total force exerted by $n_{c,eng}$ engaged clutches and F_s the reaction force of the substrate at the anchorage point. Eq. 4 can be explicitly rewritten as,

$$k_s \cdot x_s - k_c \sum_{i=1}^{n_{c,eng}} (x_i - x_s) = 0 \quad (5)$$

The position of the substrate may be eventually expressed as,

$$x_s = \frac{k_c \cdot \sum_{i=1}^{n_{c,eng}} x_i}{k_s + n_{c,eng} \cdot k_c} \quad (6)$$

The x_i position is updated for each event according to,

$$x_i \mapsto x_i + v_u \cdot \left(1 - \frac{k_s \cdot x_s}{n_m \cdot F_m}\right) * dt \quad (7)$$

As the substrate spring constant k_s is involved in Eq. 7, the cytoskeleton dynamics is sensitive to the substrate stiffness. Nevertheless, this sensitivity may be lost if the total myosin motor stall force is reached. This force is the number of motors n_m times the stall force of a single motor F_m .

Based on these equations, 10^5 events can be simulated with the Matlab code in successive iterations updated from a fixed duration of 0.005s, until reaching a steady state. At the beginning of each step, molecular clutches are first allowed to bind randomly with a binding rate k_{on} (Eq. 1). Then, random disengagement is modeled at an unbinding rate k_{off}^* while the loading is increased (Eq. 2). A random network of both bound and unbound springs is obtained. The final position of the substrate x_s , is updated at every event with the new number of engaged clutches $n_{c,eng}$ (Eq.6). Then, the net force at the anchorage point is zero if $\|F_c\| = \|F_s\|$.

Otherwise $F_c = k_s \cdot x_s$ (Eq. 4 and Eq. 5).

Knowing k_s and x_s , F_c is calculated for each event, and the mean force value can be estimated for each substrate stiffness.

Typical parameter values for the motor clutch model were reported by (Bangasser et al., 2013). However, the motor-clutch model with these parameter values did not match accurately our

TFM measurements. Therefore we had to calibrate four of these parameters (n_m , k_{on} , n_c , k_{off}) in order to adjust the model to our experimental results.

3.3.8. Fitting of the motor-clutch model with experimental data

We performed a systematic search using an optimization algorithm in Matlab. We used the initial Matlab code available online (“David Odde Laboratory,” 2017) for the motor-clutch model for launching several successive simulations with progressive changes in the parameters we considered as variable, namely nm , kon , nc , $koff$. Then, we used the data from these simulations in order to compare it with the experimental median traction force values measured on each gel stiffness. In this way, we defined an objective function as the sum of squares of differences between predicted traction force values from the model and the median of experimental values. The first iteration consisted in the adjustment of the kon and $koff$ rates, in order to fit first the whole range of theoretical and experimental traction force values for all cell lineages. Then, the same kon and $koff$ rates were kept for all the cell lineages. We eventually adjusted the nm and nc parameters. We repeated the method until the model was sufficiently close to our experimental values (the stopping criterion was a variation of less than 1% between two successive iterations).

3.4. Results

3.4.1. Measurement of cell traction forces

TFM experiments were carried out on three primary healthy (AoPrim) human SMC lineages and three primary aneurysmal (AnevPrim) human SMC lineages, adhering to collagen-coated hydrogels with 4 different stiffness values. In total, we measured traction forces of 759 primary human aortic SMCs which were sorted in 24 populations (6 cell lineages x 4 substrate stiffness). In order to automatize the process, 24-well plates containing 6 wells of each stiffness values (4, 8, 12, 25 kPa) were used for each cell lineage. For each well, we measured the traction forces for about 1 to 4 cells depending on their location. For each stiffness value, we could finally evaluate the traction forces for a number of cells varying between 16-24 for AoPrim and 27-54 for AnevPrim lineages.

Examples of 2 primary SMCs (one AoPrim and one AnevPrim) among the 759 traction force measurements are shown in Fig. 4.3. These SMCs were artificially detached from the collagen by a trypsin treatment, which removed the traction forces they exerted on the gel initially, corresponding to the cell basal tone. These forces were localized on the ending part of the cell and oriented from each pole towards its nucleus. As it can be seen in Fig. 4.3, cells had developed anchorage points on the substrate, where the strain maps exhibit a traction-compression pattern. This local pattern was related to the traction force as explained in (Petit et al., 2019a).

For each gel stiffness, the obtained traction force values were plotted in Fig. 4.4 as boxplots for each of the six cell lineages (3 AoPrim on the left hand side and 3 AnevPrim on the right hand side). The traction forces are globally heterogeneous. They were also represented as histograms in the supplemental materials (Appendix S4.2 - Figs S4.3, S4 and S4.5) for each of the 24 populations, showing that they exhibit generally an exponential distribution, which is still consistent with our previous observations on a commercial cell line of aortic SMCs (Petit et al., 2019a).

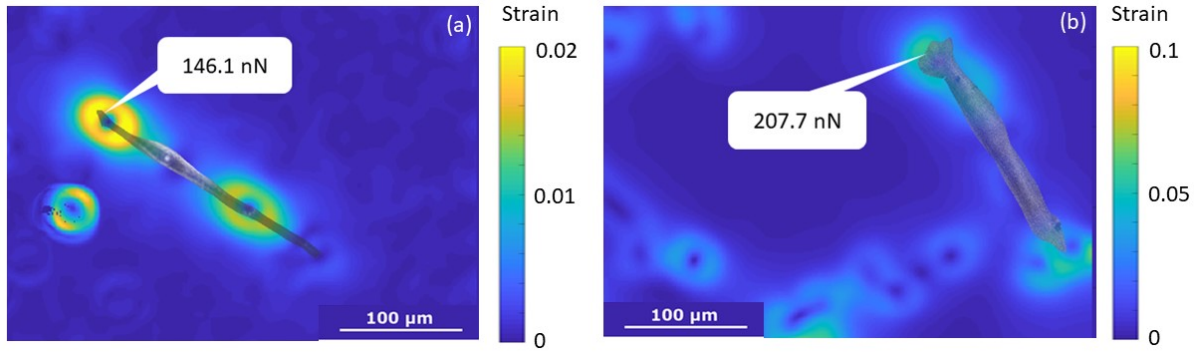


Figure 4.3 Morphologies of a healthy SMC from AoPrim3 lineage (a) and of an aneurysmal SMC from AnevPrim3 obtained from the phase contrast channel of the microscope and superimposed onto the strain maps measured for TFM analyses. The yellow-blue double pattern corresponds to the local traction force exerted by the cell on the compliant hydrogel. The force derived from the TFM analysis is also displayed for each cell.

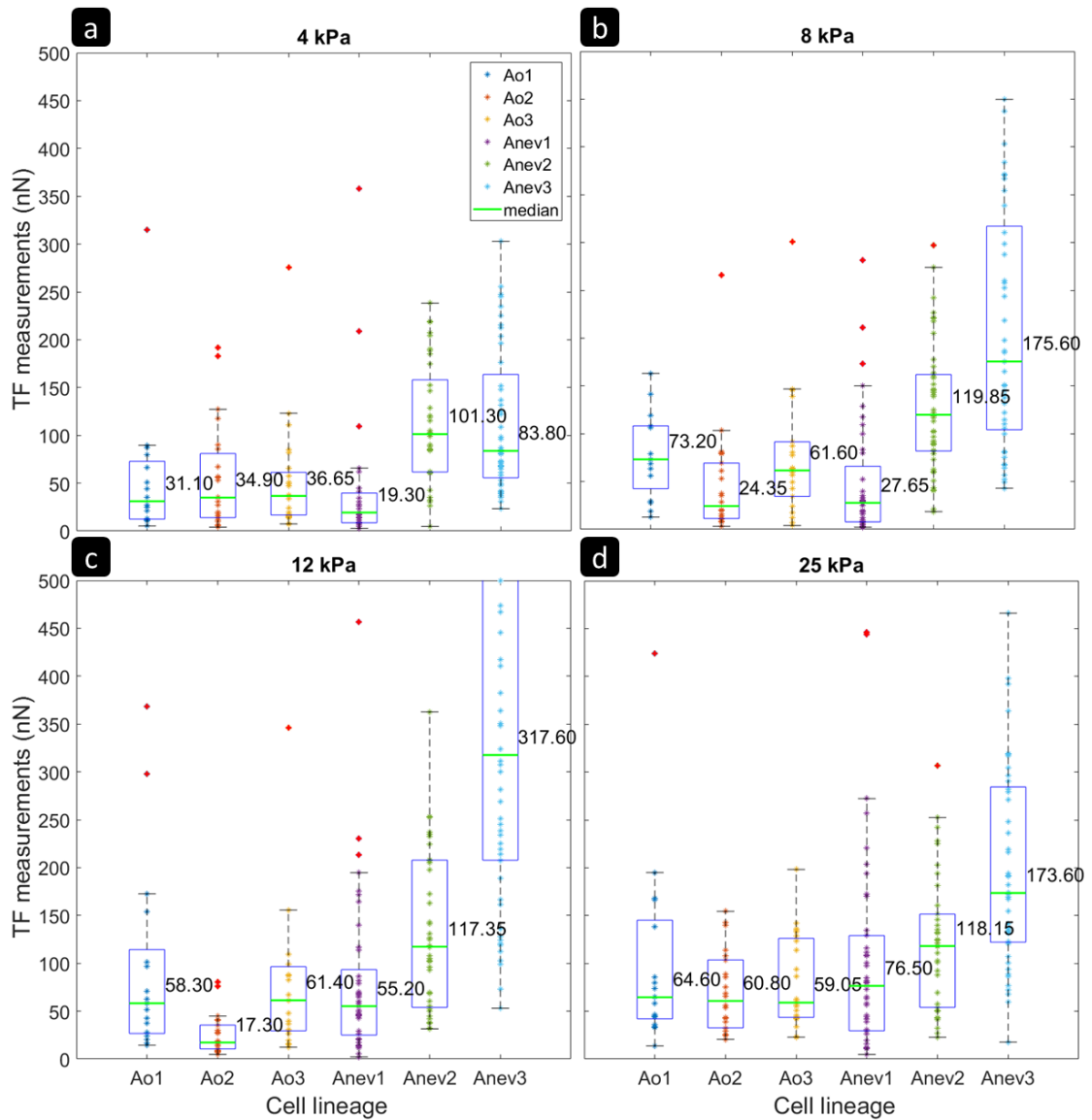


Figure 4.4 Boxplots showing the distribution of the measured traction forces (TF) (experimental data) for AoPrimX and AnevPrimX lineages for each gel stiffness: 4 kPa (a), 8 kPa (b), 12 kPa (c), and 25 kPa (d). Median values are reported for a

clearer comparison. Significance between two populations was found using a Mann-Whitney test. Significance was stated there for $p < 5\%$ (results reported in supplemental materials, Appendix S4.2, Table S4.3).

The median traction force for each group is also reported in Fig. 4.4. The median seemed more relevant than the mean given the large variability, but mean values are also reported in supplemental materials (Appendix S4.2, Table S4.1). We observed inter-individual variations between the median traction forces of each group of cells. We found that the three AoPrim had similar median values, excluding the values of AoPrim2 at 8 kPa and 12 kPa. The trend is a median traction force of about 30 nN on gels of 4 kPa and a median traction force between 60 nN and 70 nN on gels of 8 kPa, 12 kPa and 25 kPa (again excluding the values of AoPrim2 at 8 kPa and 12 kPa). The effect of substrate stiffness on traction forces is highlighted in the supplemental materials (Appendix S4.2, Figs. S4.6 and S4.7). Globally, it appears that median traction forces would increase when the substrate stiffness increases up to 8 kPa or 12 kPa, and then remain constant or even decrease for larger substrate stiffness.

Although the median traction forces of AoPrim remained in the 30 – 70 nN, the AnevPrim showed a dramatically larger range with values that were significantly larger, especially for AnevPrim2 and AnevPrim3, which showed medians beyond 100 nN and even a median reaching 300 nN for AnevPrim2 on the 12 kPa substrate. Interestingly, all AnevPrim showed increase of the traction forces between the softest substrates and the other substrates. Moreover, AnevPrim2 and AnevPrim3 both showed maximal median values on the 12 kPa substrate, which is similar to previous results obtained on a commercial aortic SMC lineage (Petit et al., 2019a).

We did not indicate the statistical significance of differences between each group in Fig. 4.4 for the sake of readability of the figure. However, the p-values for the comparison of each group are reported in the supplemental materials (Appendix S4.2, Table S4.3). It is shown that AnevPrim2 and AnevPrim3 are always significantly different to the other cell lineages, with larger traction force values.

Cross comparison between the different substrate stiffness is also shown as boxplots in the supplemental materials (Appendix S4.2, Figs S4.6 and S4.7). This shows that all the cell lineages exhibit statistically significant differences in the traction forces they apply on gels of different stiffness, except AnevPrim2 which showed median traction forces always between 100 nN and 120 nN.

Due to the large variability of traction forces, we also looked at global trends such as the fraction of low (<60 nN) and high (>200 nN) traction forces. Results are reported in supplemental materials (Appendix S4.2, Table S4.2). About 50% of the AoPrim1 applied traction forces in the range 0-60 nN, whereas less than 20 % of the AnevPrim applied traction forces in this range.

3.4.2. Measurement of SMC morphology and architecture

As the results seem to indicate a larger fraction of stronger SMCs in the AnevPrim populations than in AoPrim populations, we also compared their respective morphology and composition. Most of AoPrim naturally showed a pronounced uniaxial spindle-shape with lower surface area compared to AnevPrim SMCs. The morphology of AnevPrim SMCs appeared more often multipolar, with several other directions of spreading and larger membrane extensions. The distribution of cellular areas are reported in Fig. 4.5, showing a trend towards bigger cells for AnevPrim, which appeared more spread, and with less prominent membrane extensions.

Fluorescent imaging of cells from both cell lineages showed that the SMC cytoskeleton was particularly dense around the cell, by forming long stress fibers on each side. For AnevPrim, in which the membrane extensions were larger, we clearly noticed an organization of crisscrossed actin fibers that formed the lamellipodium. Conversely, in lateral stress fibers, the actin fibers were closer and more parallel to each other. F-actin is more concentrated into long thin fibers all along the cell length for long and thin AoPrim (Appendix S4.1, Fig. S4.1). In both cases, the F-Actin was dispersed into the whole cell volume and defined the cell shape.

In addition, the α -SMA specific isoform of SMCs was concentrated around the nucleus and along the boundaries of the cells. The quantification of the fluorescent intensity was performed on both α -SMA and F-actin corresponding channels for N=22 cells from each lineage (Appendix S4.1, Fig. S4.2). A significant increase in α -SMA expression was showed for AnevPrim cells (Appendix S4.1, Fig. S4.3a). Nevertheless, we did not notice any significant difference for F-actin (Appendix S4.1, Fig. S4.2b).

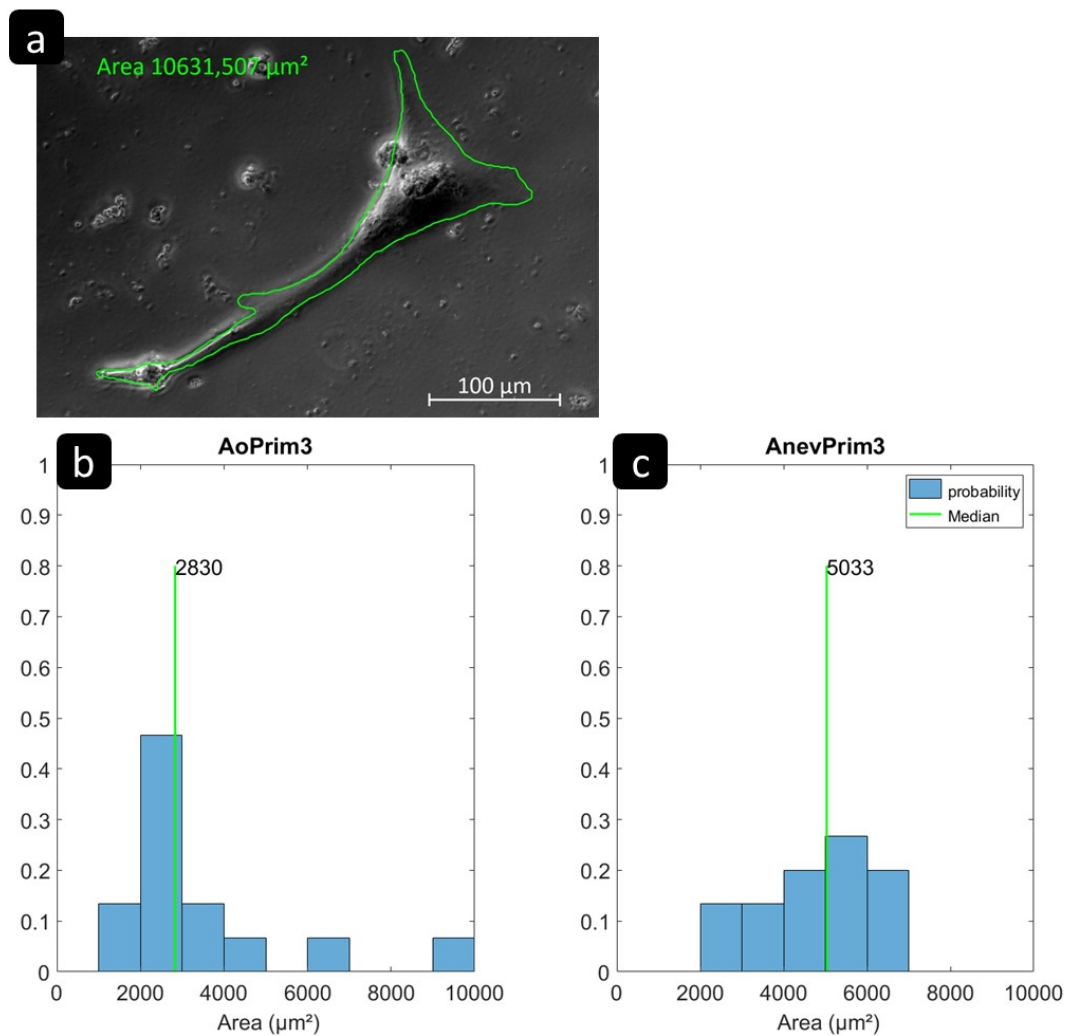


Figure 4.5 Image of a SMC obtained with the phase contrast channel of the microscope. The contour of the cell were segmented manually and the surface area of each cell was assessed with the image processing software. The distribution of surface areas for AoPrim SMCs and AnevPrim SMCs are showed as histograms in (b) and (c) respectively. The surface area of AnevPrim SMCs is significantly larger than the one of AoPrim SMCs. Significance between two populations was found using a Mann-Whitney test for $p < 5\%$ ($p = 0,0279$).

3.4.3. Motor-clutch model

Finally we modelled the median of each cell lineage with the motor-clutch model to reproduce the stiffness effect shown by the TFM results. Except for AoPrim2, the model could predict forces in good agreement with the experimental TFM results after tuning the model parameters (nm, nc, kon, and koff). Results are shown in Fig. 4.6 and the model parameters are reported in Table 4.2. A larger number of motors and clutches had to be used for AnevPrim2 and AnevPrim3 given the significantly larger traction forces in these populations.

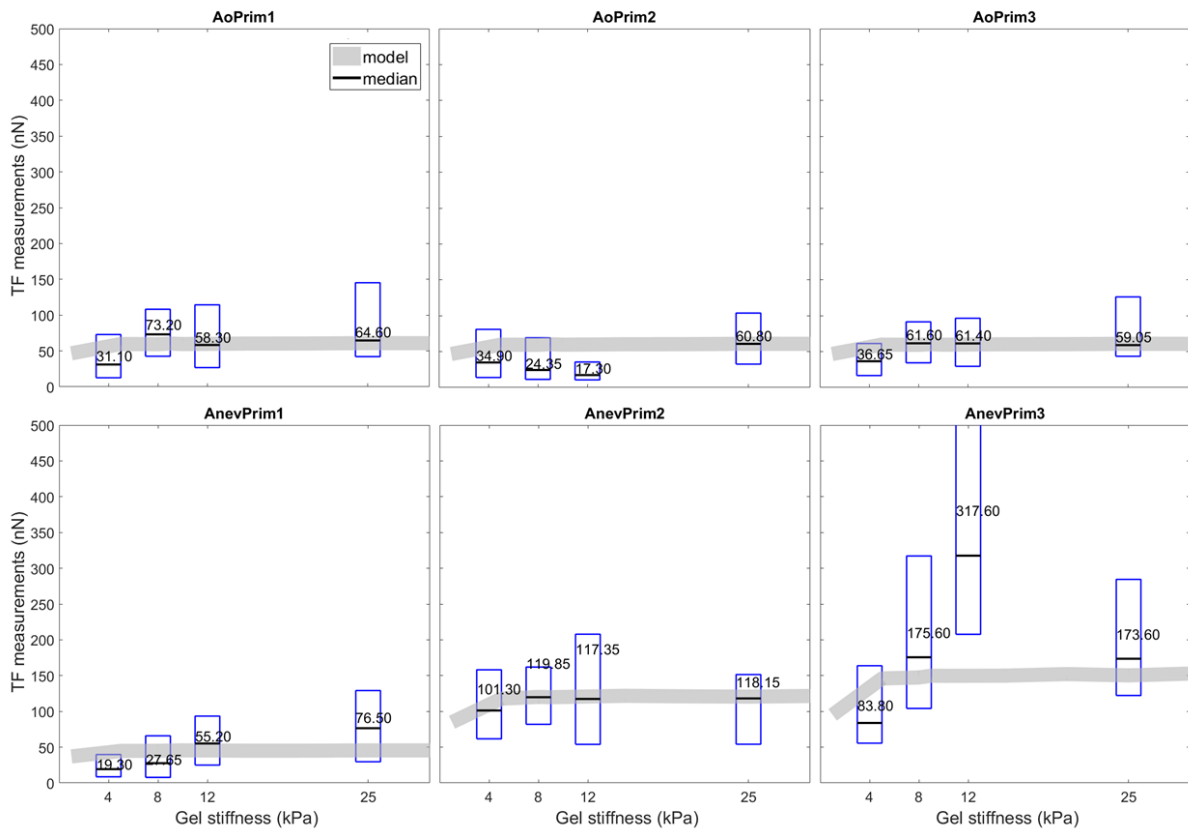


Figure 4.6 Motor-clutch simulations of traction forces obtained with optimal parameter sets are compared to the measured traction forces. AoPrim and AnevPrim SMCs had significantly smaller traction forces on the 4kPa gels than on gels of larger stiffness, which was also predicted by the model. For each substrate stiffness, the mean traction forces measured experimentally are plotted with a red star symbol. Results for AoPrim1 (a), AoPrim2 (b), AoPrim3 (c), AnevPrim1 (d), AnevPrim2 (e), and AnevPrim3 (f).

Table 4.2 Motor-clutch parameters with the values identified for the six cell lineages.

Parameter	Symbol	AoPrim			AnevPrim		
Cell lineage		1	2	3	1	2	3
Number of motors	n_m	400	400	400	300	800	1000
Motor stall force	F_m (nN)	2			2		
Unloaded actin velocity	v_u (nm/s)	120			120		
Number of clutches	n_c	400	400	400	300	800	1000
Rupture force	F_r (nN)	2			2		
Binding rate	k_{on} (s ⁻¹)	4	4	4	4	4	4
Unloaded unbinding rate	k_{off} (s ⁻¹)	14	14	14	14	14	14
Spring constant	k_c (N/m)	0.8			0.8		

3.5. Discussion

3.5.1. Differences between healthy and aneurysmal SMCs

In this study we achieved for the first time single-cell TFM experiments on primary human aortic SMC lineages coming from age and gender matched healthy and aneurysmal donors and found that a significant fraction of aneurysmal SMCs apply traction forces larger than 100 nN, whereas the traction forces of healthy SMCs generally lie in a 30-70 nN range.

Characterization of the traction forces at the single cell level on primary human aortic SMCs was challenging but it permitted to assess for the first time the basal tone of isolated SMCs (759 in total), avoiding to average the response of a cell population with possibly different phenotypes (Liu and Gomez, n.d.). For instance, (Bogunovic et al., 2019) characterized the impairment of SMC contractility in abdominal aortic aneurysms but not at the single-cell level.

TFM characterizations at the single cell level were sometimes achieved on aortic SMCs, but never on primary human SMCs (Sugita et al., 2019). It was shown for instance by (Ye et al., 2014) that elongated engineered SMCs have smaller traction forces but they facilitate tone modulation by increasing its dynamic contractile range.

It was shown by (Sugita et al., 2019) that SMCs of low passage (3) are more contractile and develop higher traction forces than SMCs of high passage (12). Our experimental conditions ensured the use of cells at passage 3, which are known to have significant contractility as shown by Murray et al. (Murray et al., 1990). Moreover, serum deprivation was used to maintain significant contractility. The very good preservation of AoPrim/AnevPrim contractile behavior is also indicated by clear spindle-shaped SMCs and high expression of α -SMA (Rzucidlo, E. M. et al., 2007; Timraz et al., 2015) (data in Supplemental materials, Appendix S4.1). These filaments are well known for their high contractility

and are present only in cell types that need to contract strongly in the human body, like myofibroblasts and SMCs (Anderson et al., 2004; Chen et al., 2007; Goffin et al., 2006b). Morphological analyses revealed that healthy SMCs tend to be longer than aneurysmal SMCs, which showed thicker morphologies (example shown in Fig. 4.3). Substantially fragmented and disorganized F-actin fibers were also previously reported (Riches et al., 2018). Moreover, AnevPrim SMCs showed more frequently a multipolar shape. Such SMCs may be more prone to migrate as reported for synthetic SMCs (Humphrey, 2002; Thyberg et al., 1990). In addition, their less elongated and thicker shape (significantly larger areas shown in Fig. 4.5) would indicate a hypertrophic morphology, characteristic of the synthetic phenotype (Timraz et al., 2015) in which synthetic organelles need to be more developed (Humphrey, 2002; Owens et al., 1981). The morphological differences observed in AnevPrim2 and AnevPrim3, along with the related large traction forces, seem to indicate remodeling of the cytoskeleton of a large number of these cells. However, not all AnevPrim SMCs undergo such remodeling. For instance, the median of traction forces in AnevPrim1 is close to the one of AoPrim cells. This may be accounted for by inter-individual differences. Although all the donors had a tricuspid aortic valve (Table 4.1), both AnevPrim2 and AnevPrim3 donors had aortic valve dysfunctions (AnevPrim3 donor harbored a mechanical prosthesis) inducing significant hemodynamic disturbance, which are traditionally typical of bicuspid aortic valves, and which were shown to induce significant remodeling in the aortic wall (Guzzardi et al., 2015; Jayendiran et al., 2020; Michel et al., 2018).

3.5.2. Limitations and future work

One of the main limitation of this study is that in vivo microenvironment was only mimicked in 2D by the choice of the adhesive coating, but not fully reproduced due to its biochemical and biophysical complexity in 3D. In the aorta, fibrillar type I collagen is naturally present in the media, and SMCs tend to align along collagen fibrils (Wagenseil and Mecham, 2009) but also with the direction of maximum principal stress (Fujiwara and Uehara, 1992; Humphrey, 2002; Wagenseil and Mecham, 2009). Accordingly they arrange predominantly with a circumferential orientation, permitting the regulation of stress and strain in this direction (Clark and Glagov, 1985; Hayashi et al., 2012). Choosing type I collagen coating for TFM experiments seemed relevant, even though the difficulty to extrapolate in vivo conditions from an in vitro uniform 2D environment remains the first limitation of this study.

Another limitation is related to the large variability of the results. Even if it is the first time ever that traction forces are reported in the literature on more than 750 primary human aortic SMCs from healthy and aneurysmal patients, more than 10-fold datasets would be needed to understand the different effects related to the regulation of traction forces in aortic SMCs. This is also related to the diversity of ATAA etiologies (Michel et al., 2018). Although the 3 ATAA donors were from the same age range, there showed diversity in some of their characteristics as reported in Table 4.1. For instance, one of them had a mechanical aortic valve and two of them were diagnosed hypertension. None of them presented a genetic disease related to aortopathies. Another source of variability may be the location of the initial aortic sample. Whereas all samples came from the mid-ascending aorta, AnevPrim1 also contained the sino-tubular junction and a fragment of the aortic root, which may have induced differences between AnevPrim1 and the two other AnevPrim lineages.

In addition, the morphological analyses and the α -SMA/F-actin expressions reported in supplemental materials should be completed with some other markers such as smoothelin, myosin, or calpomin, in order to understand better the cytoskeletal changes of SMCs. Since we suggest that a

larger fraction of SMCs express a synthetic rather than contractile phenotype in ATAAs, we should also test their responsiveness to agonists. For instance, (Ye et al., 2014) carried out Traction Force Microscopy (TFM) experiments on engineered SMCs and showed that elongated SMCs have smaller traction forces but they facilitate tone modulation by increasing its dynamic contractile range. Similar investigations will be varied out on primary human aortic SMCs in the future. Future work should also look closer at focal adhesions. SMC adhesion could be assessed while staining the focal adhesions and measure their surface in order to express the force per surface unit. The use of deformable micropatterns may also be a good alternative (Win et al., 2017).

3.6. Conclusion

In summary, we found that the basal traction forces applied by representative populations of human primary aortic smooth muscle cells, when cultured onto compliant hydrogels of different stiffness (4, 8, 12, 25 kPa), exhibit large heterogeneity even for cells coming from the same tissue. Despite these heterogeneities, we observed that: 1. the traction forces were significantly larger on substrates of stiffness larger than 8 kPa; 2. traction forces in SMCs from ATAAs were significantly higher than in SMCs from healthy aortas. We modelled computationally the dynamic force generation process in SMCs using the motor-clutch model and found that it accounts well for the stiffness dependent traction forces. We conclude that phenotype changes occurring in ATAAs, which were previously known to reduce the expression of elongated and contractile SMCs (rendering SMCs less responsive to vasoactive agents), tend also to induce stronger SMCs. Future work aims at understanding the causes of this alteration process in aortic aneurysms.

3.7. Acknowledgements

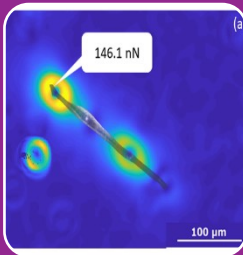
This research was supported by the European Research Council (ERC grant Biolochanics, grant number 647067). We thank Véronique Ollivier from LVTS, INSERM U1148 (Paris, France) who arranged shipment of AoPrim SMCs to our laboratory. We are also thankful to Mélusine Didelot, Patrick Lacolley, and Véronique Régnauld from Défaillance Cardiovasculaire Aigüe et Chronique (INSERM UMR 1116) laboratory of Université de Lorraine, for training us to primary SMC culture.

4. Conclusion

Cette étude vient renforcer la connaissance de la CML aortique humaine en apportant un volume de données quantitative conséquent à propos du tonus basal des CML saines et anévrismales. Elle propose une grille de lecture de ces données par comparaison des différents groupes cellulaires issus de donneurs sains et anévrismaux d'âges et de genres correspondants. Il en ressort une tendance des CML anévrismales à appliquer un tonus a priori plus élevé que les saines. Mais puisque les CML anévrismales semblent également différer sur le plan morphologique et architectural, l'hypothèse du changement de phénotype reste cohérente. Le vieillissement naturel tout comme la pathologie se répercutent sur les mécanismes de mécanosensibilité et de mécanotransduction de la CML, mais les causes de ces altérations restent à investiguer.

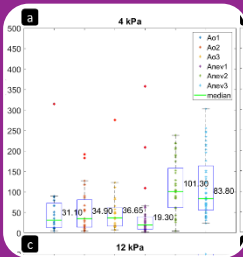
Ce chapitre vient clore la caractérisation du tonus basal de la CML dans le cadre de cette thèse. Il dégage également la problématique de trouver un complément d'information judicieux pour l'étude de la CML en tant que matériau. Par conséquent, suite à la caractérisation du tonus basal de la CML, et à l'hypothèse que les CML anévrismales évolueraient vers un phénotype synthétique, la rigidification semble à vérifier. C'est la raison pour laquelle le **Chapitre 5** s'attachera à investiguer la rigidité des CML à l'échelle subcellulaire, en donnant accès aux propriétés mécaniques du cytosquelette grâce à la technique de nanoindentation par microscopie à force atomique.

Etendue des résultats de TFM



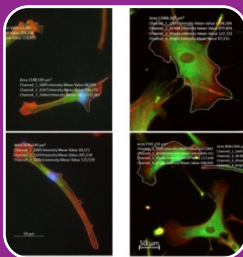
- Extraction et culture de CML anévrismales à partir d'échantillons d'ATAA
- Prise en compte de trois lignées issues de différents patients
- Utilisation de trois lignées saines issues de donneurs d'âge et de sexe correspondants (biobanque INSERM U1148, Bichat Hospital, Paris, France)
- 759 mesures de forces de traction sur 6 lignées (3 saines, 3 anévrismales)
- Même protocole de mesure que celui énoncé au chapitre 3

Forces de traction des CML saines et anévrismales



- Les valeurs de forces de traction restent variables entre les cellules
- Les forces de traction sont significativement plus élevées sur les substrats les plus rigides
- Les forces de traction semblent plus élevées chez les CML anévrismales
- Le modèle motor-clutch reste intéressant pour prédire la dépendance des résultats à la rigidité du substrat

Morphologie des CML saines et anévrismales



- Les cellules anévrismales semblent plus larges et étalées, ce qui expliquerait des mesures de forces plus élevées
- Les cellules saines tendent davantage vers une morphologie uniaxiale, très allongée, sous forme de fuseau, comme la lignée commerciale précédemment utilisée (Chapitre 3)
- La publication conclut à un changement de phénotype en cas d'ATAA, et davantage en cas de dysfonction de la valve aortique, avec des cellules hypertrophiées, et plus rigides

CHAPITRE 5

Mesure de la rigidité des CML saines et anévrismales par nanoindentation AFM

Petit, C., Karkhaneh Yousefi, A.–A., Barnier, V., Avril, S., Subcellular Elastography of Human Aortic Smooth Muscle Cells. Ready for publication.

1. Introduction

Ce chapitre porte sur la caractérisation de la rigidité des cellules musculaires lisses aortiques humaines avec la méthode de nanoindentation par Microscopie à Force Atomique (Atomic Force Microscopy, AFM). Cette technique permet d'accéder à l'échelle subcellulaire, grâce à la cartographie à haute résolution d'une zone balayée par la sonde AFM (un pixel équivaut à 117 nm sur les images présentées). Bien qu'il s'agisse d'une méthode surfacique basée sur les interactions interatomiques entre les atomes de la sonde (une pointe très fine) et ceux de la surface de l'échantillon, le réglage de la force d'appui permet aussi d'accéder à la réponse mécanique des fibres du cytosquelette situées juste en-dessous de la membrane cellulaire. Le chapitre s'appuie sur la base d'un article soumis au Journal of Biomechanical Engineering. Cet article détaille le protocole expérimental de caractérisation mécanique de trois groupes de CML isolées: des cellules saines cultivées sur substrats de rigidités 12 et 25 kPa, et des cellules anévrismales sur substrat de rigidité 12 kPa. Une comparaison des CML saines et anévrismales est ainsi proposée en discussion.

2. Résumé de la publication

Etant donné que les CML ont une mécanosensibilité importante à leur microenvironnement, une meilleure compréhension de leur réponse mécanique en fonction de leur environnement demeure fondamentale en vue de comprendre les mécanismes qui peuvent conduire à une lésion de la paroi aortique. Le phénomène de changement de phénotype contractile vers synthétique a déjà été documenté dans la littérature, et la régulation du tonus basal constitue une des conséquences sur la réponse cellulaire. Si les précédents chapitres de cette thèse se sont attachés à la quantification du tonus basal des CML aortiques humaines saines et anévrismales, ce chapitre aborde la caractérisation d'une autre propriété mécanique fondamentale : la rigidité du cytosquelette.

Pour ce faire, une méthode aujourd'hui bien établie est l'indentation par microscopie à force atomique (Atomic Force Microscopy, AFM). Cette méthode offre une très haute résolution verticale (subnanométrique) et horizontale (10-100 nm, en fonction de la sonde choisie). Le principe de l'AFM repose sur les forces intervenant entre les atomes du bout de la sonde (une pointe très fine à

l'extrémité d'un microlevier flexible) et ceux de la surface de l'échantillon. L'un des modes de fonctionnement les plus courants est le mode contact, où la pointe est approchée suffisamment de la surface de l'échantillon pour que le levier soit fléchi par les interactions interatomiques. Grâce à un scanner piézoélectrique, la sonde effectue un balayage latéral sur la zone de scan définie. L'intensité des interactions pointe/échantillon est détectée et amplifiée par un faisceau laser réfléchi sur la surface du levier, vers un détecteur photosensible. La variation de ce signal permet alors de remonter à la topographie de surface de l'échantillon. Un autre mode de fonctionnement possible est la spectroscopie de force, par indentation de l'échantillon en un point. Il en résulte une courbe de force dont il est possible d'extraire certaines propriétés mécaniques, dont la rigidité de l'échantillon. La détermination de cette propriété repose sur l'application d'un modèle de contact, tel que celui de Sneddon (cône/plan), sur la zone de contact de la courbe de force. Ce traitement est aujourd'hui directement intégré dans les logiciels de traitement de données des microscopes AFM. Il faut toutefois garder à l'esprit que le traitement des courbes de force à partir d'un modèle de contact standard ne permet la détermination du module d'Young que pour un matériau homogène et linéaire élastique. Dans le cas de la cellule, puisque le cytosquelette se trouve sous la membrane, la détermination de ses propriétés mécaniques nécessite d'implémenter un modèle d'indentation de la cellule en supplément, afin de remonter à la rigidité du cytosquelette par une approche inverse. Pour cette première étape expérimentale, on réalise néanmoins un traitement de courbes de force avec le modèle de contact de Sneddon, bien que l'échantillon ne soit pas homogène. Ce traitement permet d'obtenir un paramètre de rigidité cellulaire, à savoir la rigidité apparente de l'échantillon, incluant l'influence de la membrane et du cytosquelette.

En répétant le processus d'indentation sur l'ensemble des points d'une zone d'étude, dite zone de scan, on obtient un mode dynamique de nanoindentation, résultant de la combinaison des deux modes précédemment décrits. Pour le microscope utilisé (JPK NanoWizard 3), ce nouveau mode est nommé Quantitative Imaging (QI). Il s'agit d'un mode de contact intermittent, grâce à la mise en mouvement de la sonde selon un signal triangulaire (QI) au cours du scan, dont la fréquence est bien plus faible que celle de résonance du levier, afin de ne pas induire d'oscillation de celui-ci. Le levier se fléchit donc uniquement lorsqu'il entre dans la zone de contact avec la surface de l'échantillon, créant ainsi des points de mesure régulièrement espacés sur la zone de scan définie. Ce mode permet à la fois d'obtenir la morphologie 3D de la zone de scan et les courbes de forces effectuées en chacun des points de l'image. Généralement, entre 128x128 points et 256x256 points peuvent être enregistrés. L'ensemble des courbes de force relevées permet alors de réaliser la cartographie correspondante pour l'une des propriétés mécaniques choisies, comme dans le cas présent : la rigidité apparente de l'échantillon. Ce mode d'indentation dynamique ajoute donc une composante nanomécanique dans la caractérisation de la cellule en vue de caractériser les propriétés mécaniques du cytosquelette sous la membrane.

Concernant le matériel utilisé dans le cadre de la thèse, le scanner du microscope JPK NanoWizard 3 est limité à une zone de scan de 30x30 μm . Les travaux sont réalisés sur la base de cette dimension maximale, afin de visualiser la plus grande partie possible des cellules sélectionnées, car leur dimension dépasse largement les 100 μm de longueur. Par ailleurs, la limitation du déplacement vertical à 6 μm ne permet d'obtenir une image que sur les parties de la cellule les plus étirées, pour ne pas avoir de variation de topographie trop importante. Les images présentées dans les résultats ont

une résolution de 256x256 points, soit une résolution spatiale réelle de 117 nm. Cette étude est réalisée sur cellule vivante, avec les contraintes induites par le maintien d'un environnement contrôlé en température.

Par ailleurs, bien que la méthode AFM ait déjà démontré son potentiel pour l'étude des propriétés mécaniques de la cellule dans la littérature, la distribution des valeurs de rigidité mesurées à l'échelle du cytosquelette n'a pas encore été documentée pour les CML aortiques humaines. La publication présente donc un ensemble de données originales ouvrant la voie vers la mesure de la rigidité du cytosquelette de CML aortiques humaines saines et anévrismales, en vue de distinguer des éventuelles différences de leur état ou de leurs propriétés mécaniques. Deux lignées sont utilisées ici : la lignée commerciale saine de chez Lonza (AoSMC) (**Chapitre 3**) et la lignée anévrismale issue de culture primaire à partir de l'échantillon du deuxième donneur présenté au **Chapitre 4**. Elles servent à la préparation d'échantillons cellulaires sur hydrogels de rigidités 12 kPa et 25 kPa en boîtes de Pétri individuelles, et couverts de collagène pour renforcer l'adhésion cellulaire. Une fois que les cellules ont adhéré aux hydrogels, ceux-ci sont transportés en environnement contrôlé dans un incubateur portable jusqu'à l'équipement AFM, où les boîtes de Pétri sont placées sur une platine chauffante à 37 °C, en-dessous du support de sonde du microscope. Les cellules sont maintenues dans leur milieu de culture pendant toute la durée de l'expérience. Par ailleurs, une force d'appui faible leur est appliquée (2-5 nN), afin de ne pas les endommager, mais suffisante pour pouvoir garder un contact stable entre la pointe et l'échantillon.

Au total, 11 cellules saines et 10 anévrismales cultivées sur des gels à 12 kPa ont été utilisées dans les résultats, plus un groupe de 15 cellules saines sur gels à 25 kPa pour distinguer les effets de la rigidité du substrat. 2 gels de chaque rigidité sont également utilisés vides en tant que contrôles. Pour les images réalisées sur les cellules, un traitement d'image développé sur Matlab permet d'extraire seulement la zone correspondant à la cellule, afin de tracer la distribution des valeurs de rigidité apparente mesurées sans les mesures effectuées sur les zones de gel présentes. Ces distributions de valeurs sont modélisées par une loi Gamma dont les paramètres d'ajustement sont donnés dans les résultats. Les valeurs médianes issues de ce modèle servent de base à l'étude statistique entre les différents groupes étudiés.

En termes de résultats, on rappelle d'abord les composants de l'architecture interne de la CML aortique, illustrés à partir d'images de microscopie à fluorescence de cellules saines et anévrismales. La distribution des fibres d'actine semble renforcer davantage le pourtour des cellules anévrismales que des saines, créant ainsi un ensemble plus rigide et plus difficilement déformable. Viennent ensuite les résultats issus des mesures AFM, révélant tout d'abord sur la cartographie de rigidité apparente de la cellule un réseau fibreux sous membranaire, correspondant aux fibres d'actine du cytosquelette. Cette distinction est plus difficile à discerner sur l'image de morphologie correspondante, mais l'association de ces deux types d'images permet de localiser les composants sous la membrane cellulaire, et de voir que ces fibres ne présentent pas toutes la même rigidité (en supposant que la membrane cellulaire soit homogène sur l'ensemble). Dans le cas des cellules anévrismales, le maximum de rigidité apparente semble atteint sur le pourtour des cellules, où se trouve un réseau de fibres entrecroisées appelé cortex, servant à maintenir la forme de la cellule. Pour les cellules saines, la rigidité semble globalement plus faible, avec des fibres plus rigides au centre de la cellule et un pourtour plus élastique. Cette première observation laisse à penser que toutes les fibres d'actine ne

sont pas dans le même état de tension, et que les cellules saines semblent plus aptes à se déformer sous l'effet de leur contraction. La tendance est tout de même nuancée par une importante variabilité interindividuelle. Il faut également garder à l'esprit que l'image AFM offre un cliché à l'instant t de l'état de tension du cytosquelette, et que celui-ci peut varier dans le temps (**Chapitre 3**).

La distribution des valeurs de rigidité apparente pour toutes les cellules de chaque groupe étudié montre des similitudes, ce qui suggère que les cellules saines et anévrismales puissent comporter globalement la même architecture. Par ailleurs, la proximité des valeurs moyennes de chaque distribution avec la rigidité du gel à 12 kPa renforce l'hypothèse d'une valeur optimale pour l'état de tension cellulaire, ce qui va dans le sens de l'existence d'une homéostasie. Toutefois, la présence de plusieurs pics de rigidité est notée chez les cellules anévrismales. Ceci pourrait être expliqué par un phénomène de densification du cytosquelette en réponse à des conditions pathologiques.

Les hypothèses émises pour l'application du modèle de contact de Sneddon lors du calcul du paramètre de rigidité dite « apparente », à partir des courbes de force, constituent une des limitations majeures. En réalité, la cellule n'est pas homogène, ce qui ne permet pas de déduire directement la rigidité du cytosquelette par l'application d'un modèle de contact classique tel que celui de Sneddon. Elle ne présente également pas une réponse élastique linéaire de par sa viscosité. La viscosité implique également que la vitesse d'indentation influence la mesure de rigidité, notamment pour les fréquences élevées. Bien que la fréquence d'indentation soit relativement faible pour le mode QI (0.5-100 Hz), ces effets restent à étudier. Un deuxième point important demeure la prise en compte des effets de la dynamique cellulaire, car le temps qu'une image AFM se fasse (20-30 min), le cytosquelette est soumis à des phénomènes d'assemblage/désassemblage bien plus rapides (quelques minutes). Par ailleurs, l'hydrogel ne représente pas parfaitement la réalité de l'environnement *in vivo* des CML en termes ni de biochimie, ni de rigidité, mais l'objectif était d'homogénéiser les conditions pour tous les groupes étudiés. Enfin, la taille des échantillons gagnerait à être étendue dans un futur proche.

3. Contenu de la publication

Subcellular Elastography of Human Aortic Smooth Muscle Cells

Petit, C.¹, Karkhaneh Yousefi, A.–A.¹, Barnier, V.², Avril, S.¹

¹Mines Saint-Etienne, Université de Lyon, INSERM, U 1059 SAINBIOSE, F - 42023 Saint-Etienne France

²Mines Saint-Etienne, Université de Lyon, CNRS, UMR 5307 LGF, F - 42023 Saint-Etienne France

Submitted to *ASME Journal of Biomechanical Engineering*

3.1. Abstract

Aortic Smooth Muscle Cells (SMCs) play a vital role in maintaining mechanical homeostasis in the aorta. We recently found that SMCs of aneurysmal aortas apply larger traction forces than SMCs of healthy aortas. This result was explained by the fact that synthetic SMCs with a bigger size are more frequently found in aneurysms. In the present study, we investigate whether the cytoskeleton stiffness of SMCs is also altered in aneurysmal aortas. For that, we use Atomic Force Microscopy (AFM) nanoindentation with a specific mode that allows subcellular-resolution mapping of the local stiffness properties across a specified area of the cell membrane. Aortic SMCs from a commercial human lineage (AoSMCs, Lonza) and primary aneurysmal SMCs (AnevSMCs) are cultured in conditions promoting the development of their contractile apparatus, and seeded on hydrogels with stiffness properties of 12kPa and 25kPa. Despite some regional variations of stiffness properties across the cytoskeleton, each cell population cultured on 2D substrates exhibits an average stiffness of about 12 kPa, independently of the substrate stiffness or of the cell lineage. Morphology images also reveal similar dense actin networks for each cell population. We conclude that the cytoskeleton stiffness tends to be maintained in SMC of aneurysmal aortas.

Conflict of interest: none

Keywords: Cell biomechanics · Ascending Thoracic Aortic Aneurysm (ATAA) · Mechanotransduction · Smooth Muscle Cells (SMC) · Fluorescent Microscopy (FM) · Atomic Force Microscopy (AFM) · Nanoindentation

3.2. Introduction

Aortic Smooth Muscle Cells (SMC) are known to be very sensitive to their microenvironment. Under physiological conditions, mature SMCs remain quiescent and partially contracted, maintaining a basal tone which contributes to stress homeostasis in the aortic wall (Crosas-Molist et al., 2015; Humphrey, 2002; Mao et al., 2015; Mecham and Schwartz, 1995; Michel et al., 2018; Thyberg et al., 1997). Within pathologies such as Ascending Thoracic Aortic Aneurysm (ATAA), genetics (Brownstein

et al., 2017; Chen et al., 2007; Gillis et al., 2013; Guo et al., 2007; Kuang et al., 2012; Milewicz et al., 2016; Papke et al., 2015; Regalado et al., 2015; Schildmeyer et al., 2000), hemodynamics (Choudhury et al., 2009; Pasta et al., 2013) or biomechanics (Brownstein et al., 2017; Humphrey et al., 2015; Isselbacher, 2005), clearly influence the cell phenotype, namely: proliferation, migration, and synthesis of ECM components, or even apoptosis (Humphrey, 2002; Li and Xu, 2007; Mao et al., 2015; Mecham and Schwartz, 1995; Owens et al., 2004; Riches et al., 2018; Thyberg et al., 1997). The fraction of SMCs with a synthetic phenotype tends to increase at the expense of SMCs with a contractile phenotype (Cox and Erler, 2011; Hayashi et al., 2012; Hong et al., 2014; Humphrey, 2002; Humphrey et al., 2015; Lacolley et al., 2012; Mecham and Schwartz, 1995; Michel et al., 2018; Petit et al., 2019c), which results in tissue remodeling (Arribas et al., 2006; Hayashi et al., 2012; Humphrey, 2002; Tsamis et al., 2013). During remodeling, SMCs synthesize collagen fibers to reinforce the media layer of the aortic wall (Humphrey, 2002; Rubbia and Gabbiani, 1989; Thyberg et al., 1997). However, the induced permanent stiffening can make the aortic wall more vulnerable to rupture (Choudhury et al., 2009; Hayashi and Naiki, 2009; Isselbacher, 2005; Lacolley et al., 2012; Tremblay et al., 2010).

Although the effects of these changes are more and more well known at the tissue level, they remain unclear at the subcellular level. In fact, SMCs sense their environment thanks to specific mechanoreceptors that induce complex chain reactions (Chen et al., 2007; Goffin et al., 2006b; Lacolley et al., 2012; Li and Xu, 2007; Milewicz et al., 2016; Somlyo and Somlyo, 1994). Synthetic SMCs are less responsive to vasoactive stimuli and cannot contribute to mechanotransduction as actively as contractile SMCs (Chen et al., 2007; Humphrey et al., 2015; Karnik, 2003; Owens et al., 2004; Rubbia and Gabbiani, 1989; Schildmeyer et al., 2000; Stadler et al., 1989; Thyberg et al., 1997; Wanjare et al., 2013a).

Atomic Force Microscopy (AFM) is a scanning microscopy technique (Hegner M. and Guntherodt H.-J., 2001; Mironov, 2014) providing nanometer-scale imaging of biomolecular interactions in the cell membrane and its cytoskeleton (Hamon et al., 2010; Whited and Park, 2014). Thanks to its assets, AFM has become commonplace in cell biomechanics (Gavara, 2017; Müller and Dufrêne, 2011; Thomas et al., 2013; Vahabi et al., 2013). Standard AFM modes for mechanical investigation are based on nanoindentation, by achieving at least one approach-retraction cycle of the tip onto the sample surface and by recording the corresponding tip deflections. Nanoindentation was previously used in single-point and successive measurements on a single cell (Calzado-Martín et al., 2016; Cartagena-Rivera et al., 2015; Crosas-Molist et al., 2015; Rigato et al., 2015; Sirghi, 2010; Zhu et al., 2018). For successive measurements and corresponding nanomechanical mapping, novel AFM modes were recently developed. They extend the traditional Force-Volume mode that operates in quasi-static. For instance, the PeakForce™ and Quantitative Imaging™ (QI™) modes operate a sinusoidal motion, which allows intermittent contact between the tip and the sample surface (JPK Instruments AG, n.d.; Pittenger et al., 2014). However, since AFM is a contact technique, subcellular characterization, as for instance exploration of the actin network in the cytoskeleton, requires to adjust the applied force (i.e. the setpoint) in order to induce deformations of the cell components under the membrane without damaging the cell (Petit et al., 2019b; Roudit et al., 2012).

AFM nanoindentation was seldom used to characterize aortic SMCs or their surrounding extracellular matrix. It was reported that SMCs have an increased stiffness in case of hypertension (Sehgel et al., 2013), aging (Qiu et al., 2010; Sehgel et al., 2015) and Marfan Syndrome (Crosas-Molist

et al., 2015). It was also shown that cell stiffness and adhesion are increased with vasoconstrictor agonist Angiotensin II (Hong et al., 2015) or intracellular concentration of calcium ions ($[Ca^{2+}]_i$) (Zhu et al., 2018). Using AFM indentation with a large tip at the tissue level and a sharp tip at the fiber level, it was found that the aortic wall microarchitecture is stiffer and interconnections between ECM fibers are missing in case in ATAA (Lindeman et al., 2010). However, these previous studies never achieved subcellular characterization of the actin network in the cytoskeleton of living aortic SMCs.

Moreover, we recently found that primary SMCs of aneurysmal aortas usually apply larger traction forces than primary SMCs of healthy aortas (Petit et al., 2021). We explained this result by the bigger size of synthetic SMCs, which are more frequently found in aneurysmal aortas. Due to the development of their synthetic organelles (Owens et al., 1981), synthetic SMC may tend to become hypertrophic. The effects of these variations on cytoskeletal stiffness have never been investigated. Only (Crosas-Molist et al., 2015) compared the stiffness of healthy and aneurysm SMCs. Therefore, there is a pressing need to investigate more precisely the stiffness distribution across the cytoskeleton of healthy and aneurysmal aortic SMCs.

In this study, we address this need using AFM nanoindentation on individual living human aortic SMCs, from healthy and aneurysmal lineages, and derived regional variations of their cytoskeleton stiffness. After describing the methodology, we report the measured force displacement curves and the deduced maps of stiffness parameters across the cytoskeleton of about 10 healthy SMCs and 10 aneurysmal SMCs. We finally discuss the obtained results with respect to the cytoskeletal biomechanics and tensional state.

3.3. Material and methods

3.3.1. Healthy and aneurysmal cell lineages

Two types of SMCs were used for this study:

1. A commercial human lineage, named AoSMC onwards, from the primary culture of a healthy aorta from a 30 years old female donor was purchased from Lonza at passage 3. The cells were cultured for initial proliferation in a growth medium (SmGM-2, Lonza). Then, we stored the AoSMCs at passage 5 into liquid nitrogen. In each aliquot, about 3 million cells remain in 1.5mL of a freezing solution containing 10% FBS, 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO) as a cryoprotectant, and 80% SmGM-2 complete medium.

2. The aneurysmal lineage, named AnevSMC onwards, was developed in our laboratory (Petit et al., 2021). AnevSMCs were extracted from an Ascending Thoracic Aortic Aneurysm (ATAA) tissue collected after informed consent during surgical aneurysm repair. They were extracted from a 69 years old male patient (Petit et al., 2021). Several aliquots of each aneurysmal lineages at passage 2 were stored in liquid Nitrogen.

After thawing, the cells were transferred into a T-75 flask for an entire week in growth medium (SmGM-2, Lonza). Incubating the culture dishes at 37°C and 5% CO₂ is necessary to maintain the pH at 7.2-7.4. Then, the SMC were cultured one week more in a basal medium (SmBM, Lonza), containing low (2%) FBS and 0.04% heparin, according to the manufacturer's instructions in order to preserve a contractile phenotype. Once they reached 50-70% confluence, we used a standard cell detachment protocol using a trypsin treatment with a low trypsin – EDTA solution (0.025% Trypsin and 0.75mM

EDTA (1X), Sigma) to break down the focal adhesions in the culture dish without damaging the cells. Then, the cells in suspension could be used for subculturing or for sample preparation. In our study, AoSMCs were seeded onto the sample surface at passages 5-6 and AnevSMCs at passages 3-4.

3.3.2. Sample Preparation and Staining

For further comparison with AFM images and localization of the cell components under the membrane, we started to observe the cell internal architecture with fluorescent microscopy. We used fluorescent staining on fixed AoSMCs and AnevSMCs adhering to fibronectin-coated Petri dishes, prepared similarly to coated flasks (Appendix S5.1). We stained the nucleus, filamentous actin (F-actin), and Alpha Smooth Muscle Actin (α -SMA), the latter being specifically expressed by SMCs. Details about the staining protocol and about fluorescent dyes are provided in Appendix S5.2.

For each AFM measurement campaign, one aliquot of both Ao- and Anev- SMCs was previously cultured in conditions promoting the development of SMC contractile apparatus (as explained in subsection 3.3.2). Then, the cells were seeded in Petri dishes made of plates containing ready-to-use hydrogels of a given stiffness value (Cell Guidance System, PetriSoft™ 35, collagen pre-coated, 12kPa and 25 kPa).

In order to assess the influence of both disease (ATAA) and substrate stiffness on the subcellular stiffness, we considered three groups for the present study, namely:

1. AoSMCs on 12 kPa gels (Group 1),
2. AnevSMCs on the same stiffness (Group 2),
3. and AoSMCs on 25 kPa gels (Group 3).

Our previous studies on SMCs showed that AoSMCs apply maximum traction forces on hydrogels of the 12 kPa stiffness value (Petit et al., 2021). These hydrogels were made of a 400 μ m-thick layer of polyacrylamide, with a type I collagen coating added during the manufacturing process that provides a physiological surface for cell adhesion and culture. An amount of 50 000 cells were seeded in each well and incubated in basal medium for two days before AFM nanoindentation experiments. This duration was sufficient to ensure that SMCs spread and apply maximal tractions.

3.3.3. AFM indentation of individual SMCs in liquid

We used a JPK Nanowizard® 3 AFM, equipped with a heating stage (HTHS™) that is set at 37°C, and JPK Data Processing software (V.6.1.118). We calibrated HQ:CSC17/Cr-Au BS probes before our AFM measurements (Table 5.1). The calibration consists of two steps: 1. calibration of the sensitivity while measuring the deflection on a hard material (glass slide in our case), and 2. calibration of the spring constant by thermal tuning. We also chose an uncoated tip having a significantly lower radius of curvature, which increases the lateral resolution for AFM images.

Table 5.1: AFM tip reference and characteristics

Experiment	Tip reference	Radius of curvature	Spring constant k
Cells on 12 kPa gels	HQ:CSC17/Cr-Au BS	8 nm (uncoated)	0.21 N/m
Cells on 25 kPa gels	HQ:CSC17/Cr-Au BS	8 nm (uncoated)	0.26 N/m
Empty gels	HQ:CSC17/Cr-Au BS	8 nm (uncoated)	0.25 N/m

Due to the limited volume accessible with the AFM tip (approximately $30 \times 30 \times 6.5 \mu\text{m}^3$), particular attention was paid to the choice of the scan area (region of interest: ROI). SMCs were averagely 200-300 μm long and 5-10 μm wide. We chose the ROI far enough from the SMC nucleus, in order to limit the variations of height. This also permitted to investigate regions near focal adhesions, which are known to play an important role in mechanotransduction (Goffin et al., 2006b).

Once removed from the incubator, the Petri dishes containing our cell cultures were stored in a portable incubator (Darwin Chamber, NQ09P) set at 37°C in order to maintain the temperature constant during transport until the AFM platform and until the equipment was set to the right parameters. The purpose was to minimize the experiment duration and to avoid cell damage. The Petri dish was also maintained at 37°C. We added a drop of culture medium on the AFM probe before approaching it to the sample until the drop and the bath create a meniscus. We first performed a soft approach by engaging the tip using the standard automatic process. Once the engagement was achieved, we withdrew the tip and moved the sample in order to select the ROI.

At every point across the ROI, we employed the QI™ mode to assign vertical motions of the AFM tip and to measure the vertical force resulting from the elastic response of the nanoindented surface. We found that the setpoint should remain below 5 nN in order to avoid damaging the cell and a minimum setpoint of 2 nN is needed to induce a sufficient deformation of the cytoskeleton. The precise setpoint values for each investigated cell are given in Table 5.2. The setpoint is the reference force for both height (morphology image) and indentation depth. It is the maximal applied force: once the setpoint is reached while indenting the surface, the AFM tip is retracted. The size of the ROI ($30 \times 30 \mu\text{m}$) was always set to $30 \times 30 \mu\text{m}^2$. We increased progressively the image resolution from 128x128 points (low resolution mapping) to 256x256 (for high-resolution mapping). The indentation speed was set at 200 or 250 $\mu\text{m}/\text{s}$ in constant speed configuration. The measurement was performed in the Z-closed loop configuration in order to correct the piezo nonlinearity and hysteresis during the z movement.

Table 5.2 Setpoint values (F , in nN) set for each indented cell from the different groups : A) AoSMCs adhering on 12kPa hydrogels, B) AnevSMCs adhering on 12kPa hydrogels, C) AoSMCs adhering on 25kPa hydrogels.

F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
A	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3				
B	2	2	2	3	3	3	3	3	2	4					
C	5	3	3	5	5	3	3	3	3	5	4	5	3	3	5

3.3.4. Mechanical model of the indented cell

Although the cell is heterogeneous, we simply derived an apparent contact stiffness at every nanoindentation point, which merges the contribution of both the membrane and the cytoskeleton in a structural stiffness parameter. Deriving local material stiffness parameters of the different cell compartments would require inverse methods.

To derive the local apparent structural stiffness, we used the Sneddon contact model between a cone and an elastic half-space (Poon et al., 2008). We assumed that the cell has a linear elastic behavior with negligible adhesive interactions between the AFM tip and the cell in liquid (Poon et al., 2008; Thomas et al., 2013). The cell is also assumed as incompressible, similar to soft gel-like materials (Lin et al., 2007). More details about the theory can be found in (Sirghi, 2010).

The position z of the tip was first converted into an indentation depth δ such as,

$$\delta = z - \frac{F}{k} , \quad (1)$$

where $\frac{F}{k}$ represents the probe deflection due to the applied force F , and k is the spring constant of the cantilever. This operation was automatically performed by the JPK Data Processing software.

The eventual relationship between F and δ according to the Sneddon contact model is,

$$F = \frac{2}{\pi} \frac{E}{(1 - \nu^2)} \tan\alpha \delta^2 , \quad (2)$$

where ν is the Poisson's ratio ($\nu=0.5$), α is the half-angle of the tip ($\alpha=20^\circ$ for a HQ:CSC17 tips) and E is the "apparent" stiffness of the cell.

By adjusting the indentation curve obtained experimentally with Eq. 2, we obtained the apparent stiffness at every indented point of the ROI. This adjustment was achieved with a standard least squares method, which minimizes the sum of squares of errors at all the N data points throughout force application, according to,

$$S(E) = \sum_{i=1}^N \left(F_{exp}(\delta_i) - F_{mod}(\delta_i; E) \right)^2 , \quad (3)$$

where F_{exp} is the measured force and F_{mod} is the calculated force for the same δ . The solution is obtained by minimizing $S(E)$ such as:

$$E = \frac{\pi(1-\nu^2)}{2 \tan \alpha} \left(\frac{\sum_{i=1}^N \delta_i^2 F_{exp}(\delta_i)}{\sum_{i=1}^N \delta_i^4} \right) \quad (4)$$

3.3.5. Data processing

The force-displacement curves obtained at each measurement point were used to reconstruct two maps: a map of the height when the setpoint force is applied (called further the morphology map) and a map of the local apparent stiffness (called further the stiffness map). The procedure was performed on 11 AoSMCs adhering onto 12 kPa gels, 10 AnevSMCs adhering onto 12 kPa gels, and 15 AoSMCs adhering onto 25 kPa hydrogels. The total number of measurements is reported in Table 5.3.

In order to reconstruct the morphology and the stiffness maps, the 256x256 raw force-displacement curves across the scanned area were processed with the JPK SPM software, using a program called “Hertz fit”, which consists of the following steps:

- Adjustment of the sensitivity and spring constant of the tip
- Selection and adjustment of the baseline (adjustment of the Y-axis offset). The function automatically calculates the average value of the selected area (by user), and subtracts it to the whole curve (Fig. 5.1).
- Determination of the contact point: adjustment of the X-axis offset. The function automatically calculates the point where the force curve crosses the baseline and sets this as the zero of the X-axis.
- Calculation of the vertical tip position by subtracting the cantilever deflection to the scanner height according to Eq. 1
- Determination of the local apparent stiffness E according to Eq. 4.

Although these steps are automatic, we checked if the force displacement curves were correctly adjusted on randomly drawn examples. Each curve consisted of a baseline representing the origin of the Y-axis where the force remains null, and a contact area (in orange on Fig. 5.1), where the force increases with the indentation depth, until the maximal applied force (the setpoint of 2nN, in yellow on Fig. 5.1). After deriving the apparent stiffness parameter according to Eq. 4, the force-displacement curve predicted by the model was deduced (in green in Fig. 5.1).

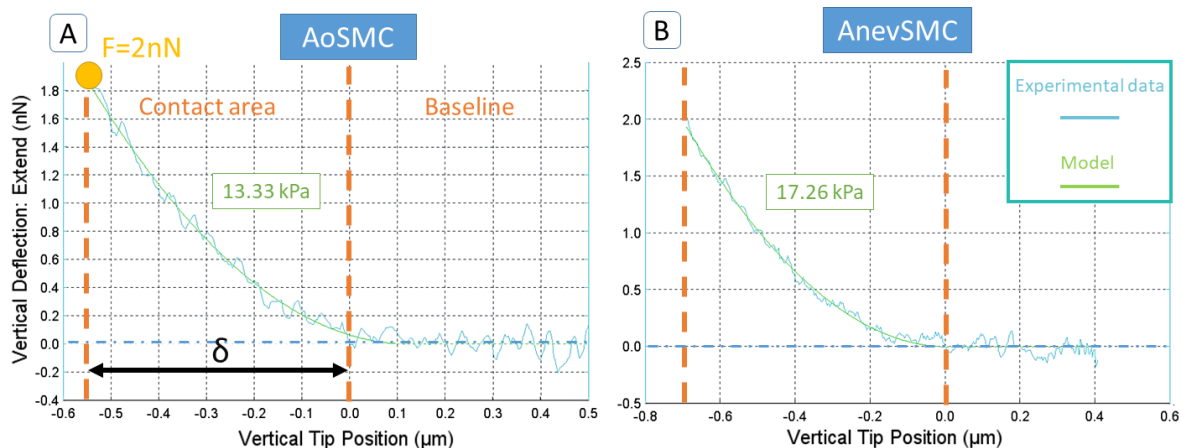


Figure 5.1 Force curves obtained from the indentation experiments on AoSMC (A) and AnevSMC (B). The experimental data (blue curve) is fitted with the Sneddon model (green curve). These curves are obtained at a point of the corresponding AFM images representing the apparent stiffness parameter. The corresponding apparent stiffness value is written in green on each graph. The maximal applied force F (setpoint) is 2nN. The δ parameter is the maximum indentation depth reached at the setpoint force of 2nN, which is used to reconstruct the morphology maps (Fig. 5.3E and F). The baseline corresponds to the contactless part of the force curve: it is used to define the zero of the Y-axis.

After completing the derivation of the apparent stiffness and baseline height at every point of the ROI, the results were exported as JPK data file, which can be opened in JPK SPM or Gwyddion software for further processing. We eventually applied a background correction in order to remove some local defects. For that, we fitted a plane (linear in our case) to the selected area and subtracted this from the measured data to detect these defects. Another function called “Remove Lines” was also useful for correcting the lines where the tip stuck to the surface and then pulled off, leaving streaks in the image. This function replaced the selected lines by the average of the neighboring scan lines. After these cleaning procedures, data (arrays of baseline heights and apparent stiffness values) were eventually exported to Matlab for statistical analyses.

In Matlab, a filter was applied to separate points which belong to the gel and points which belong to the cell. Points belonging to the gel were defined as points with a baseline height below 1 μ m and an apparent stiffness below 25kPa for the 12kPa gel and below 50 kPa for the 25 kPa gel. After separation of the gel and cell areas across the ROI, we processed separately the height and stiffness values of each area to display histograms and perform statistical analyses.

Histograms, which represent the distribution of the apparent stiffness values, consisted of 100 bars equally distributed over the range 0-45 kPa. The median value was reported as a vertical line on these histograms.

Table 5.3: Total number of nanoindentation points for the two cell lineages and for empty gels

	AoSMC	AnevSMC
12 kPa	11 cells 220279 points	10 cells 206915 points
25 kPa	15 cells 382292 points	-

3.3.6. Statistics

According to the obtained distributions of apparent stiffness values, a Gamma distribution was considered, which may be written:

$$P(x) = \frac{1}{b^a * \Gamma(a)} * x^{a-1} * e^{-\frac{x}{b}} \quad (5)$$

where Γ is the Gamma function, a is the shape parameter, b is the scale parameter, x is the variable of interest and $P(x)$ is its probability distribution.

We performed a statistical analysis on the individual median values and on the a and b -parameters. The results for each group of tested cells were represented as boxplots using a Matlab script. To compare the groups, we used the non-parametric Mann-Whitney test based on the null hypothesis of equal medians while comparing two populations. A p-value under 0.05 indicates that the test rejects the null hypothesis at the 5% significance level.

3.4. Results

3.4.1. Comparison of the stiffness distributions

- *Stiffness distribution across single cells*

In Fig. 5.2, we show the distribution of apparent stiffness of a representative cell of each group. The distributions look similar whatever the lineage and the substrate stiffness (Fig. 5.2). Nevertheless, the whole set of data given in Appendix S5.2 and S5.3 reveals a high variability between cells from the same group in terms of median apparent stiffness values. The full statistical analysis including individual median values and the parameters of the Gamma fitting are reported in Appendix S5.3. The Gamma function shows a very good agreement with these distributions of apparent stiffness values, although group 3 seems to deviate slightly (the median a -parameter values are also slightly higher for group 3 than the two other groups). The statistical test showed that there was no significant difference between the three groups (Appendix S5.3).

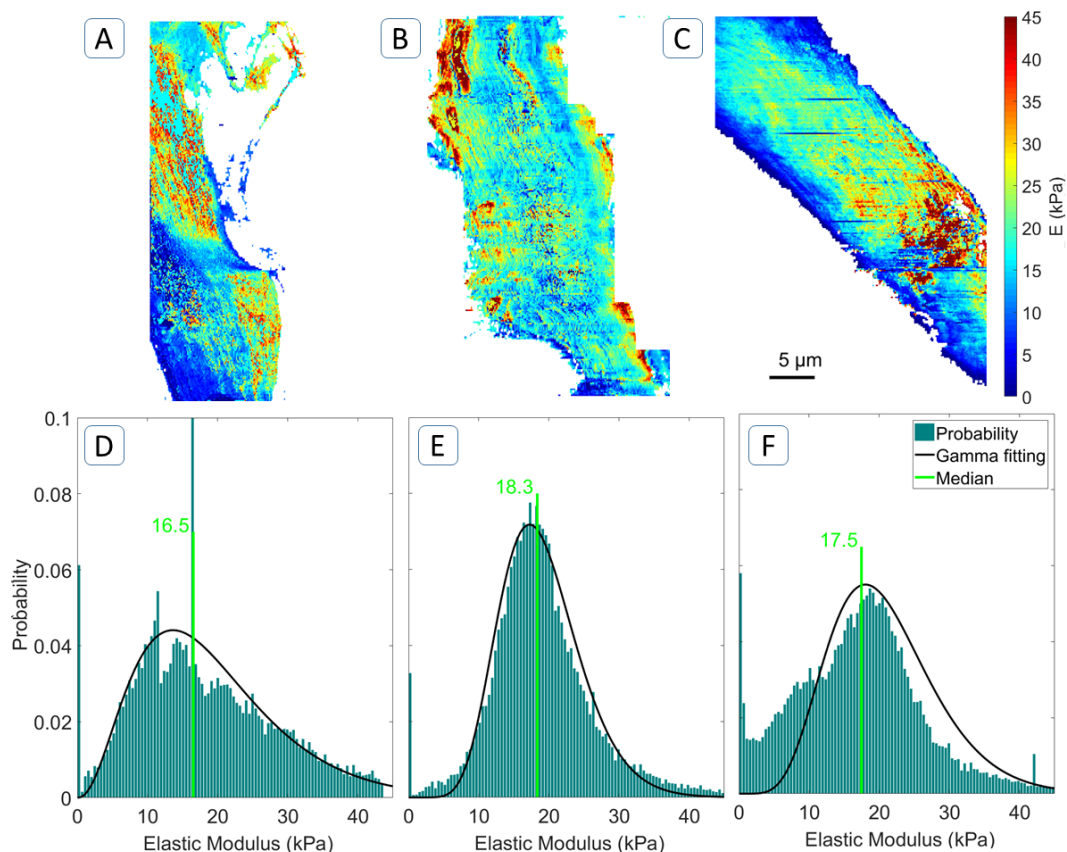


Figure 5.2 Apparent stiffness maps and corresponding histograms for an isolated AoSMC (A,D) (setpoint 2nN, speed 200μm/s, 38712 points) and AnevSMC (B,E) (setpoint 4nN, speed 250μm/s, 30688 points) on 12kPa gels, and AoSMC (C,F) on 25kPa gel (setpoint 4nN, speed 250μm/s, 34933 points). In (F), the first values are removed until $x=8.77$ (equivalent to the first 20 bars) in order to obtain a better fitting. Stiffness range: 0-45 kPa, 100 bars. The median values are shown as a green vertical lines. The black curve represents the fitting with a Gamma distribution (Parameter values are given in Table 5.4). The full set of data is reported in Appendix S5.2.

Table 5.4: Parameters of the Gamma distribution for the three individual SMCs chosen in each group (Fig. 5.2).

	a	b
AoSMC, 12kPa	3.42	5.61
AnevSMC, 12 kPa	10.80	1.76
AoSMC, 25 kPa	6.59	3.11

- *Differences between the different groups of cells*

For each group of cells, we pooled the obtained stiffness values together in order to obtain the complete distribution of values across the whole group. Results are shown in Fig. 5.3. The Gamma function shows a very good agreement with these distributions of apparent stiffness values. Globally, this analysis showed that the median of the whole population of individual median values is almost the same for the three groups, independently from the substrate stiffness and the pathology, and despite the very large number of indentation points for each group (more than 200,000). The statistical test shows there is no significant difference between the three groups (Appendix S5.3). The obtained parameters of the Gamma function are also very similar for each group (Tab.5.5).

The three groups present a median close to 12 kPa. Interestingly, we found that SMCs of different lineages tend to express maximal traction forces when they are cultured on gels of 12 kPa stiffness (Petit et al., 2021, 2019a).

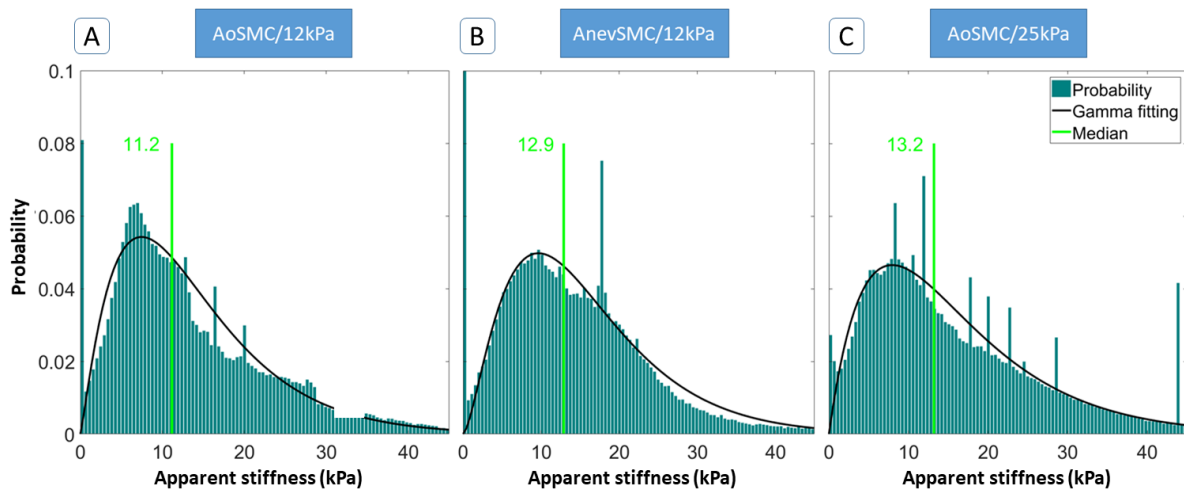


Figure 5.3 Histograms showing the distribution of the apparent stiffness values measured on the whole population of cells from both Ao- (A) (N=11, 220279 points) and Anev- (B) (N=10, 206915 points) SMCs on 12 kPa gels and AoSMCs on 25kPa gels (C) (N=15, 382292 points). The black curve corresponds to the fitted Gamma distribution (Parameter values are reported in Table 5.5). The green vertical line indicates the median value. Stiffness range: 0-45 kPa, 100 bars.

Table 5.5: Parameters of the Gamma function for the distribution of the whole apparent stiffness values measured on all the cells from the three groups (Fig. 5.3).

	a-parameter	b-parameter
AoSMC, 12kPa	2.18	6.32
AnevSMC, 12 kPa	2.61	6.01
AoSMC, 25 kPa	2.01	7.88

3.4.2. Localized differences of apparent stiffness values

- *Apparent stiffness maps*

The obtained apparent stiffness maps reveal heterogeneities across the whole cell. A dense fibrous network is particularly clear at the extremity of the cells, where it is thinner and crisscrossed near the lamellipodium (Fig. 5.4). The structure under the membrane appears clearly, showing the trace of stress fibers, in the apparent stiffness mapping (Fig. 5.4C and D). The structure is revealed with a higher contrast than morphology images (Fig. 5.4E and F). Interestingly, the AFM images of the given AoSMC show a lamellipodium-like substructure on the thinnest region (upper region on Fig. 5.4C and E). We also noticed a stiffer and uniform layer around the AnevSMC (Fig. 5.4D). The full set of data is shown in Appendix S5.1.

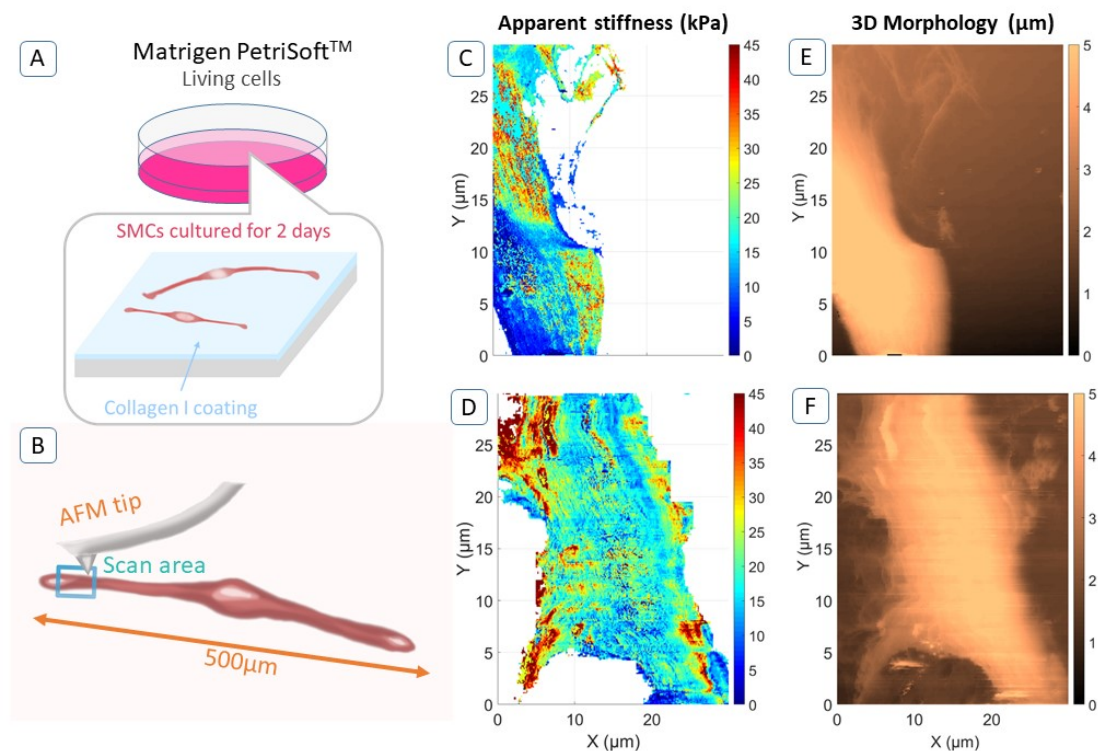


Figure 5.4 The Matrigen 35 mm Petri dishes contains a hydrogel that is already covered by a collagen I pre-coating on which SMCs adhere naturally after seeding (A). The tested stiffness values are 12 kPa, and 25 kPa. A scan area was chosen close to the tip of individual SMCs (B). AFM images of apparent stiffness mapping (C,D) and morphology (E,F) for an isolated AoSMC (C) (256 px/30μm, setpoint 2nN, speed 200 μm/s) and AnevSMC (D) (setpoint 4nN, speed 250μm/s) adhering on a 12 kPa collagen-coated hydrogel. The full set of data is given in Appendix S5.1.

- *Cytoarchitecture*

Fluorescent imaging of cells from both cell lineages showed that the SMC cytoskeleton is composed of a complex fibrous network, whose density is not the same across the whole cell volume. This is due to the existence of different actin substructures (Fig. 5.5A). Actually, the actin network is particularly dense in the lamellipodium near the focal adhesions of the cell, and forms long stress fibers linking focal adhesions together or linking focal adhesions to the nucleus. A crisscrossed arrangement of actin fibers was noticed in the lamellipodium, both for the AnevPrim (Fig. 5.5B) and the AoSMC lineage (Fig. 5.5C). Conversely, in lateral regions, the actin stress fibers were closer and parallel to each other, forming thick bundles at each side of the cells. Moreover, as shown in Fig. 5.4D, specific concentrations of actin filaments (at the bottom end) indicate the formation of the cortex to maintain the cell shape.

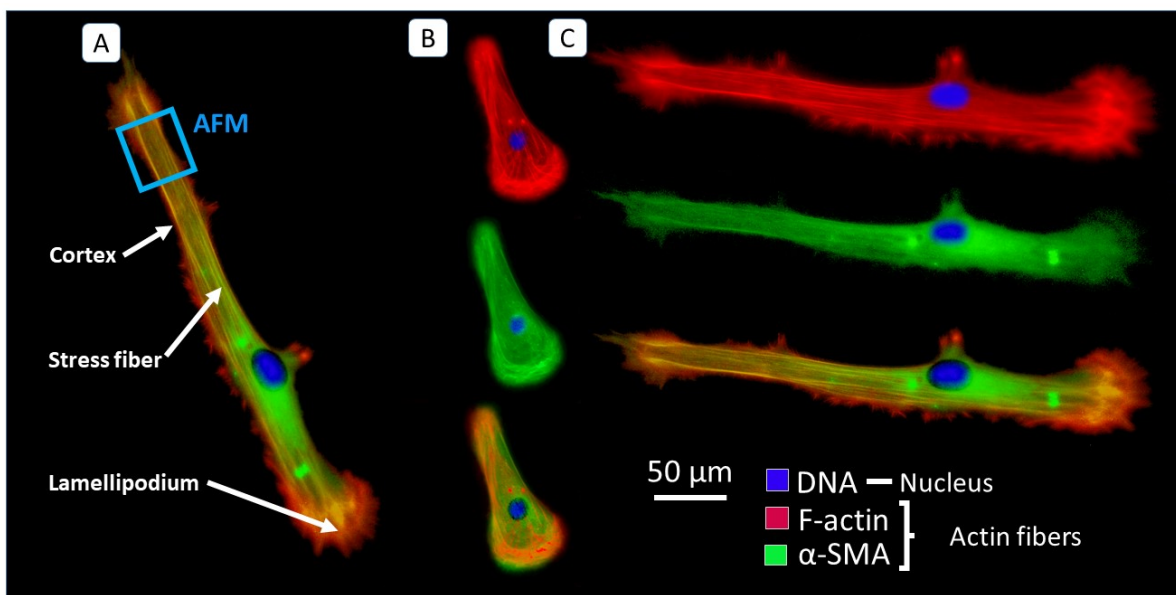


Figure 5.5 Fibronectin-coated Petri dish containing adhering SMCs (fixed) and schematic of a single SMC adopting a natural elongated shape (A). Observation of cell internal architecture for an isolated aneurysmal (B) and healthy SMC (C) at passage 4 and 6 respectively. Corresponding fluorescent channels are: DAPI (DNA, nucleus), DsRed (F-actin), and GFP (α -SMA). Microscope Axio Observer.Z1/7, Objective LD Plan-Neofluar 20x/0.4 Korr Ph2 M27.

3.5. Discussion

3.5.1. Subcellular exploration of the cytoskeletal structure and biomechanics

Aortic Smooth Muscle Cells (SMCs) play a vital role in maintaining mechanical homeostasis in the aorta. We recently found that SMCs of aneurysmal aortas apply larger traction forces than SMCs of healthy aortas (Petit et al., 2021, 2019a). This result was explained by the fact that synthetic SMCs with a bigger size are more frequently found in aneurysms. In the present study, we have investigated whether the cytoskeleton stiffness of SMCs is also altered in aneurysmal aortas. For that, we have characterized for the first time the local apparent stiffness distribution across the cytoskeleton of human aortic primary SMC (healthy and aneurysmal origin) and we have found similar distributions of stiffness whatever the SMC origin and culture condition.

➤ *SMC cytoarchitecture*

AFM nanoindentation was seldom used to characterize aortic SMCs or their surrounding extracellular matrix (Crosas-Molist et al., 2015; Qiu et al., 2010; Sehgel et al., 2015, 2013). Generally, because of their relatively poor contrast, the morphology images obtained by AFM do not reveal all the details of the cytoarchitecture under the membrane (Petit et al., 2019b). Previous work also showed that soft biological objects behave like stiff materials while they undergo a high frequency excitation (Braunsmann et al., 2014; Morkvėnaitė-Vilkončienė et al., 2013). However, we found suitable settings for scanning parameters, notably by adjusting the setpoint and the speed of the AFM tip. Despite the acquisition time of 20-30min, we obtained clear morphology and mechanical mapping images of isolated Ao- and Anev- SMCs and this enabled to distinguish clearly the fibrous actin network, and even to identify different substructures. These observations were confirmed with fluorescent microscopy imaging, which highlighted the non-uniform organization of actin fibers inside the cell. Two features appeared clearly in the SMC cytoskeleton: the lamellipodium where the cells develop an anchorage to their substrate, and the stress fibers which were denser laterally. The crisscrossed network of lamellipodium and parallel organization of stress fibers were present in both Ao- and Anev-SMCs.

➤ *About cell dynamics*

Our results also revealed regional variations of the mechanical properties at the subcellular scale, which may be explained by the different actin structures existing in the cytoskeleton (Chalut and Paluch, 2016; Haase and Pelling, 2015). We can also suppose that all the stress fibers are not equally recruited in both cases, as a non-uniform tensional state seem to exist in the cytoskeleton. A possible explanation could be that the acto-myosin complexes are not activated simultaneously (Lohner et al., 2019). Aortic SMCs always remain partially contracted (Koeppen and Stanton, 2009), but the traction forces are regulated dynamically (Bangasser et al., 2013; Chan and Odde, 2008). Two components are required for traction force initiation, namely contractile elements fixed at each end to a strong anchorage to the ECM (i.e. the focal adhesion (Lacolley et al., 2018a)). According to the motor-clutch model, which was shown to predict correctly the distribution of traction forces in aortic SMCs (Petit et al., 2021, 2019a), a number of clutches are engaged at a given moment, which induces that traction forces are transmitted from the focal adhesion to the substrate. This also ensures cell adhesion. Each clutch has a given lifetime, and the probability to unbind over durations of several minutes follows an exponential law (Bangasser et al., 2013). Some clutches can also unbind while they reach some rupture

force. The number of engaged clutches therefore varies constantly and therefore there is a dynamic regulation of tensions in the cytoskeleton. This may induce regional variations across the AFM images.

➤ *Biophysical meaning of the Gamma law*

Despite the regional variations of the apparent stiffness across the cell, we found that the distributions always satisfied a Gamma distribution. The use of Gamma distribution is also consistent with a motor-clutch model with successive cycles of binding/unbinding (Chan and Odde, 2008). Indeed, the Gamma distribution is classically used to describe the probability of several random events (Belikov, 2017), and predicts well the probability of failure of materials (Mannan, 2012).

3.5.2. Mechanical response of healthy versus aneurysmal SMCs

The obtained nanoindentation data revealed similar distributions of stiffness values for AnevSMC and for AoSMC (Fig. 5.3). Interestingly, in our previous work, AnevSMC showed significantly higher traction forces than healthy cells, which was explained by a hypertrophy of AnevSMCs (Petit et al., 2021). We concluded that phenotype changes occurring in ATAAs, which were previously known to reduce the expression of elongated and contractile SMCs (rendering SMCs less responsive to vasoactive agents), tend also to induce stronger SMCs. Therefore, the stiffness seems not to be linked to the tensional state of the cells. Another suggestion may be that aneurysmal cells may present a densification of their cytoskeleton. This will be verified in future studies.

➤ *Comparison of cytoarchitecture for healthy and aneurysmal cells*

Fluoroscopic imaging showed that aneurysmal and healthy cells may present globally the same cytoarchitecture (Fig. 5.5) but with localized differences resulting in higher stiffness values.

The presence of a stiff and uniform area around the AnevSMC, where fibers are not individually distinguishable (Fig. 5.4), may suggest a dense cortex-like actin structure that maintains the cell shape (Chalut and Paluch, 2016). Since we did not notice this difference on AoSMCs, and because we found higher traction forces in AnevSMCs (Petit et al., 2021), we postulate that AnevSMCs undergo phenotypic switching. Under pathological conditions, SMC switch from a contractile to a synthetic phenotype that can apply, just like myofibroblasts in scar tissue, larger tension in order to produce new extracellular matrix (Crosas-Molist et al., 2015; Li et al., 1998; Mao et al., 2015; Thyberg et al., 1997).

The localized stiffening of AnevSMCs could also indicate a densification of the cytoskeleton, just like senescent cells (Riches et al., 2018), which usually express higher stiffness properties but lower contractility (Lacolley et al., 2018a; Qiu et al., 2010). More complex processes may also occur in the cell under pathological conditions, and therefore a greater amount of cytoskeletal components may not necessarily increase the cell contractility. Indeed, mechanotransduction usually involves a complex interplay of biological pathways (Lacolley et al., 2012; Michel et al., 2018). However, since the distribution of global stiffness distribution showed no significant difference, there is no clear indication of possible correlations between tensional states and cytoskeletal stiffness.

➤ *Comparison with previous data*

A previous study using pointwise nanoindentation on monkey aortic SMCs showed that stiffness values of cells from young monkeys are in the 10-40 kPa range, which is similar to the stiffness values of healthy human SMCs, for similarly applied force between 1-5 nN (Sehgel et al., 2015). Another

study using pointwise AFM indentation on SMCs of Marfan patients also showed an increased stiffness, both in the cells and in the ECM (Crosas-Molist et al., 2015). There may be a correlation between the stiffness of the SMCs and the stiffness of the aortic wall in which they are embedded (Lacolley et al., 2018a). Interestingly, the three cell lines investigated in our study had a median stiffness value close to 12 kPa. We also found in a previous study that the traction forces of SMCs depend on the stiffness of their substrate, and that the highest traction forces were reached on gels of 12 kPa stiffness (Petit et al., 2021, 2019a). SMCs may tend to adapt their tone in response to increasing stiffness of the aortic wall in vivo but the effects in aneurysmal SMCs should still be clarified.

3.5.3. Limitations and future work

Despite the originality of our results and the new insight they provide on the biomechanics of aortic SMCs, a number of limitations need to be acknowledged.

The AFM nanoindentation curves were processed using the Sneddon model. This resorts to assuming that the cell has a linear elastic behavior and to neglecting the cell viscosity (Thomas et al., 2013). Stiffness measurements on viscous materials using indentation can be affected by the indentation speed (Braunsmann et al., 2014; Morkvėnaitė-Vilkončienė et al., 2013). Although the QI™ mode has a lower (0.5-100 Hz) indentation frequency than other quantitative AFM mapping modes like PeakForce (0.25-8 kHz) (Smolyakov et al., 2016), the dynamic effects should be investigated in future studies.

Testing living cells represents also a major challenge. The imaging time with the QI™ mode lasted about 20 min in an optimal setting. This is significantly larger than the timescale of dynamic effects undergone by filamentous structures of the cytoskeleton as assembly/disassembly cycles usually last a few minutes (Gerthoffer, 2005; Gunst and Fredberg, 2003). Moreover, it was not possible to scan all the cells at the same location, which may induce some extra variability.

Our experimental conditions on gels of 12 kPa and 25 kPa are significantly lower than real tissues which is normally around 100 kPa, and which can be much larger in pathologies like atherosclerosis (Sazonova et al., 2015). Nevertheless, the specific structure of the medial layer is made of lamellar units and SMCs are connected to the elastic laminae by bundles of elastic microfibrils (Clark and Glagov, 1985; Davis, 1993; Humphrey et al., 2015), which may act as compliant springs between stiffer material, and therefore results in a globally more compliant substrate for the cells. Artificial 2D environments may therefore reproduce similar stiffness properties at the focal adhesion site, but obviously it does not reproduce the specific structure of the SMC microenvironment in the aorta. Considering lamellar 3D environments in future studies is a priority but this will require addressing a number of challenges to develop these environments.

Finally, in spite of the high number of measurements points achieved for each cell, only ~10 cells were tested in each group. Future work on a larger number of cells should investigate the mechanical properties of the different cell components in order to identify more in details their local mechanical contributions to the cellular functions. Another perspective may consist in the exploration of the cell viscoelastic properties by upgrading the JPK advanced force mode, which allows for another specific treatment of the force curves.

3.6. Conclusion

We used the recently developed QI™ AFM mode to achieve nanomechanical mapping of isolated living human aortic SMCs. The obtained results are the first stiffness reconstructions in human aortic SMCs at the subcellular scale, showing the variations of the local apparent stiffness values in the cytoskeleton. The main conclusions are that: 1) all the SMC lineages exhibit the same stiffness distribution, with a median stiffness of 12 kPa; 2) regional variations in the stiffness distribution seem to indicate that all the stress fibers do not contribute simultaneously to the tension of the cytoskeleton; 3) stiffer regions in aneurysmal cells localize on the edges of SMCs where the density of stress fibers seems to be larger. This subcellular exploration may indicate possible ongoing alterations in SMCs of ATAAs which still needs to be related to their phenotypic evolutions towards a more myofibroblastic function. Further work will try to reconcile these local stiffness variations with the traction force variations previously published by our group (Petit et al., 2021) using subcellular computational modeling of SMCs. We postulate that understanding the mechanical regulation of vascular SMCs will be highly beneficial for future therapeutic developments against cardiovascular diseases.

➤ *Acknowledgements*

This research was supported by the European Research Council (ERC grant Biolochanics, grant number 647067).

We are also thankful to Mélusine Didelot, Patrick Lacolley, and Véronique Régnault from *Défaillance Cardiovasculaire Aigüe et Chronique* (INSERM UMR 1116) laboratory of Université de Lorraine, for teaching us the protocol of extraction and culture of AnevSMCs.

4. Conclusion

Cette étude vient ajouter à la caractérisation des CML aortiques humaines une autre composante de la réponse mécanique cellulaire, à savoir la rigidité, et à une échelle inférieure, puisqu'il s'agit ici de cartographier la rigidité locale du cytosquelette sur l'ensemble d'une zone de scan. Grâce à la technique de nanoindentation AFM, le cytosquelette apparaît accessible pour la mesure directe de la rigidité des fibres d'actine sous-jacentes à la membrane cellulaire. En ce sens, l'AFM permet une tomographie de surface avec des forces appliquées de l'ordre de 2-4nN. Toutefois, le paramètre mesuré pour la rigidité ne peut pas, seulement à partir de l'application d'un modèle de contact standard, être considéré comme un module d'Young étant donné que la cellule n'est pas un matériau homogène. Pour remonter au module d'Young du cytosquelette, il est nécessaire d'appliquer un autre traitement de données aux courbes de forces, notamment par le développement d'un modèle de la cellule indentée. Ce modèle, présenté plus en détail en tant qu'ouverture au **Chapitre 6**, est actuellement en développement pour la détermination de la rigidité du cytosquelette par une approche inverse.

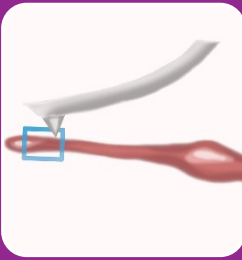
La méthode d'indentation AFM est étendue à la cellule vivante, conservée à 37°C dans son milieu de culture, ce qui représente un défi supplémentaire, mais qui permet de rendre compte des propriétés naturelles de la CML, contrairement à une cellule fixée. Ces travaux mettent en parallèle des cellules saines et anévrismales, afin d'apporter une précision supplémentaire sur les variations éventuellement dues à la pathologie. Il en ressort que les cellules anévrismales semblent comporter une enveloppe corticale plus rigide que les saines, ce qui les rendrait moins aptes à se déformer lors de la contraction. En revanche, les forces de traction mesurées sur les CML anévrismales dans le chapitre précédent se sont avérées plus importantes que pour les CML saines. Par conséquent, bien que la tendance reste à investiguer davantage et ce sur un plus grand nombre de cellules, la rigidité mesurée par AFM pourrait être reliée à l'état de tension instantané du cytosquelette. L'AFM pourrait donc en ce sens évoluer vers un outil de détection à l'échelle subcellulaire des défaillances engendrées par la pathologie sur la réponse cellulaire.

En parallèle des travaux de cette thèse, la méthode d'indentation par AFM a fait l'objet de collaborations externes au cours de cette thèse, qui ont abouti à la publication de deux autres articles :

- **YAP is a key actor in inflammatory responses**, (Caire et al., Submitted), soumise au journal *Immunity* en janvier 2021 : Indentation à l'échelle tissulaire de tissu cartilagineux avec une sonde colloïdale

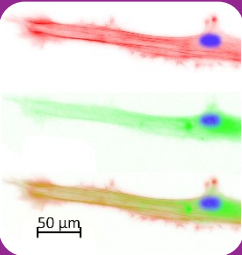
- **Visuo-haptic virtual exploration of single cell morphology and mechanics based on AFM mapping in fast mode** (Petit et al., 2020), publiée dans le *Journal of Micro-Bio Robotics* le 1^{er} décembre 2020 : Cartographie de la rigidité du cytosquelette sur ostéoblaste fixé et sur CML vivante

Nanoindentation AFM



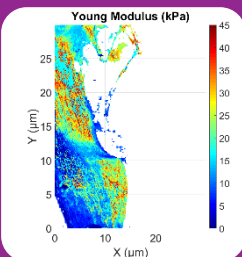
- AFM : technique de caractérisation de surface reposant sur le principe d'interactions entre les atomes de la sonde (pointe très fine) et ceux de la surface de l'échantillon. La sonde balaye la surface et la force sonde/échantillon permet de remonter à la topographie
- Avantages : très haute résolution (nm), caractérisation nanomécanique sur tous types de matériaux
- Utilisation d'un mode d'indentation dynamique : Quantitative Imaging (QI)
- Combinaison de la morphologie 3D et de la cartographie des propriétés mécaniques de l'échantillon
- Non invasif pour la caractérisation de cellules vivantes en milieu liquide

Localisation des composants cellulaires



- Un réseau fibreux présentant différentes sous-structures : fibre de stress, lamellipode, cortex
- Cellules anévrismales : asymétriques + pourtour très dense ↔ présence de cortex, servant au maintien de la forme cellulaire, parfois très étalées avec de larges extensions membranaires : lamellipode très développé
- Cellules saines : plus allongées et symétriques, fibres de stress orientées selon la longueur, zones d'ancrage moins larges : lamellipode moins développé

Caractérisation nanomécanique à l'échelle subcellulaire



- Mesure de la rigidité apparente locale de la cellule: membrane+cytosquelette (30*30μm, 256*256 points)
- Le réseau fibreux du cytosquelette transparait sur la cartographie de rigidité apparente
- Toutes les fibres ne présentent pas la même rigidité ↔ pas le même état de tension
- Les CML anévrismales présentent un pourtour plus rigide et plus dense ↔ moins aptes à se déformer
- Les CML saines présentent un pic de rigidité sur les fibres de stress internes ↔ plus de capacité à se déformer lors de la contraction

CHAPITRE 6

Conclusions & Perspectives

Récapitulatif des résultats de la thèse et présentation des perspectives

1. Introduction

Ce chapitre récapitule les observations et conclusions clés de l'ensemble des travaux de la thèse, en discutant les limitations actuelles et en présentant deux perspectives déjà initiées en fin de thèse. Le mémoire est initié par un premier chapitre constituant l'introduction au contexte académique et scientifique de la thèse, suivi de 4 chapitres (avec leur apport respectif) :

- *Chapitre 2* : Revue présentant l'état de l'art à propos de la CML aortique, de sa fonction au sein de l'aorte, et de son rôle dans l'apparition et le développement de pathologies. La mise en avant de son rôle biomécanique actif, de par son tonus basal, et sa répercussion sur la réponse mécanique de l'aorte est importante au vu du manque de données et d'informations à ce sujet.
- *Chapitre 3* : Développement d'une méthode pour la caractérisation des forces de traction des CML aortiques humaines par Traction Force Microscopy, sur des hydrogels déformables de rigidités différentes. L'originalité réside en l'obtention d'un premier volume de données quantitatives à propos du tonus basal de CML aortiques saines (lignée commerciale Lonza issue d'un donneur jeune). Un seul facteur est étudié, à savoir la rigidité du substrat, sur le tonus basal des CML. Deux observations importantes : 1. Les forces de traction sont variables, mais également fonction de la dynamique cellulaire, avec une distribution exponentielle 2. Les forces de traction dépendent de la rigidité du substrat. Puisque ces deux aspects peuvent être prédits par le modèle motor-clutch, on en déduit que ce dernier permet de comprendre la dynamique de remodelage des adhésions focales au cours de la contraction, ainsi que la probabilité d'observer un état de tension donné du cytosquelette.
- *Chapitre 4* : Extension de la méthode présentée au Chapitre 3 à un volume de données plus conséquent à propos de CML directement extraites d'échantillons aortiques provenant de donneurs sains et anévrismaux d'âges et de genres correspondants. Deux facteurs demeurent pour en déterminer l'influence : la rigidité du substrat et la pathologie. Trois observations importantes : 1. Les substrats les plus rigides ont induit un tonus basal plus important. 2. Les CML anévrismales ont démontré un tonus basal significativement plus élevé que les CML saines. 3. Les CML anévrismales présentent fréquemment une hypertrophie. On en conclut

que les CML anévrismales semblent subir une reprogrammation vers un phénotype synthétique capable de réparer le tissu, ce qui les rend en revanche moins aptes à répondre à des agents vasoactifs afin d'initier leur contraction *in vivo* au sein de l'aorte, mais ce qui leur confère une capacité à générer des forces plus élevées.

- *Chapitre 5* : Développement d'une méthode pour la caractérisation de la rigidité apparente locale de la CML et de son cytosquelette à travers la membrane. Cette méthode repose sur la technique de nanoindentation AFM, étendue à la CML aortique humaine saine et anévrismale vivante. L'originalité réside en la particularité des conditions expérimentales et aux données obtenues pour ce type cellulaire.

2. Récapitulatif des résultats et discussion

2.1. Méthodologie utilisée

Les propriétés mécaniques étudiées, à savoir le tonus basal et la rigidité apparente des CML, reposent sur deux techniques d'ingénierie instrumentale classiques : la Traction Force Microscopy (TFM) et la microscopie à force atomique (Atomic Force Microscopy, AFM).

2.1.1. Traction Force Microscopy (TFM)

La TFM utilise l'imagerie de microscopie à fluorescence, plus précisément la vidéomicroscopie, pour relever les positions au cours du temps des microbilles fluorescentes intégrées aux hydrogels sur lesquels adhèrent les CML. Ces images permettent ensuite de remonter au champs de déplacement et de déformation des microbilles grâce à un traitement par Digital Image Correlation (DIC) d'une part, puis au calcul de la force localement appliquée par la CML sur son substrat par un code utilisant la modélisation par une solution analytique à base de la solution de Boussinesq. Etant donné que le déplacement des microbilles est relevé pendant que les CML se détachent du substrat après trypsinisation, et ce sans ajout d'agent vasoactif, la mesure traduit donc le tonus basal de la CML. Ces mesures sont effectuées sur différentes valeurs de rigidités pour le substrat, mais également différentes lignées saines et anévrismales de CML aortiques humaines : une lignée commerciale dans un premier temps (**Chapitre 3**), puis des donneurs de sexes et d'âges correspondants afin d'étendre les résultats à plus de 750 mesures (**Chapitre 4**).

2.1.2. Atomic Force Microscopy (AFM)

La technique AFM a été utilisée selon un mode de quantification nanomécanique, relatif à un fonctionnement spécifiquement dédié à la mesure des propriétés mécaniques de l'échantillon par nanoindentations successives. Ce mode de fonctionnement permet d'obtenir à la fois la morphologie 3D et l'ensemble des courbes de force de la zone de scan, avec une très haute résolution (117 nm par pixel, et de l'ordre du pN pour les mesures de forces). Le traitement appliqué aux courbes de force permet de remonter, suite au fitting par un modèle de contact de Sneddon, à la rigidité apparente de la CML. Cette rigidité apparente englobe la contribution de la membrane et du cytosquelette, car la cellule n'est pas un matériau homogène. Il ne s'agit donc pas d'un module d'Young au sens de la mécanique des solides; pour se rapprocher de modèles mécaniques pour les différents composants de la CML, il serait nécessaire de développer une méthode de détermination inverse (voir section 3.2.2). La rigidité apparente permet dans un premier temps de comparer la rigidité relative de l'ensemble des composants cellulaires indentés pour des CML saines et anévrismales, et ce sur des substrats de

rigidités différentes. Ces substrats ne sont pas sollicités mécaniquement, cette manipulation étant présentée dans les perspectives étant donné son état d'avancement (Section 3.2.1).

2.2. Chapitre 2

Ce chapitre bibliographique a permis de dégager de l'état de l'art des éléments essentiels à propos du rôle de la CML au sein de la paroi aortique saine, et en conditions pathologiques. Elle a mis en évidence le manque de données expérimentales à propos de la CML aortique humaine, afin d'évaluer dans quelle mesure elle est impliquée dans l'altération de l'homogénéité de la distribution des contraintes au sein de la paroi. La réponse de la paroi aortique a déjà été caractérisée à l'échelle tissulaire afin de prédire le risque de rupture d'AATA (Cavinato et al., 2017; Duprey et al., 2016; Kim et al., 2012; Romo et al., 2014; Trabelsi et al., 2015), et fait l'objet de modèles multicouches de la distribution des contraintes (Bellini et al., 2014; Humphrey and Taylor, 2008), mais la contribution mécanique des CML reste une inconnue, en particulier au niveau aortique. De plus, le rôle des CML dans la mécanotransduction nécessite une meilleure connaissance du transfert des contraintes de la matrice extracellulaire vers la cellule, avec un manque de données à ce sujet. La prise en compte de cette contribution permettrait d'affiner les modèles existants, et il est tout d'abord nécessaire de caractériser le tonus basal des CML (ce qui oriente de fait les travaux suivants dans cette perspective).

2.3. Chapitre 3

Ce chapitre a présenté le développement d'une méthode pour la caractérisation des forces de traction des CML aortiques humaines par Traction Force Microscopy, sur des hydrogels déformables, contenant des microbilles fluorescences et un revêtement adhésif de collagène. Le tonus basal des CML a ainsi été caractérisé à partir du déplacement des billes, induit suite au détachement des cellules par trypsinisation. Le paramètre dont l'influence a été évaluée sur la réponse mécanique active des CML est la rigidité du substrat. Ce travail a été effectué en premier lieu sur une lignée commerciale de CML aortiques humaines saines de chez Lonza (AoSMC).

2.3.1. Résultat majeur

Les forces de traction des AoSMC sont variables et dépendent de la rigidité du substrat. La variabilité des valeurs de forces de traction se traduit par une distribution suivant une loi exponentielle décroissante. Selon la rigidité du substrat, entre 5% et 45% des mesures sont inférieures à 10 nN, tandis qu'entre 5% et 16% sont supérieures à 100 nN. Pour le substrat le plus souple à 4kPa, la part représentée par les forces faibles (< 10 nN) décroît à mesure que la rigidité augmente. A l'inverse, la part représentée par les forces élevées (> 100 nN) atteint son maximum à 12 kPa, mais n'est pas significativement différente pour les autres rigidités.

2.3.2. Autres résultats

Un critère de comparaison a été développé afin de quantifier la morphologie fusiforme adoptée par les AoSMC, la « spindle-shapeness », correspondant au ratio largeur/longueur. Avec une moyenne de 0.07 pour la spindle-shapeness mesurée pour 120 cellules, la morphologie des AoSMC s'est avérée particulièrement allongée et uniaxiale, avec une faible aire d'adhésion.

Par ailleurs, le marquage de l'actine F et de l' α -SMA a montré que le cytosquelette s'organisait en longues fibres concentrées selon la longueur des AoSMC.

2.3.3. Discussion

- *Contractilité préservée des CML*

Les conditions de culture semblent préserver le phénotype mature des AoSMC. En effet, la présence d'héparine et la privation de sérum induites par la culture en milieu basal ont une influence sur la quiescence des CML, tandis que la privation de sérum préserve la contractilité (Ma et al., 1998; Rubbia and Gabbiani, 1989; Tran-Lundmark et al., 2015; Wanjare et al., 2013b).

De bons indicateurs de la préservation du phénotype contractile des AoSMC sont la prédominance d'une morphologie fusiforme, et la haute expression d' α -SMA tout au long de la CML (Timraz et al., 2015). A l'inverse, une morphologie moins allongée et plus large indiquerait plutôt une hypertrophie caractéristique du phénotype synthétique (Timraz et al., 2015). De plus, les filaments d' α -SMA sont connus pour augmenter les forces de traction chez certains types cellulaires qui nécessitent de se contracter fortement tels que les myofibroblastes et les CML (Anderson et al., 2004; Chen et al., 2007; Goffin et al., 2006a).

- *Forces de traction*

La rigidité impacte significativement les forces de traction des CML saines de cette lignée commerciale. Cette dépendance à la rigidité, ainsi que la variabilité selon une loi exponentielle décroissante des forces de traction cellulaire, peuvent être prédites par le modèle probabiliste du motor-clutch (Chan and Odde, 2008). En effet, la distribution exponentielle décroissante des distributions suggère que la variabilité découle de l'instant de la mesure, ce qui tient compte de la dynamique d'accrochage/déaccrochage des adhésions focales au cours de la contraction tel que le décrit le modèle du motor-clutch. Cette dynamique est également modifiée par la rigidité du substrat (Chan and Odde, 2008). Ce modèle semble donc adapté pour prédire le tonus basal des AoSMC.

Bien que les données manquent pour les CML aortique humaines isolées dans la littérature, les valeurs relevées restent cohérentes avec d'autres types cellulaires contractiles. Ainsi, les forces de traction mesurées semblent plus faibles que de précédentes données de TFM sur les CML vasculaires (Balasubramanian et al., 2013; Sazonova et al., 2015), qui révèlent des forces entre 0-10 μ N, mais pour une population de cellules. Les valeurs mesurées à l'échelle de la CML isolée se rapprochent plutôt des forces de traction mesurées entre 10-30 nN pour des fibroblastes, et 70 nN pour des cardiomyocytes adhérent sur des substrats à 12 kPa (Balaban et al., 2001).

2.3.4. Apports de cette recherche

L'originalité réside en l'obtention d'un premier volume de données quantitatives à propos du tonus basal de CML aortiques saines (lignée commerciale Lonza issue d'un donneur jeune). De plus, l'influence de la rigidité du substrat sur le tonus basal des CML aortiques humaines isolées est quantifié pour la première fois. Une des perspectives envisagées est d'étendre cette méthode à l'étude de CML saines et anévrismales issues de plusieurs donneurs.

2.4. Chapitre 4

Ce chapitre a présenté l'extension de la méthode présentée au **Chapitre 3** à un volume de données plus conséquent à propos de CML directement extraites d'échantillons aortiques provenant de donneurs sains et anévrismaux d'âges et de genres correspondants. Deux facteurs ont été étudiés pour en déterminer l'influence sur la réponse active des CML : la rigidité du substrat et la pathologie.

2.4.1. Résultats majeurs

Les expériences de TFM ont été menées sur trois lignées saines (AoPrim) et trois anévrismales (AnevPrim) issues de culture primaire d'origine humaine. Au total, 759 mesures sont effectuées sur 24 populations (6 lignées cellulaires x 4 valeurs de rigidités). Pour automatiser le processus, des plaques de 24 puits contenant 6 puits de chaque rigidité (4, 8, 12, 25 kPa) ont été utilisées pour chaque lignée. Pour chaque puit, entre 1 et 4 cellules ont pu être caractérisées, ce qui a donné un nombre de cellules variant de 16-24 pour les AoPrim à 27-54 pour les AnevPrim. Deux observations majeures en découlent:

- Les forces de traction sont globalement hétérogènes et suivent une décroissance exponentielle comme pour les AoSMC du **Chapitre 3**. Pour les CML saines comme anévrismales, les forces de traction sont significativement plus élevées sur les substrats les plus rigides. Pour les AoPrim, la force médiane avoisine 30 nN pour les gels de rigidité 4 kPa, et augmente entre 60-70nN pour les rigidités suivantes. Pour les AnevPrim, la médiane augmente avec la rigidité, mais les lignées 2 et 3 montrent une valeur médiane maximale sur les gels à 12 kPa, comme pour les AoSMC du **Chapitre 3**.
- Les forces de traction sont également significativement plus faibles pour les AoPrim (30-70 nN) que les AnevPrim. Les AnevPrim ont atteint jusqu'à une valeur médiane de 100 nN, voire 300nN pour la lignée 2 sur le substrat à 12 kPa.

2.4.2. Autre résultats

L'évolution des valeurs médianes a été modélisée par le modèle motor-clutch afin de reproduire l'effet de la rigidité du substrat observé dans les résultats majeurs. Excepté pour la lignée saine 2, le modèle a pu prédire correctement les valeurs médianes après ajustement des paramètres du modèle (nm, nc, kon, and koff). En effet, un plus grand nombre de moteurs et de clutches a été nécessaire pour modéliser le comportement des AnevPrim2 et 3, de par leur médiane plus élevée.

La morphologie des AoPrim montre majoritairement une forme allongée et uniaxiale, comme pour les AoSMC du **Chapitre 3**. Ce n'est cependant pas le cas pour les AnevPrim, qui apparaissent plus souvent multipolaires, avec plusieurs directions d'étalement, et des extensions membranaires plus larges et moins proéminentes. La distribution des aires cellulaires montre une tendance vers des cellules plus étalées que les AoPrim.

Au niveau de leur composition, les deux types de lignées n'ont pas montré une différence dans l'expression de l' α -SMA, qui semble plus exprimée par les AnevPrim, mais pas de celle de l'actine F. Dans les deux cas, le cytosquelette d'actine est particulièrement dense autour des CML, formant de longues fibres de stress tendues sur les latérales. Pour les AnevPrim, où les extensions membranaires sont plus larges, un ensemble de fibres entrecroisées se distingue clairement, formant le lamellipode.

2.4.3. Discussion

Le tonus basal plus élevé des AnevPrim par rapport aux AoPrim a été quantifié la première fois pour des donneurs d'âges et de genres correspondants. Les forces de traction médianes des AnevPrim ont été données autour de 100 nN par rapport à 30-70 nN pour les AoPrim. Dans la littérature, une étude a caractérisé la dérégulation de la contractilité des CML en cas d'anévrisme, mais pas encore à l'échelle de la cellule unique (Bogunovic et al., 2019). Comme pour le **Chapitre 3**, le modèle motor-clutch semble adapté pour prédire la dépendance du tonus basal des CML à la rigidité du substrat, ainsi que la variabilité des forces de traction mesurées.

L'augmentation du tonus basal des AnevPrim semble liée à leur plus grande surface d'étalement. Cette observation suggère un changement de phénotype contractile vers synthétique, un phénomène déjà répertorié dans le cas de certaines pathologies cardiovasculaires (Humphrey, 2002; Thyberg et al., 1990). En effet, leur morphologie plus élargie pourrait indiquer une hypertrophie caractéristique du phénotype synthétique (Timraz et al., 2015), pour lequel les organites synthétiques sont plus fortement développés (Humphrey, 2002; Owens et al., 1981). Par ailleurs, ce changement phénotypique semble altérer la contractilité des CML, les rendant ainsi moins sensibles aux agents vasoactifs et moins aptes à se contracter, induisant des CML plus tendues. Cette augmentation de tension a été montrée en lien avec la capacité à synthétiser du collagène, afin de précontraindre la MEC nouvellement formée (Li et al., 1998).

2.4.4. Apports de cette recherche

Cette première étude quantitative a permis de réaliser des expériences de TFM sur CML aortiques humaines isolées, provenant de donneurs sains et anévrismaux d'âges et de sexes correspondants, contrairement à de précédentes expériences sur populations de cellules (Bogunovic et al., 2019) ou sur cellules provenant d'autres espèces (Sugita et al., 2019).

2.5. Chapitre 5

Ce chapitre a introduit le développement d'une méthode pour la caractérisation de la rigidité apparente locale de la CML et de son cytosquelette à travers la membrane. Cette méthode repose sur la technique de nanoindentation AFM, étendue à la CML aortique humaine saine et anévrismale vivante.

2.5.1. Résultat majeur

Les valeurs de rigidité apparente, comprenant la contribution de tous les composants cellulaires sous la membrane sans distinction, ont été regroupées sous forme d'histogrammes afin de comparer la distribution des valeurs mesurées sur l'ensemble des cellules de chaque groupe testé. Trois groupes sont considérés à savoir : 1. Des CML saines issues de la même lignée commerciale Lonza qu'au **Chapitre 3** sur des hydrogels à 12 kPa, 2. Des CML anévrismales issues de culture primaire sur des hydrogels à 12 kPa, et 3. Des CML saines Lonza sur des hydrogels à 25 kPa. Ces groupes permettent de tester l'influence de la rigidité de substrat et de la pathologie sur la rigidité apparente des CML.

La comparaison des distributions de valeurs de rigidité apparente mesurées ne montre pas de différence significative entre les populations, et ce quelle que soit la rigidité du substrat et l'effet de la

pathologie. Les valeurs de rigidité mesurées sont comprises dans la plage 0-45 kPa pour toutes les lignées, et leur médiane reste proche de la rigidité de 12 kPa, pour laquelle les chapitres précédents ont démontré un tonus basal maximal pour plusieurs lignées caractérisées. Les distributions fittées par une loi Gamma montrent une très grande proximité pour les trois groupes de cellules.

2.5.2. Autre résultat 1

Il existe des différences localisées de rigidités sur les cartographies de rigidité apparente des CML. Globalement, les cartographies montrent davantage le réseau fibreux du cytosquelette que les images de morphologie. Ces fibres ne présentent pas toutes la même rigidité ni la même organisation, révélant ainsi plusieurs sous-structures : le lamellipode, les fibres de stress, et le cortex. Cette observation est valable pour les cartographies de rigidité apparente, complétées par les images de fluorescence pour les deux types de CML. Plus particulièrement, les CML anévrismales présentent une rigidité plus importante sur leur pourtour.

2.5.3. Autre résultat 2

Les images de fluorescence de cellules saines et anévrismales ont montré que le cytosquelette était constitué d'un réseau complexe de fibres dont la densité n'était pas uniforme, de par la présence de plusieurs sous-structures (**Chapitre 5**, Fig. 5.5A). En effet, le cytosquelette est particulièrement dense au niveau du lamellipode, auprès des adhésions focales. Au niveau des fibres de stress, l'actine forme de longues fibres reliant les adhésions focales aux autres composants cellulaires, dont le noyau. Un réseau de fibres entrecroisées se distingue dans le lamellipode pour les cellules saines (**Chapitre 5**, Fig. 5.5C) comme anévrismales (**Chapitre 5**, Fig. 5.5B). A l'inverse, un ensemble de fibres parallèles et resserrées forme de larges faisceaux de fibres aux abords des cellules. Par ailleurs, des concentrations localement plus élevées ont indiqué la formation de cortex afin de maintenir la forme cellulaire (**Chapitre 5**, Fig. 5.4D).

2.5.4. Discussion

➤ *Exploration subcellulaire de la CML aortique humaine*

Il a été intéressant d'observer que la cytoarchitecture des CML ressort suite à la combinaison des images AFM de cartographie de rigidité apparente et de fluorescence (**Chapitre 5**, Fig. 5.2, 5.4 et 5.5). Différentes sous-structures sont identifiables, notamment les fibres de stress fondamentales à la génération de forces de traction, et donc au maintien d'un tonus chez la CML. Ces fibres ne semblent pas toutes recrutées uniformément par la CML au vu de la différence de rigidité apparente observée entre les différentes fibres. Cette observation peut s'expliquer du fait de la dynamique cellulaire telle qu'elle est décrite par le modèle motor-clutch (Bangasser et al., 2013; Chan and Odde, 2008). Ce modèle prévoit qu'un certain nombre de clutches par fibre de stress soient engagés sur le substrat à un instant donné. Chaque clutch ayant une probabilité de se détacher selon un taux de décrochage donné, la probabilité d'observer un état de tension particulier pour chaque fibre dépend de l'instant de la mesure, et toutes ne se trouvent pas dans le même état au même moment. Par ailleurs, le cytosquelette connaît des cycles perpétuels de polymérisation/dépolymérisation de l'actine. Par conséquent, les images AFM ne peuvent que donner un cliché instantané des propriétés du cytosquelette. Cette dépendance au temps reste cohérente avec l'emploi de la loi Gamma pour le fitting des distributions, puisqu'elle est utilisée pour décrire la probabilité de réalisation d'événements

aléatoires en un temps donné (Belikov, 2017), et pour déterminer la probabilité de rupture au cours du temps (Mannan, 2012).

Globalement, les CML saines comme anévrismales ont présenté des distributions de rigidité très similaires, suggérant ainsi un contenu cellulaire globalement identique. En revanche, les résultats du **Chapitre 4** ont fait état d'un tonus plus important pour les CML anévrismales que pour les saines. L'état de tension cellulaire ne peut donc pas être relié à la rigidité apparente du cytosquelette.

➤ *Différences localisées chez les CML anévrismales*

La présence d'un pourtour plus rigide chez les CML anévrismales, pour lequel les fibres d'actine ne sont pas individuellement distinguées, suggère un cortex dense, servant au maintien de la forme cellulaire. Associée aux résultats du **Chapitre 4** à propos de l'augmentation de tonus chez les CML anévrismales, cette observation renforce l'hypothèse d'un changement de phénotype des CML, vers un phénotype synthétique qui nécessite une plus forte tension afin de précontraindre la MEC nouvellement formée (Li et al., 1998), et de réparer les défauts du tissu par remodelage (Crosas-Molist et al., 2015; Mao et al., 2015; Thyberg et al., 1997). Toutefois, puisque les distributions de rigidité n'ont pas montré globalement de différence significative, ces observations ne permettent pas de conclure à un véritable lien entre état de tension et rigidité du cytosquelette.

Une autre explication pourrait provenir de la densification du cytosquelette des CML anévrismales, qui tendent vers le comportement de cellules sénescentes (Riches et al., 2018), plus rigides et moins aptes à se contracter (Lacolley et al., 2018b; Qiu et al., 2010). Cette hypothèse est complétée par le fait qu'il puisse y avoir reprogrammation du comportement de la CML face aux variations biomécaniques en cas de pathologie, via des processus complexes de mécanotransduction (Lacolley et al., 2012; Michel et al., 2018).

➤ *Comparaison avec de précédentes études*

Une autre étude a montré une rigidification des CML et de la MEC résultant d'un syndrome de Marfan (Crosas-Molist et al., 2015). Comme précédemment évoqué dans la littérature, la rigidité des CML dépend de celle de la paroi aortique (Lacolley et al., 2018b). Cela suggère une adaptation progressive afin de protéger la paroi contre les sollicitations élevées, par une reprise plus importante de ces efforts, ainsi qu'une synthèse accrue de collagène (Humphrey, 2002). De plus, la proximité des valeurs de rigidité médianes avec le substrat à 12 kPa concorde avec l'optimum révélé pour plusieurs lignées dans les chapitres précédents, ainsi qu'avec l'existence d'un état homéostatique préférentiel, vers lequel tendent à revenir les CML par leur contribution active.

Toutefois, ces observations sont à prendre avec précaution étant donné les limites posées par les conditions expérimentales actuelles, qui n'ont pas permis notamment de respecter des conditions optimales de reproductibilité, ni de comparer exactement les mêmes zones sur toutes les CML caractérisées, ni d'offrir un plus grand nombre d'échantillons. Par ailleurs, l'obtention du module d'Young des composants cellulaires nécessite l'implémentation d'un modèle supplémentaire, décrit en perspective de ce chapitre (Section 3.2.2).

2.5.5. Apports de cette recherche

L'originalité réside dans la particularité des conditions expérimentales et des données obtenues pour ce type cellulaire. Il s'agit de la première application de la nanoindentation AFM sur des

CML au niveau de leur cytosquelette. Ce développement expérimental permet d'établir une base pour la caractérisation des CML aortiques humaines vivantes à l'AFM, mais nécessite davantage d'approfondissement afin d'extraire les propriétés mécaniques du cytosquelette, et d'étendre le volume de données à un plus grand nombre de cellules et de donneurs. Il sera également nécessaire de réaliser des campagnes de mesure plus rapprochées afin de garantir que les conditions expérimentales permettent l'utilisation des mêmes paramètres de scan pour toutes les CML caractérisées.

3. Limitations et perspectives

Les travaux présentés dans le cadre de cette thèse présentent un apport en termes d'application de techniques d'ingénierie instrumentale classiques à la caractérisation de la cellule et de son cytosquelette, mais aussi (et surtout) un ensemble de données quantitatives originales à propos de la CML aortique humaine issue de culture primaire à partir d'échantillons d'aortes saines et anévrismales. Malgré ces avancées, il subsiste un certain nombre de limitations sur le plan expérimental, que cette section reprend dans ses grandes lignes, avant de détailler deux perspectives principales déjà initiées pour dépasser certaines des limitations actuelles.

3.1. Limitations

3.1.1. Conditions expérimentales

La limitation principale concerne la reproduction du microenvironnement cellulaire *in vitro*. En effet, les CML sont cultivées dans des flasques de culture standard, puisensemencées sur des hydrogels avec revêtement adhésif de collagène (type I). Ces substrats 2D ne représentent pas l'environnement 3D *in vivo* de la MEC, ni sa biochimie réelle. Le type de revêtement joue également un rôle fondamental, car les CML réagissent différemment aux protéines adhésives telles que la fibronectine ou la laminine. Le collagène de type I semble un choix pertinent car les CML saines ont conservé une forme longiligne dans ces travaux, bien que la MEC soit constituée en réalité d'un mélange de plusieurs types de composants qui interagissent avec les CML. De plus, le collagène de type I se retrouve habituellement dans la MEC sous forme de fibres orientées selon le maximum de contrainte subie par le tissu, et synthétisées avec une certaine précontrainte initiée par les CML synthétiques. Or dans le cas des hydrogels, ni l'anisotropie ni la précontrainte ne sont vérifiées puisqu'il s'agit d'un matériau homogène et non soumis à une charge. Afin d'étudier l'effet de la sollicitation mécanique sur la réponse des CML, une des perspectives initiées est d'étendre le protocole de nanoindentation sur des CML adhérent à un substrat soumis à une charge (Section 3.2.1).

Par ailleurs, les hydrogels servant aux expérimentations sont de rigidités comprises entre 4 et 25 kPa, alors que l'aorte aurait une rigidité supérieure à 100 kPa, voire bien au delà en cas d'athérosclérose (Sazonova et al., 2015). Les hydrogels utilisés sont donc bien plus souples que la réalité du tissu aortique, mais l'objectif était de fournir le même type de substrat pour toutes les lignées caractérisées dans les travaux de cette thèse. L'avantage des hydrogels Matrigen est de fournir des produits prêts à l'emploi, avec une flexibilité sur le format des contenants, sur les valeurs de rigidités souhaitées, et sur les caractéristiques spécifiques (type de revêtement adhésif, inclusion de

microbilles fluorescentes...). Ces substrats se sont donc avérés appropriés pour les deux techniques de caractérisation appliquées dans le cas des CML.

Enfin, bien que l'approche soit intéressante et originale pour n'obtenir que les effets et propriétés d'une seule CML, la caractérisation de la cellule isolée ne tient pas compte des interactions existant entre cellules voisines *in vivo*, et qui influencent pourtant la réponse cellulaire. Cette limitation entraîne une difficulté à extrapoler du 2D au 3D les effets réels du tonus cellulaire parmi la MEC et les CML voisines.

3.1.2. Hypothèses formulées pour la modélisation

Afin de pouvoir appliquer les modèles mécaniques choisis dans le cadre de ces travaux, certaines hypothèses ont été formulées en amont. En ce qui concerne la TFM, les mesures de forces de traction cellulaires dépendent fortement des hypothèses mécaniques. En premier lieu sont à remettre en question le comportement supposé linéaire élastique du substrat, et l'hypothèse des déformations planes. En effet, l'hydrogel présente des non-linéarités, ainsi que des effets de déformations en profondeur comme en a témoigné le modèle par éléments finis réalisé pour valider l'utilisation de la solution analytique pour le calcul des forces correspondantes. De plus, la solution de Boussinesq sur laquelle est basée la solution analytique est valide pour un demi-espace infini, ce qui a été supposé dans le cas des hydrogels au vu de leur large diamètre par rapport à la dimension de la cellule, mais ce qui pourrait être discuté puisqu'il s'agit d'un substrat fin (400 μm d'épaisseur pour 12 mm de diamètre) (Yang, 2011). Le modèle reconstruit par éléments finis a montré que la solution analytique offrait des résultats satisfaisants, mais il considère l'effet d'une force exercée ponctuellement sur un nœud et non pas la force réellement exercée par la CML via une de ses plaques d'adhésions focales.

3.1.3. Mesure de rigidité apparente

Les expériences de nanoindentation AFM ont permis de mettre en avant des variations de rigidité apparente locale de la CML au travers de sa membrane. Dans le cas d'un matériau homogène, ce paramètre de rigidité serait le module d'Young. La cellule étant constituée d'une membrane, elle ne peut donc pas être prise comme un matériau homogène. L'application d'un modèle de contact standard tel que celui de Sneddon ne suffit pas pour caractériser les propriétés mécaniques du cytosquelette. Il est nécessaire d'implémenter un modèle de la cellule indentée par la sonde AFM afin d'extraire le paramètre de rigidité spécifique au cytosquelette par une approche inverse. Un modèle par éléments finis est en cours de développement dans cette perspective (Section 3.2.2).

3.1.4. Nombre d'échantillons

Une dernière limitation concerne le nombre de cellules caractérisées dans l'ensemble de ces travaux. Au total, entre 16-24 CML saines (50 pour la lignée commerciale Lonza), et 27-54 CML anévrismales sont utilisées selon les donneurs pour les expériences de TFM, et 10-15 CML saines Lonza et anévrismales (un seul donneur) pour les expériences de nanoindentation AFM. Il faudrait augmenter ce nombre de mesures d'un facteur 10 pour pouvoir comprendre pleinement les effets liés à la régulation des forces de traction en fonction des paramètres d'influence, à savoir la rigidité du substrat et la pathologie. Il faudrait également augmenter le nombre de donneurs (actuellement 3 sont présentés pour comparer le tonus des CML saines et anévrismales, et un seul pour la nanoindentation). Bien que ces donneurs soient déjà d'âges et de sexes correspondants, la variabilité inter-individuelle

observée reste à confirmer par un plus grand nombre de donneurs de caractéristiques proches. Les effets de l'âge et du genre pourraient également apparaître avec cette extension de données. Mais dans un premier temps, ce premier ensemble de données permet d'entrevoir des tendances originales par rapport à l'état de l'art sur les CML aortiques humaines.

3.2. Perspectives

3.2.1. Indentation AFM sur cellules adhérent à un substrat en tension : Flexcell

Afin de reproduire plus fidèlement les conditions mécaniques de la paroi aortique *in vitro*, l'une des perspectives envisagées pour les travaux de cette thèse est de placer les CML aortiques sur des substrats mis en tension, grâce à un dispositif de traction. Plusieurs fabricants proposent ce type d'équipement, mais la solution retenue a été celle du fabricant Flexcell, au vu des contraintes dimensionnelles envisagées pour une utilisation à l'AFM.

➤ *Présentation du matériel*

Le fabricant Flexcell fournit des solutions complètes pour la sollicitation mécanique de membranes élastomères par un système de vide par pompage. Il existe différents modèles permettant d'appliquer différents types de sollicitations, mais la solution retenue pour les CML est le système de tension Flex Jr. Le système est précalibré pour que la pression appliquée par le vide corresponde à une valeur donnée d'élongation pour les membranes élastomères fournies également par le fabricant. Il comprend un module de contrôle Flexlink (à gauche sur la Fig. 6.1), commandé par un logiciel adapté (FlexSoft Jr.), et un kit de tension pour plaque de 6 puits (à droite sur la Fig. 6.1). Ce dispositif prévoit initialement une utilisation en incubateur, avec le kit constitué d'une plaque de 6 puits sur une base adaptée, permettant d'effectuer le vide sous les membranes de la plaque au cours de la culture cellulaire.



Figure 6.1 Dispositif initial de tension Flex Jr.

Un module supplémentaire (le StageFlexer) est nécessaire pour une application nécessitant d'avoir accès aux cellules au-dessus de la membrane. Pour la nanoindentation AFM, l'accès à la membrane est incontournable, ce pourquoi le StageFlexer a été ajouté au dispositif lors de son installation (Fig. 6.2). Il permet de fixer la membrane élastomère de façon étanche sous l'anneau vissé, et d'appliquer un vide sur le pourtour du plot support (Fig. 6.3). Ce plot est nécessaire afin de maintenir la membrane plane sur la zone centrale. Il en existe deux types selon si l'on choisit une tension radiale (plot circulaire, Fig. 6.2) ou uniaxiale (plot Arctangle, Fig. 6.2).



Figure 6.2 Module additionnel StageFlexer nécessaire pour donner accès aux cellules sur la membrane

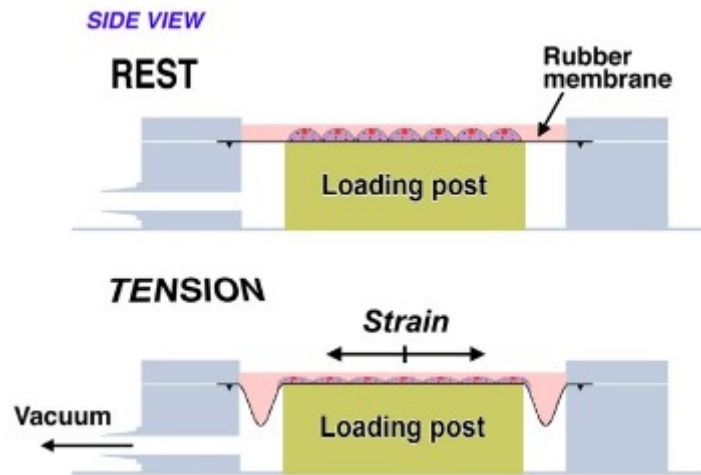


Figure 6.3 Principe de mise en tension de la membrane avec le StageFlexer

Par la suite, le StageFlexer a été monté sur une des platines chauffantes du microscope AFM JPK pour être directement intégré sous l'AFM (Fig. 6.4 et 6.5). Des supports ont dû être conçus pour surélever la tête de scan de l'AFM, car le StageFlexer dépassait la hauteur maximale pour un échantillon standard. Ces pièces ont dû être usinées dans un matériau spécifique, l'INVAR, possédant un coefficient de dilatation thermique très faible, ce qui le rend parfaitement adapté à la microscopie AFM, où la moindre variation dimensionnelle affecte la mesure.

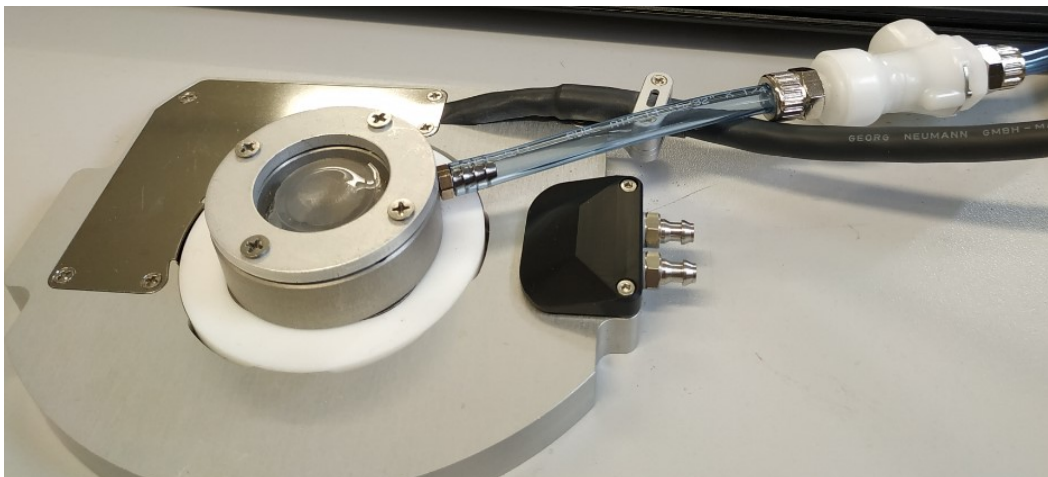


Figure 6.4 StageFlexer intégré à la platine chauffante du microscope AFM JPK

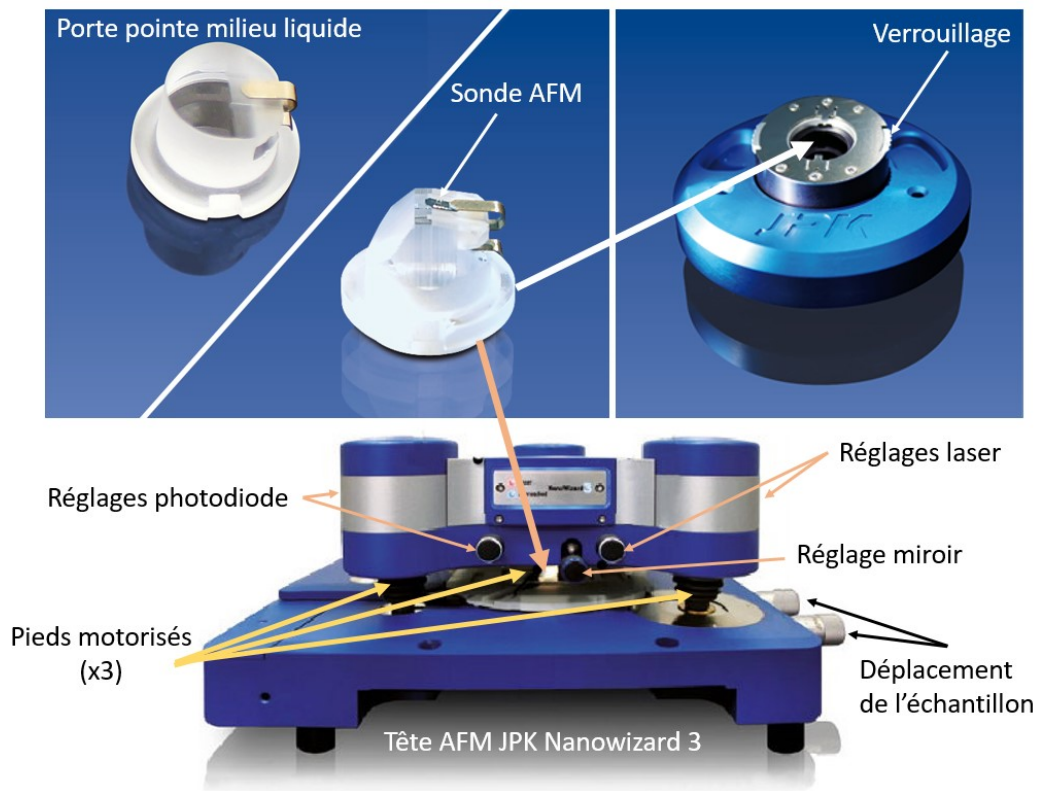


Figure 6.5 Tête de scan du microscope AFM JPK

➤ *Protocole envisagé*

Le protocole expérimental développé à ce stade prévoit la culture de CML et l'ensemencement des membranes élastomères, comme pour les hydrogels, puisque les deux types de substrats comportent un revêtement adhésif de collagène. Les membranes doivent rester en culture dans leur boîte de Pétri, afin que les CML aient le temps de reprendre leur forme naturelle après adhésion.

Le jour même de l'expérience, les membranes qui seront utilisées devront être découpées à un diamètre légèrement supérieur à la dimension du joint du StageFlexer, car elles sont délivrées trop grandes par le fabricant, qui ne propose pas d'autre taille. Cette étape devra se faire si possible en dernier, afin de ne pas rompre la stérilité de la culture, mais il faudra s'assurer d'une méthode de découpe qui n'endommage pas les cellules adhérant au centre de la membrane, éventuellement avec un emporte-pièce.

Le transport de la membrane pourra se faire de la même manière que les hydrogels destinés à l'AFM, grâce à un incubateur portable, étant donné que le microscope AFM ne se trouve pas dans les mêmes locaux que les salles de culture. Une fois montée dans le StageFlexer, la membrane sera mise en tension avec un régime statique permanent, afin de la rendre plane, puis mise en place sous l'AFM. Le protocole d'approche de la sonde et d'indentation restera en principe identique aux autres types d'échantillons, à la différence qu'il faudra veiller à relever suffisamment la sonde avant de modifier la consigne de tension ou de relâcher complètement la membrane, afin que la différence potentielle d'altitude n'endommage pas la pointe.

➤ *Résultats espérés*

L'étendue du travail de nanoindentation AFM à la caractérisation de CML sollicitées mécaniquement selon un régime statique devrait permettre d'identifier dans un premier temps les effets de la précontrainte du substrat sur les CML. Parmi les observations pressenties on retrouve : une variation du recrutement des fibres du cytosquelette selon la direction de l'effort, un renforcement de la tension cellulaire, ou encore une réorientation des CML.

Dans un second temps, un régime de tension variable, sinusoïdal ou pulsé, pourrait retranscrire davantage les effets de la variation de pression sanguine sur la réponse biomécanique des CML. Reste à quantifier la variation d'altitude de la membrane au cours du cycle de tension afin de vérifier que la sonde AFM puisse maintenir le contact.

3.2.2. Modélisation par éléments finis de la cellule indentée

Ce travail a été initié dans le cadre du stage de master 1 de Marine Guilbot que j'ai coencadrée avec un postdoctorant. Le modèle réalisé pour la représentation de la cellule indentée par AFM repose sur la méthode des éléments finis avec le logiciel Abaqus, afin de proposer un modèle hyperélastique de la cellule. La modélisation de l'indentation mène à la détermination des paramètres hyperélastiques de la cellule.

➤ *Présentation des modèles utilisés et de leurs paramètres initiaux*

○ *Modèle Abaqus*

Le modèle éléments finis de la cellule reprend les dimensions et la composition de la CML (Fig. 6.6).

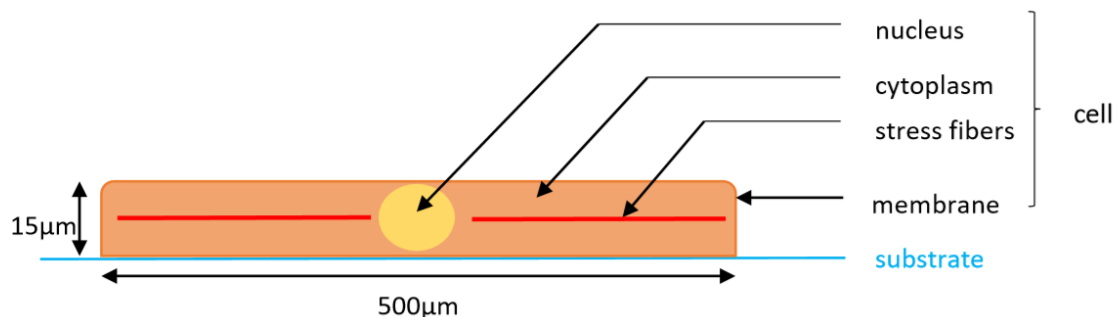


Figure 6.6 Schéma de la cellule sur son substrat déformable

Le modèle développé sous Abaqus est soumis à une simulation en deux étapes : une première de 10 à 20s pendant laquelle la cellule initie la contraction de ses fibres de stress, puis une seconde de 5s, pendant laquelle la cellule subit une force verticale de 1 à 5nN sur un nœud spécifique du modèle (Fig. 6.7A). L'étude comprend plusieurs localisations pour l'étape d'indentation.

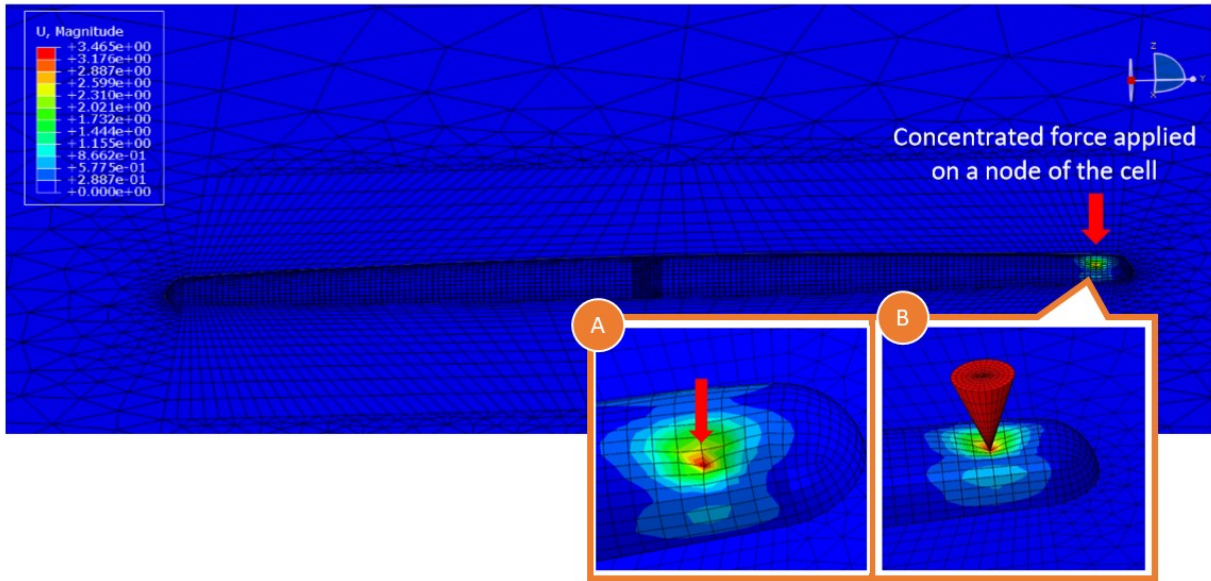


Figure 6.7 Modèle Abaqus de la cellule indentée avec une force verticale dans un premier temps (A) et le modèle éléments finis de la pointe AFM (B)

Ce modèle permet d'obtenir, suite à des simulations, les paramètres hyperélastiques de la cellule. Il est ensuite amélioré afin de remplacer la force verticale par le modèle éléments finis de la pointe AFM en indentation sur le nœud choisi, afin de modéliser le contact réel de la sonde sur la membrane cellulaire (Fig. 6.7B). Le modèle de la pointe est réalisé à partir des dimensions données par le fabricant pour la sonde utilisée (HQ:CSC17/Cr-Au BS).

○ *Modèle Néo-Hookéen*

Chaque composant cellulaire est caractérisé par leur paramètre hyperélastique, noté C_{10} , selon un modèle Néo-Hookéen (Table 6. 1). Ce paramètre est défini par la densité d'énergie de déformation, permettant de décrire le comportement non linéaire de matériaux anisotropes, tels que la cellule, ou plus généralement les tissus biologiques. Cette densité d'énergie se définit tel que :

$$W = C_{10}(I_1 - 3)$$

où C_{10} est le paramètre hyperélastique à déterminer et I_1 représente la trace du tenseur de Cauchy-Green droit, définie par l'expression suivante :

$$I_1 = \lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2$$

où les termes $\lambda_{i=1,2,3}$ représentent les déformations principales, réexprimées dans la base composée par les directions principales.

○ *Modèle d'Ogden*

Le modèle d'Ogden se retrouve plus couramment pour décrire le comportement hyperélastique des tissus biologiques. La densité d'énergie de déformation se définit pour ce modèle selon l'expression suivante :

$$W(\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3) = \sum_{p=1}^N \frac{\mu_p}{\alpha_p} (\lambda_1^{\alpha_p} + \lambda_2^{\alpha_p} + \lambda_3^{\alpha_p} - 3)$$

Où α et μ sont les paramètres à déterminer, N , μ_p et α_p des constantes propres au matériau caractérisé.

Table 6.1 Paramètres hyperélastiques associés initialement à chaque composant cellulaire, selon le modèle Néo-Hookéen (C_{10}) et celui d'Ogden (α et μ)

Composant cellulaire	C_{10} (MPa)	α	μ (MPa)
Membrane	0,6	4	1,2
Cytoplasme-noyau	10^{-5}	4	$2 \cdot 10^{-5}$

Ces paramètres initiaux servent de point de départ pour la détermination des paramètres réels dans le cas de la cellule. Ils sont modifiés à chaque itération des simulations numériques effectuées, afin de se rapprocher au plus près des données expérimentales.

- Simulations numériques
 - Modèle Néo-Hookéen

Plusieurs simulations ont été effectuées en 19 nœuds du modèle, pour lesquels une force variant de 1 à 5nN a été appliquée. Le déplacement local de chaque nœud indenté a été relevé au cours de l'indentation (Fig. 6.8 et 6.9). Au total, 19 courbes force-déplacement sont tracées, et la variation constatée entre les différents nœuds témoigne de la variabilité des propriétés mécaniques de la cellule en chaque point (Fig. 6.8 et 6.9).

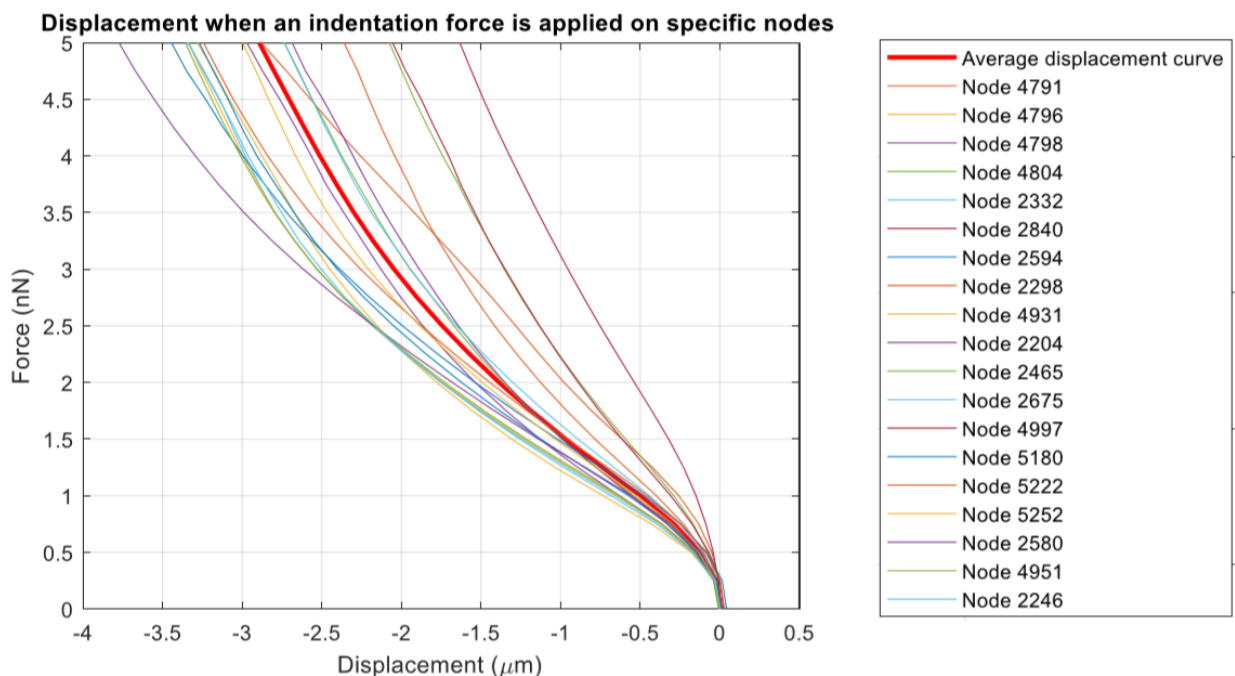


Figure 6.8 Courbes force-déplacement obtenues sur 19 nœuds différents du modèle éléments fini

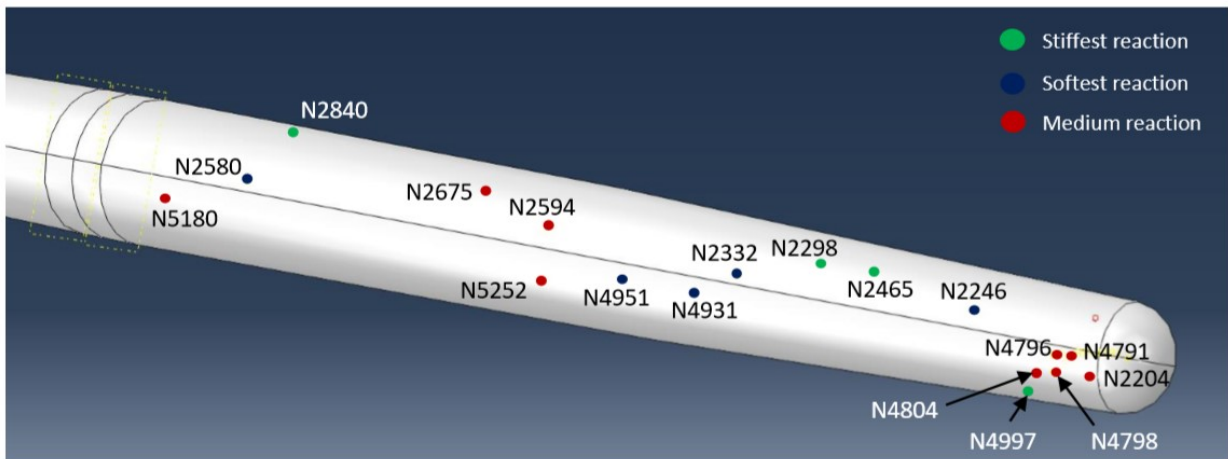


Figure 6.9 Localisation des différents nœuds indentés et leur réponse en termes de rigidité

Ensuite, les paramètres du modèle Néo-Hookeen et du modèle d'Ogden ont été identifiés en ajustant le modèle sur les données expérimentales issues de la nanoindentation AFM (Figure 6.10). Les résultats de cette étude préliminaire sont résumés sur la Figure 6.11.

Comparison of the best parameters for the concentrated force and contact force models

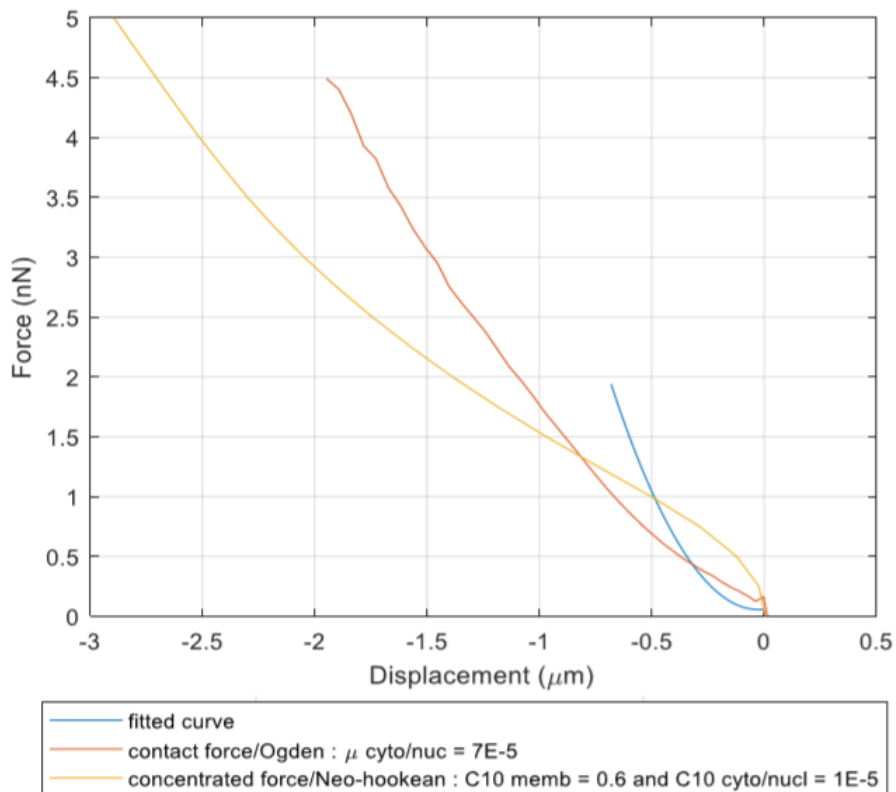
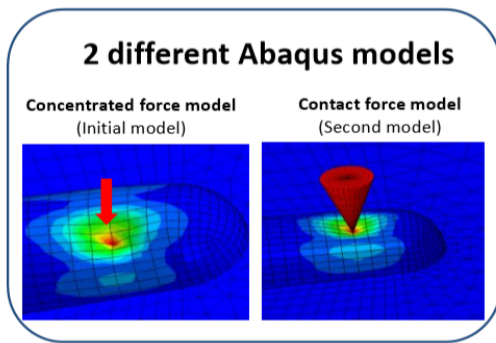


Figure 6.10 Comparaison des résultats obtenus pour les combinaisons modèle élément fini/modèle hyperélastique optimales par rapport aux données expérimentales



2 different hyperelastic models

Neo-hookean model (C10 parameter)	Ogden model (α and μ parameters)
Membrane	
C10 = 0,6 MPa	α changes : no impact μ changes : not conclusive
Cytoplasm and Nucleus	
C10 = 10^{-5} MPa	α changes : no impact $\mu = 7.10^{-5}$ MPa

Figure 6.11 Résumé du travail réalisé à propos du modèle de cellule indentée suite aux simulations numériques

4. Conclusion

Ce chapitre vient clore mon mémoire de thèse en récapitulant et en discutant les résultats fondamentaux. La discussion construite à partir de ces résultats souligne certaines caractéristiques clairement identifiées des CML aortiques, malgré une forte variabilité interindividuelle, dont un état de tension variable, et une sensibilité à la rigidité de leur substrat. Les CML anévrismales semblent démontrer une dérégulation de leurs mécanismes de mécanosensibilité et de mécanotransduction, et par conséquent une réponse contractile altérée. Leur différence morphologique, à savoir des cellules généralement plus larges et étalées, associée à une rigidité qui semblerait plus marquée sur leur pourtour concordent avec l'hypothèse d'un changement de phénotype contractile vers synthétique. Leur évolution vers un phénotype synthétique demeure cohérente avec l'augmentation de leur tonus basal, puisque la synthèse de collagène nécessite une précontrainte initiée par la CML sur la MEC. Ces observations suggèrent une reprogrammation cellulaire, et un éloignement croissant du phénotype contractile, pouvant s'amplifier par la rigidification de la paroi aortique et par la pathologie.

Deux perspectives principales ont été proposées. La première concerne la reprise des expériences de nanoindentation en les combinant avec la sollicitation mécanique des CML, afin de se rapprocher de la réalité. La seconde perspective décrit le développement d'un modèle par éléments finis de la CML indentée, afin d'extraire les paramètres propres aux composants cellulaires à partir des données expérimentales, par une approche inverse.

ANNEXES

I.	Chapitre 3	135
A.	Appendix S3.1. Fluorescent staining protocol and dyes	135
B.	Appendix S3.2. DIC algorithm.....	137
C.	Appendix S3.3. Full TFM data on 24-well plates	139
II.	Chapitre 4	140
A.	Appendix S4.1. SMC architecture and morphology	140
B.	Appendix S4.2. Full TFM data on 24-well plates	142
III.	Chapitre 5	149
A.	Appendix S5.1. Full data about morphological and nanomechanical mapping.....	149
B.	Appendix S5.2. Full data about the distribution of apparent stiffness values	162
C.	Appendix S5.3. Full data about individual median values and fitting parameters	175
	RÉFÉRENCES	180

I. Chapitre 3

A. Appendix S3.1. Fluorescent staining protocol and dyes

In order to observe the cell structure, we used CYTOO™ Starter chips that consist in micro-patterned coverslides having four different shapes and three different sizes. Since the patterns are coated with fibronectin, cells adhere and adapt their shape to them. The CYTOO™ chips also contain a thick fibronectin line where the cells adhere randomly.

The Fluorescent Microscopy (FM) technique constitutes a powerful technique to enable observations at the cellular (between 10-100 μm) and subcellular (1-10 μm) scales with a precise localization of the different cellular components under the membrane. However, elements are observable only if previously stained with fluorophores. Each fluorophore activated at its excitation wavelength emits in return a fluorescent light at the emission wavelength (respectively λ_{Ex} and λ_{Em} in Table S3.1 below).

Table S3.1: Characteristics of the different fluorescent dyes used for the study.

Stained component	Type of staining	Fluorophore	λ_{Ex} (nm)	λ_{Em} (nm)
Actin (Cytoskeleton)	Direct (phalloidine)	Rhodamine (red)	554	579
α-SMA	Indirect (ACI mouse + ACII anti-mouse conjugué)	AlexaFluor 488 (green)	554 490	568 525
DNA (nucleus)	Direct (Hoescht)	Hoescht (blue)	350	470
Fibronectin (CYTOO™)	Already stained	Far red 650	640	658
Microbeads (Matrigen™)	Already stained	Yellow-Green (Life Technologies)	505	515

Some fluorophores can link directly onto their receptor like Phalloidin onto filamentous actin (F-actin) in the cytoskeleton and Hoescht on DNA in the nucleus. If Hoescht naturally emits a blue fluorescent light, Phalloidin has to be combined with a fluorescent tag (Rhodamin in our case). Other fluorophores need to be combined to antibodies notably for α -SMA staining in order to characterize SMC contractility. When antibodies are used for fluorescent staining (immunofluorescence), the fluorescence can be direct (with only one conjugated antibody against the cellular component to stain) or indirect (involving a non-conjugated primary antibody against the component to stain and a conjugated secondary antibody against the primary one). The list of all the fluorescent dyes used in this study with their characteristics is reported in Table S3.1.

For the initial observation of their morphology, cells were previously fixed with 4% Paraformaldehyde (PFA) in PBS once they had adhered and spread across the CYTOO™ fibronectin coating which were placed in a 35mm Petri dish. Since antibodies could not penetrate the porous membrane, it was necessary to render it permeable with a 0.1% TritonX100 in PBS solution. Then, PBS with 1% Bovine Serum Albumine (BSA) was used as a blocking reagent in order to avoid unspecific

bindings. Both the Hoescht and the Phalloidin fluorophores were diluted at 1/1000 in PBS for respectively 10 min and 1 hour. For α -SMA staining, we let the primary antibody at 1/200 and then the secondary at 1/500 for 1 hour each. The stained sample was kept away from light in PBS until achieving the TFM experiments which took place 1 day after (fluorophores tend to fade away in PBS after some days).

Only the Hoescht fluorophore can be used on living cells as it can penetrate into the cell membrane and it is much less toxic than phalloidin. Accordingly we used it for our TFM experiments in order to localize the living cells on the hydrogels (which was difficult otherwise). Generally, we had not to stain the nucleus to see the cells, because they were visible in bright light. And even if Hoescht may be cytotoxic in the long term, our experiments lasting less than 4 hours, it was better than frequent light exposure as SMCs showed a significant photosensitivity.

B. Appendix S3.2. DIC algorithm

In a first step, the ROI was divided into $N \times M$ square subsets. Each subset, denoted Ω_{ij} , was labelled by the coordinates of its center in the reference configuration, denoted (x_i, y_j) , with $1 \leq i \leq N$ and $1 \leq j \leq M$. The 2D deformation field across a given subset, from the reference to a deformed configuration was written such as:

$$\begin{aligned} u(x, y) &= u_{ij} + (x - x_i)u_{ij,x} + (y - y_j)u_{ij,y} \\ v(x, y) &= v_{ij} + (x - x_i)v_{ij,x} + (y - y_j)v_{ij,y} \end{aligned} \quad (\text{S3.10})$$

where $u_{ij} = u(x_i, y_j)$ and $v_{ij} = v(x_i, y_j)$ are the displacement components at (x_i, y_j) and $u_{ij,x}$, $u_{ij,y}$, $v_{ij,x}$ and $v_{ij,y}$ are four regularization parameters to be determined, permitting a more precise description of the subset deformation.

The basic principle of DIC is the following. In the reference configuration the image can be represented by the intensity level function $f(x, y)$, and in the deformed state by the intensity level function $g(x, y)$. Functions f and g were reconstructed continuously for any (x, y) position from the intensity level of each pixel using interpolation with biquintic B-splines. The conservation of intensity was assumed, yielding: $f(x, y) = g(x + u, y + v)$. The objective was to find unknowns u_{ij} , v_{ij} , $u_{ij,x}$, $u_{ij,y}$, $v_{ij,x}$ and $v_{ij,y}$ for each subset maximizing the cross-correlation between $f(x, y)$ and $g(x + u, y + v)$. We represented the set of unknowns for a given subset Ω_{ij} with a vector denoted \mathbf{p}_{ij} .

We used the NCorr open source 2D Digital Image Correlation (DIC) Matlab® toolbox (Blaber et al., 2015). The NCorr algorithm is an iterative algorithm seeking at each iteration for $\mathbf{p}_{ij}^{(n+1)} = \mathbf{p}_{ij}^{(n)} + \Delta\mathbf{p}_{ij}^{(n)}$ where $\Delta\mathbf{p}_{ij}^{(n)}$ maximizes the normalized cross-correlation coefficient:

$$c^{(n)}(\Delta\mathbf{p}_{ij}) = \frac{\iint_{\Omega_{ij}} (f(x-u(\Delta\mathbf{p}_{ij}^{(n)}), y-v(\Delta\mathbf{p}_{ij}^{(n)})) - \bar{f}_{ij})(g(x+u(\mathbf{p}_{ij}^{(n)}), y+v(\mathbf{p}_{ij}^{(n)})) - \bar{g}_{ij}) dx dy}{\sqrt{\iint_{\Omega_{ij}} (f(x-u(\Delta\mathbf{p}_{ij}^{(n)}), y-v(\Delta\mathbf{p}_{ij}^{(n)})) - \bar{f}_{ij})^2 dx dy \iint_{\Omega_{ij}} (g(x+u(\mathbf{p}_{ij}^{(n)}), y+v(\mathbf{p}_{ij}^{(n)})) - \bar{g}_{ij})^2 dx dy}} \quad (\text{S3.11})$$

Where \bar{f}_{ij} and \bar{g}_{ij} were the mean grayscale values for the Ω_{ij} subset (Pan et al., 2010). The non-linear optimization was achieved with the Gauss-Newton method, consisting in solving the following linear equation:

$$\nabla \nabla c^{(n)}(0) \Delta\mathbf{p}_{ij}^{(n)} = -\nabla c^{(n)}(0) \quad (\text{S3.12})$$

where the derivation of the Hessian $\nabla \nabla c^{(n)}(0)$ and the gradient $\nabla c^{(n)}(0)$ are documented in (Croeze et al., 2012) The process was initialized with $\mathbf{p}_{ij}^{(0)} = \{u_{ij}^{(0)}, v_{ij}^{(0)}, 0, 0, 0, 0\}$ where $u_{ij}^{(0)}$ and $v_{ij}^{(0)}$ are integer numbers of pixels maximizing the cross correlation between reference and deformed images.

We defined a ROI surrounding each SMC focal adhesion where the gel showed deformations during the recorded experiments (Chapter 3, Fig. 3.1.B). This means that we had a ROI surrounding each location where we had a traction force to be estimated. We used a subset size of 25 pixels to

assess the displacement fields in each ROI. The strain fields were derived from the displacement fields using a finite-difference scheme (Chapter 3, Fig. 3.1.B).

C. Appendix S3.3. Full TFM data on 24-well plates

Table S3.4 Mean traction force values measured on the 24-well plates, number of measurements (NB), mean value and standard deviation σ according to the different gels stiffness.

E (KPA)	4	8	12	25
F (nN)	1.9	77.9	23.9	12.7
	8.7	24	216.6	20.7
	6.2	7	62	31.7
	12.9	62	32.7	43.9
	19	57.9	10.3	65.8
	6.9	25.1	401.1	38.3
	4	27.6	105.5	32.7
	9.4	30.4	43.2	28.9
	6.5	21.3	82	44.5
	6.4	37.1	114.1	67.8
	8.7	78.1	168.4	38.4
	5.3	6.7	97.7	80.8
	8.6	64.6	100.9	20.9
	33.1	16.1	36.9	44.3
	28	4.5	22.8	11.3
	8.2	19	54.8	43.5
	3.6	7.4	11.6	12.3
	22.5	42.4	28.2	9.5
	7.6	10.1	24.4	19.8
	17.2	103.3	7.7	378.1
	6.2	35.4	9.2	10.6
	44.5	32.1	5.5	34.6
	40.3	13	28.4	34.3
	85	12.2	21.6	11
	32.2	24.3	19.8	198.3
	35.7	9.9	50.3	27.9
	5.6	30.6	76.4	33.6
	28.1	65.6	24.4	29.2
	14.8	8.2	27.5	17.2
	43.7	41	42.3	13.4
	15.9	13.4	49.2	36.8
	4.6	17.4	40.9	11.2
	23	11.9	13.9	13.2
	15	18.2	11.8	7.2
	62.6	91.3	35.4	41.1
	145.8	36.1	16.6	12.5
	44.6	40	54.4	
	16.1	6.4	66.4	
		41.4		
		36.9		
		24.5		
		9.9		
		49		
		61.4		
N	38	44	38	36
Mean	23.4	33.0	58.9	43.8

II. Chapitre 4

A. Appendix S4.1. SMC architecture and morphology

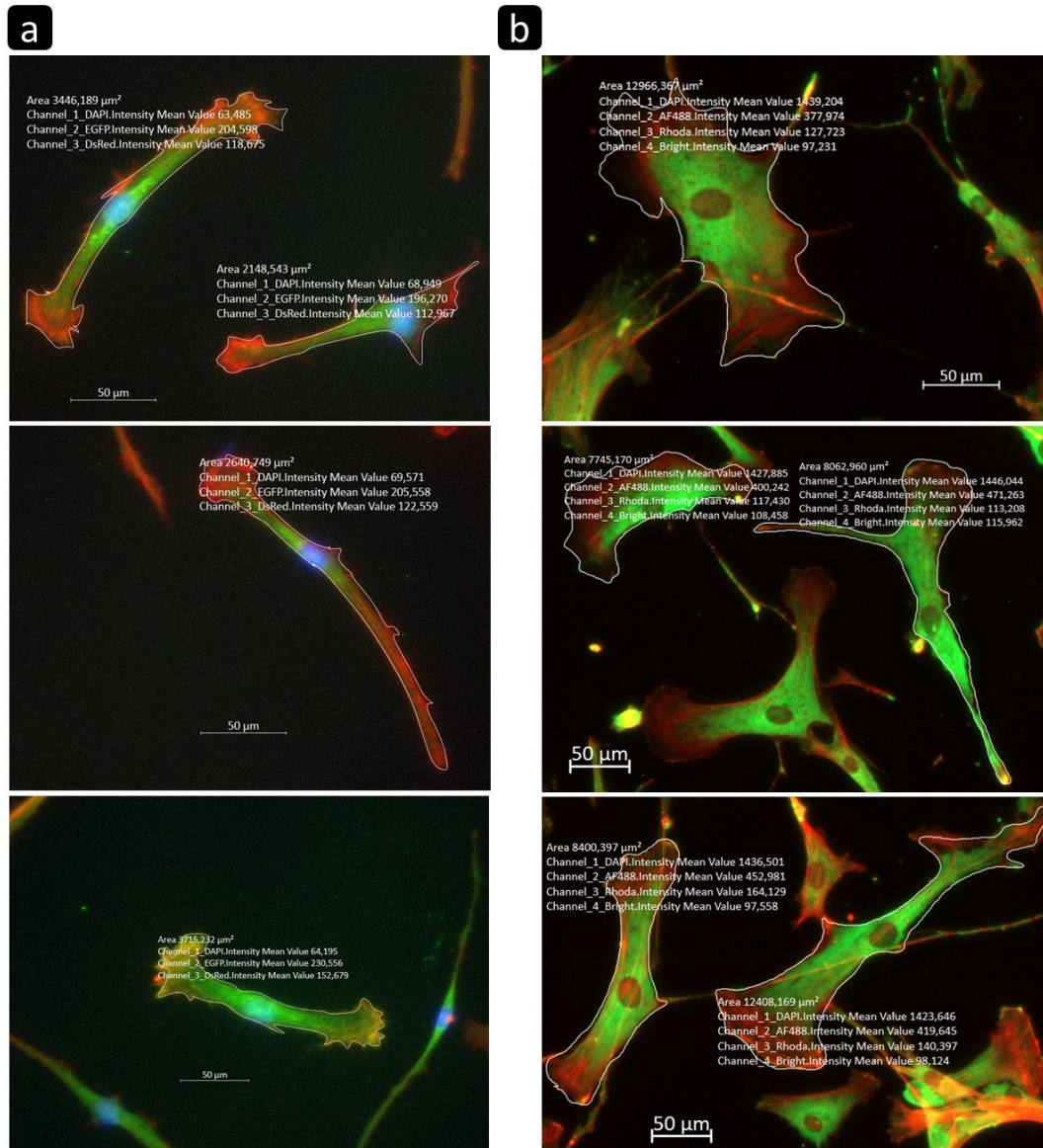


Figure S4.1 Examples of morphological and fluorescent intensity measurements on several SMCs. Three images of healthy SMCs are shown in (a) and three images of aneurysmal SMCs are shown in (b). The red channel is for F-actin and the green channel for α -SMA. The intensity values were coded on 12 bits (i.e. 0 for black and 4096 for white). The fluorescent images were post-processed manually (segmentation of their contours) with the Zen Software[®].

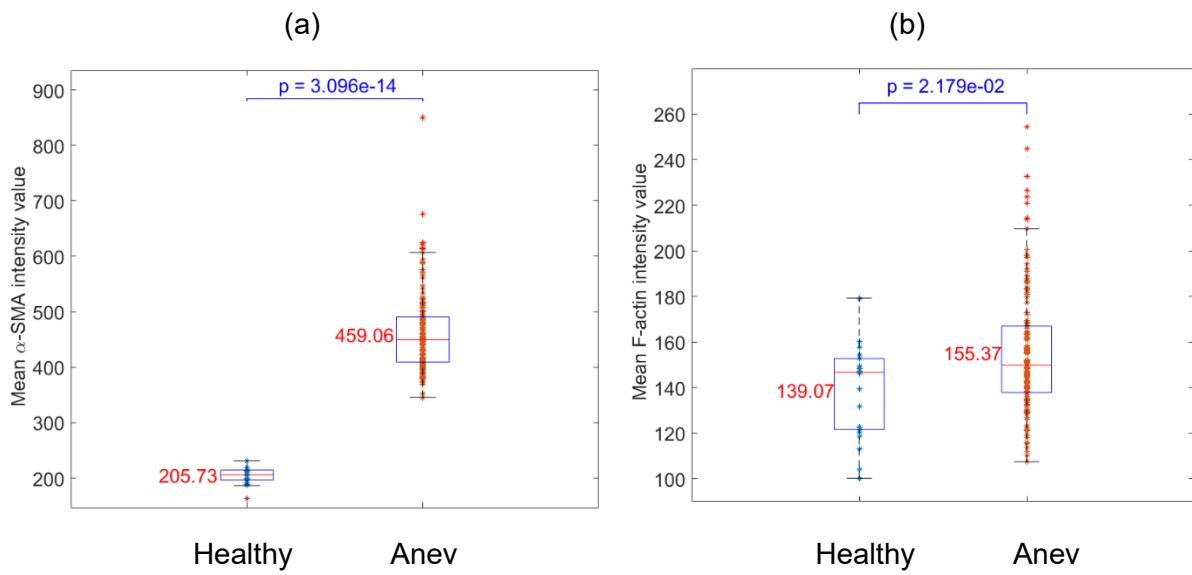


Figure S4.2 Distributions of mean intensity values for α -SMA (GFP channel) (a) and F-Actin (Ds-RED channel) (b). Median values are reported for a clearer comparison. A significant difference was found between α -SMA values of healthy and aneurysmal cells using the Mann-Whitney statistical test.

B. Appendix S4.2. Full TFM data on 24-well plates

Table S4.1 Mean traction force values of the experimental data for AoPrim and AnevPrim SMCs on every gel stiffness. ΔF is the difference between maximal and minimal values on the whole stiffness range.

Stiffness	4 kPa	8 kPa	12 kPa	25 kPa	ΔF
AoPrim					
AoPrim 1	55.6 nN	78.0 nN	95.1 nN	100.4 nN	418.3 nN
AoPrim 2	54.9 nN	46.8 nN	25.6 nN	70.2 nN	262.8 nN
AoPrim 3	51.9 nN	74.7 nN	74.7 nN	80.0 nN	341.9 nN
AnevPrim					
AnevPrim 1	44.7 nN	49.8 nN	80.3 nN	103.1 nN	454.1 nN
AnevPrim 2	112.2 nN	126.7 nN	155.9 nN	120.6 nN	774.0 nN
AnevPrim 3	116.6 nN	215.1 nN	383.2 nN	208.5 nN	843.9 nN

Table S4.2 Fraction of traction force values below 60 nN and above 200 nN for AoPrim and AnevPrim SMCs.

	4 kPa	8 kPa	12 kPa	25 kPa
AoPrim				
<i>AoPrim1</i>				
F < 60 nN	68.8 %	31.3 %	52.9 %	47.1 %
F > 200 nN	6.2 %	0 %	11.8 %	5.9 %
<i>AoPrim2</i>				
F < 60 nN	69.6 %	68.2 %	90.9 %	50.0 %
F > 200 nN	0 %	4.6 %	0 %	0 %
<i>AoPrim3</i>				
F < 60 nN	75.0 %	50.0 %	43.5 %	50.0 %
F > 200 nN	4.2 %	4.5 %	4.4 %	0 %
AnevPrim				
<i>AnevPrim1</i>				
F < 60 nN	81.5 %	75.0 %	53.7 %	42.9 %
F > 200 nN	7.4 %	5.0 %	7.3 %	14.3 %
<i>AnevPrim2</i>				
F < 60 nN	16.2 %	16.0 %	27.3 %	28.9 %
F > 200 nN	13.5 %	16.0 %	29.5 %	15.8 %
<i>AnevPrim3</i>				
F < 60 nN	27.1 %	8.9 %	1.8 %	4.4 %
F > 200 nN	20.8 %	42.2 %	75.9 %	40.0 %

Table S4.3 P-values characterizing the significance between two populations of the boxplot data showing the distribution of the measured traction forces (TF) (experimental data) for AoPrim and AnevPrim lineages for each gel stiffness. Significance between two populations was assessed using a Mann-Whitney test. Significance was stated there for $p < 5\%$. P-values below this threshold are written in red.

a							b						
4kPa	Ao1	Ao2	Ao3	Anev1	Anev2	Anev3	8kPa	Ao1	Ao2	Ao3	Anev1	Anev2	Anev3
Ao1	1	0.79	0.77	0.26	4.37E-04	5.30E-04	Ao1	1	1.25E-02	0.56	1.23E-02	7.91E-03	1.21E-04
Ao2		1	0.94	0.17	3.14E-04	1.62E-04	Ao2		1	5.00E-02	0.72	5.21E-07	3.64E-08
Ao3			1	7.30E-02	5.57E-05	2.83E-05	Ao3			1	1.82E-02	1.90E-03	4.27E-05
Anev1				1	2.24E-06	1.32E-07	Anev1				1	2.86E-08	1.38E-10
Anev2					1	0.80	Anev2					1	3.24E-03
Anev3						1	Anev3						1

c							d						
12kPa	Ao1	Ao2	Ao3	Anev1	Anev2	Anev3	25kPa	Ao1	Ao2	Ao3	Anev1	Anev2	Anev3
Ao1	1	8.74E-04	0.85	0.68	2.48E-02	5.19E-07	Ao1	1	0.43	0.80	0.89	0.15	2.36E-04
Ao2		1	2.93E-04	3.04E-04	3.41E-09	1.46E-11	Ao2		1	0.47	0.55	4.12E-03	3.77E-07
Ao3			1	0.83	1.24E-03	5.48E-10	Ao3			1	1	3.88E-02	1.05E-06
Anev1				1	5.39E-04	6.27E-13	Anev1				1	3.79E-02	3.18E-06
Anev2					1	2.69E-08	Anev2					1	3.97E-04
Anev3						1	Anev3						1

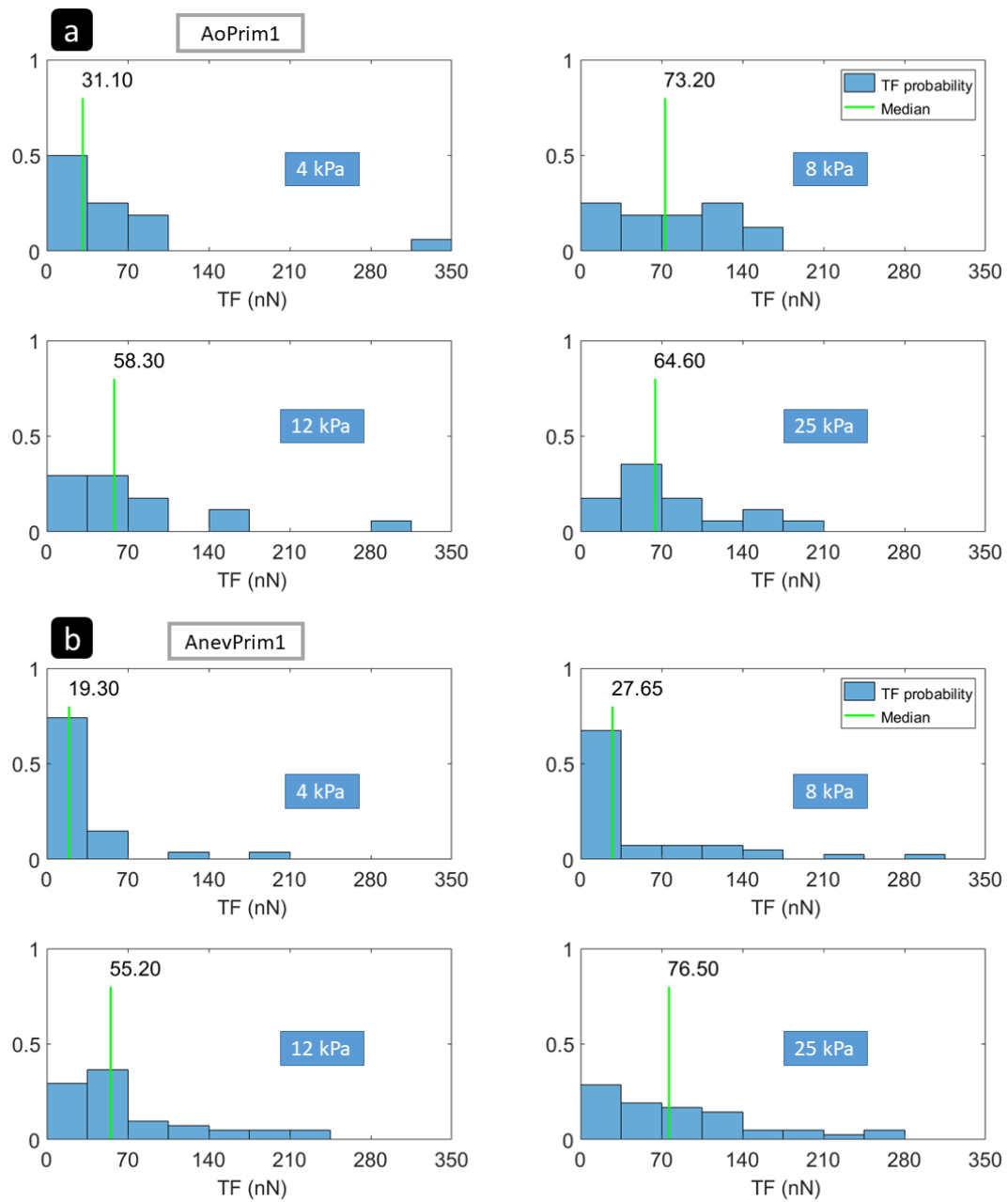


Figure S4.3 Histograms showing the distribution of the measured traction forces (TF) (experimental data) for AoPrim1 (a) and AnevPrim1 (b) lineages, and for each gel stiffness: 4, 8, 12, and 25 kPa (width of each bar: 35 nN). The green vertical bar represents the median.

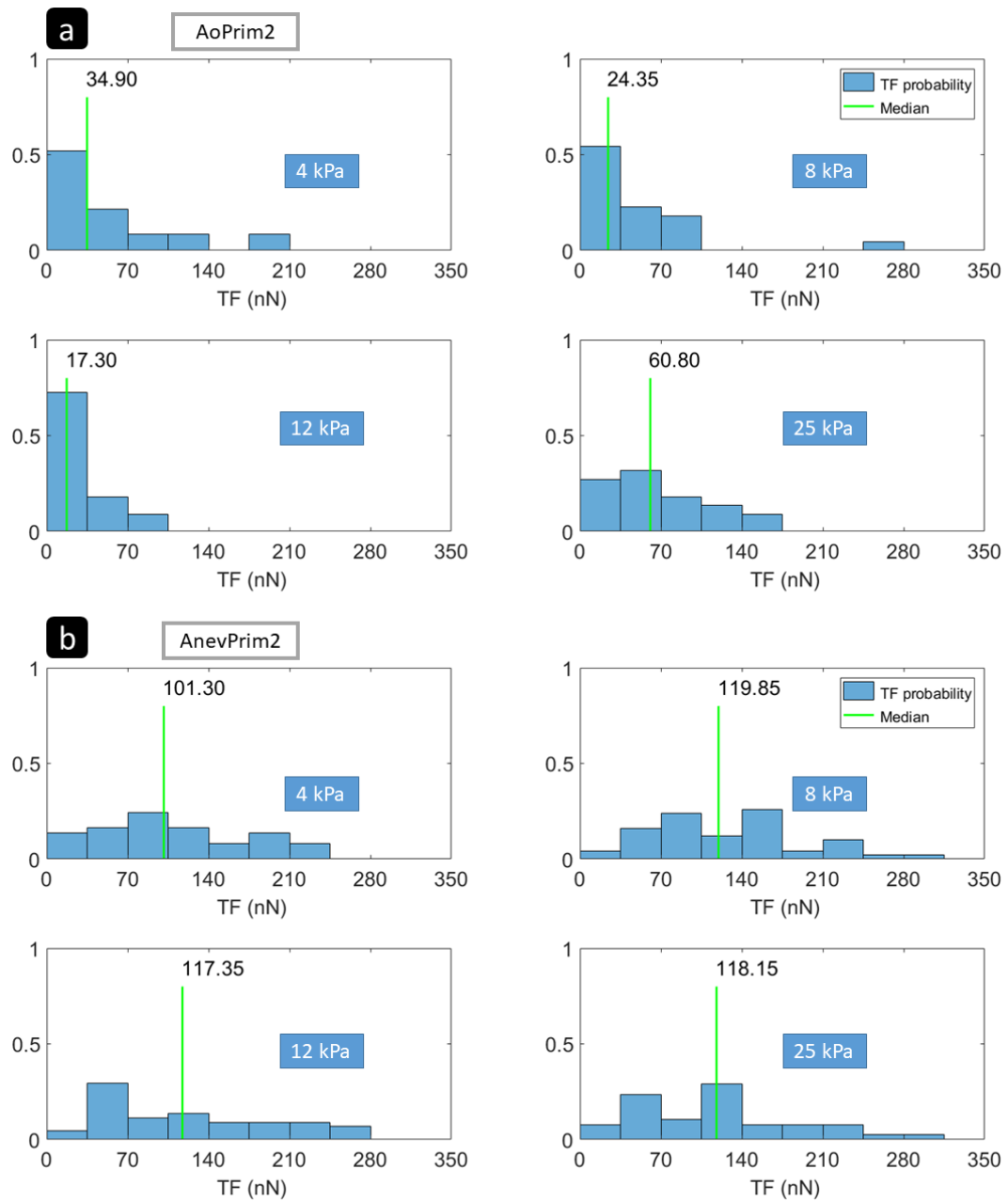


Figure S4.4 Histograms showing the distribution of the measured traction forces (TF) (experimental data) for AoPrim2 (a) and AnevPrim2 (b) lineages, and for each gel stiffness: 4, 8, 12, and 25 kPa (width of each bar: 35 nN). The green vertical bar represents the median.

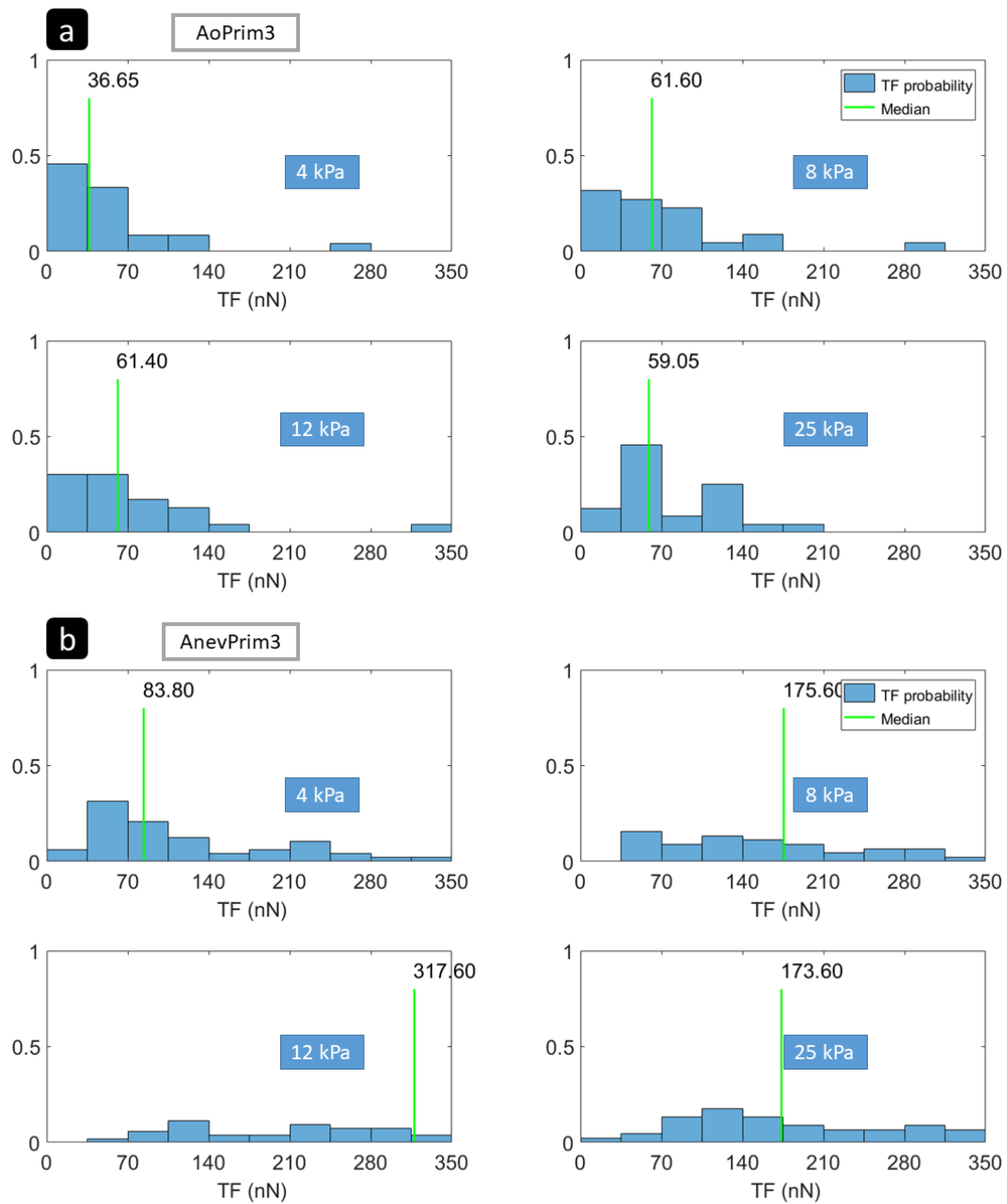


Figure S4.5 Histograms showing the distribution of the measured traction forces (TF) (experimental data) for AoPrim3 (a) and AnevPrim3 (b) lineages, and for each gel stiffness: 4, 8, 12, and 25 kPa (width of each bar: 35 nN). The green vertical bar represents the median.

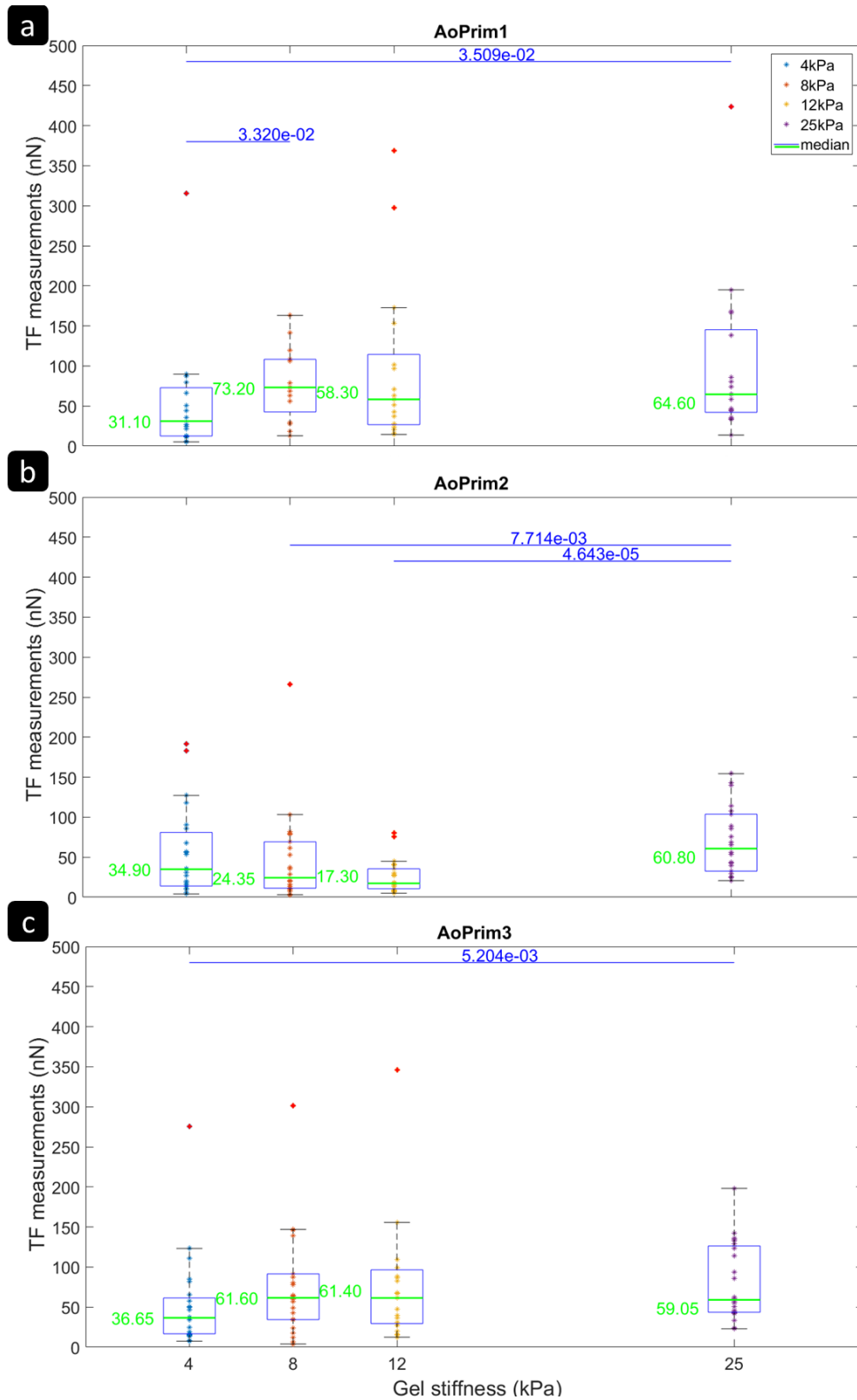


Figure S4.6 Boxplots showing the distribution of the measured traction forces (TF) (experimental data) for AoPrim1 (a), AoPrim2 (b), and AoPrim3 (c) lineages, and for each gel stiffness: 4, 8, 12, and 25 kPa. Significance between two populations was assessed using a Mann-Whitney test. Significance was stated for $p < 5\%$. Only p -values below the 5% threshold are reported in the figure. Median values are also reported for a clearer comparison.

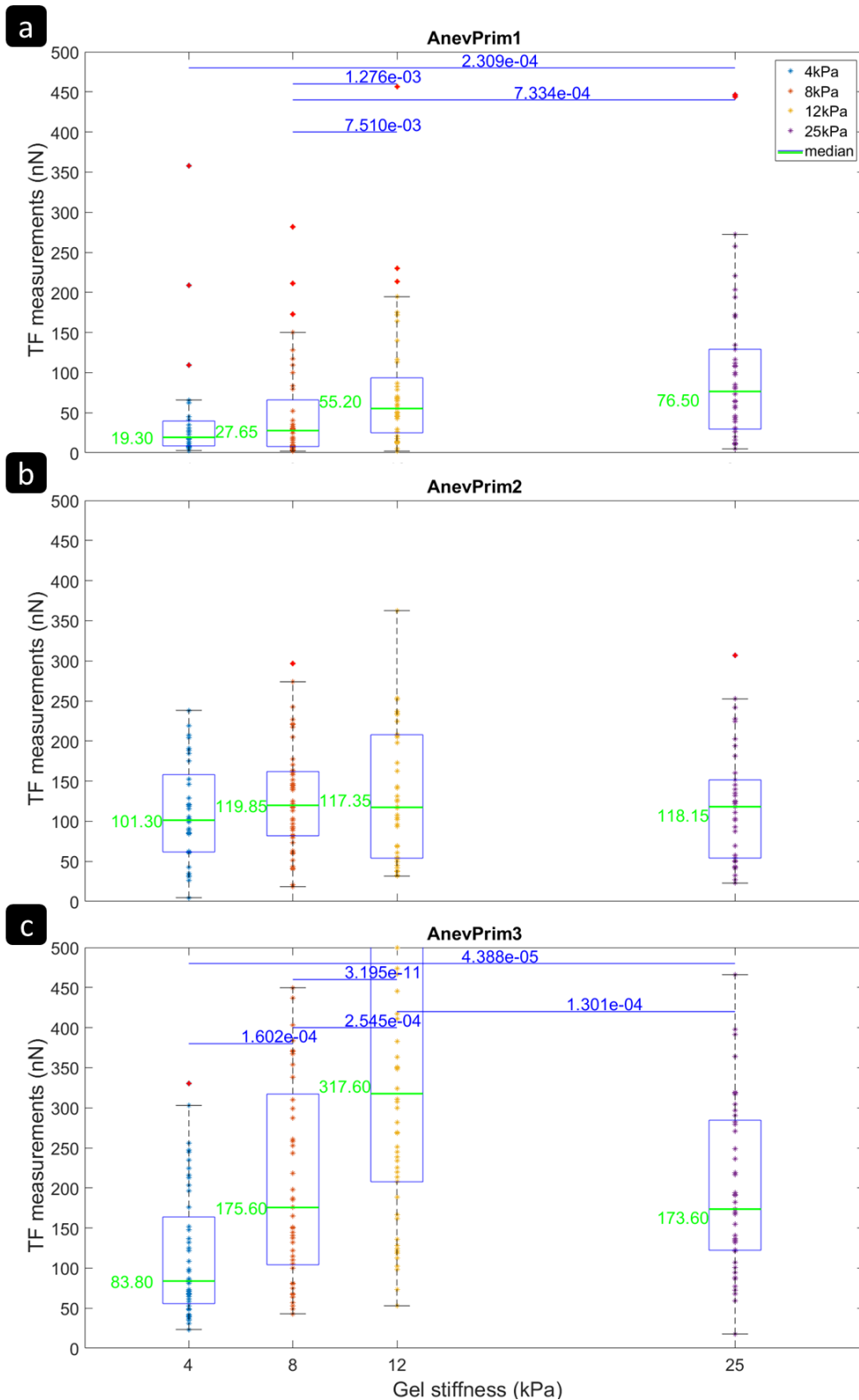


Figure S4.7 Boxplots showing the distribution of the measured traction forces (TF) (experimental data) for AnevPrim1 (a), AnevPrim2 (b), and AnevPrim3 (c) lineages, and for each gel stiffness: 4, 8, 12, and 25 kPa. Significance between two populations was assessed using a Mann-Whitney test. Significance was stated for $p < 5\%$. Only p -values below the 5% threshold are reported in the figure. Median values are reported for a clearer comparison.

III. Chapitre 5

A. Appendix S5.1. Full data about morphological and nanomechanical mapping

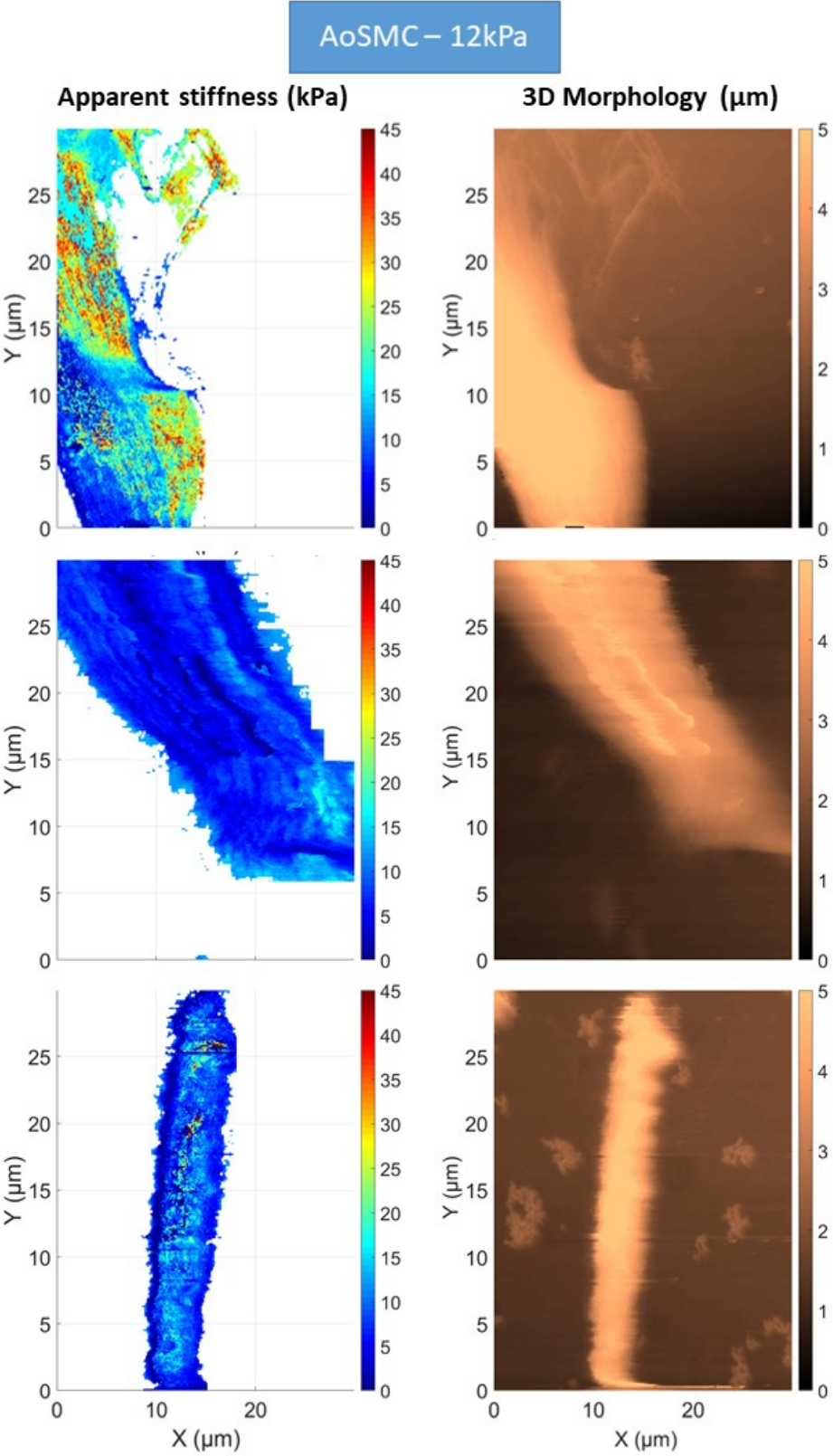


Figure S5.1: Apparent stiffness mapping (left) and cell morphology (right) images for AoSMCs on 12kPa gels obtained in QI mode.

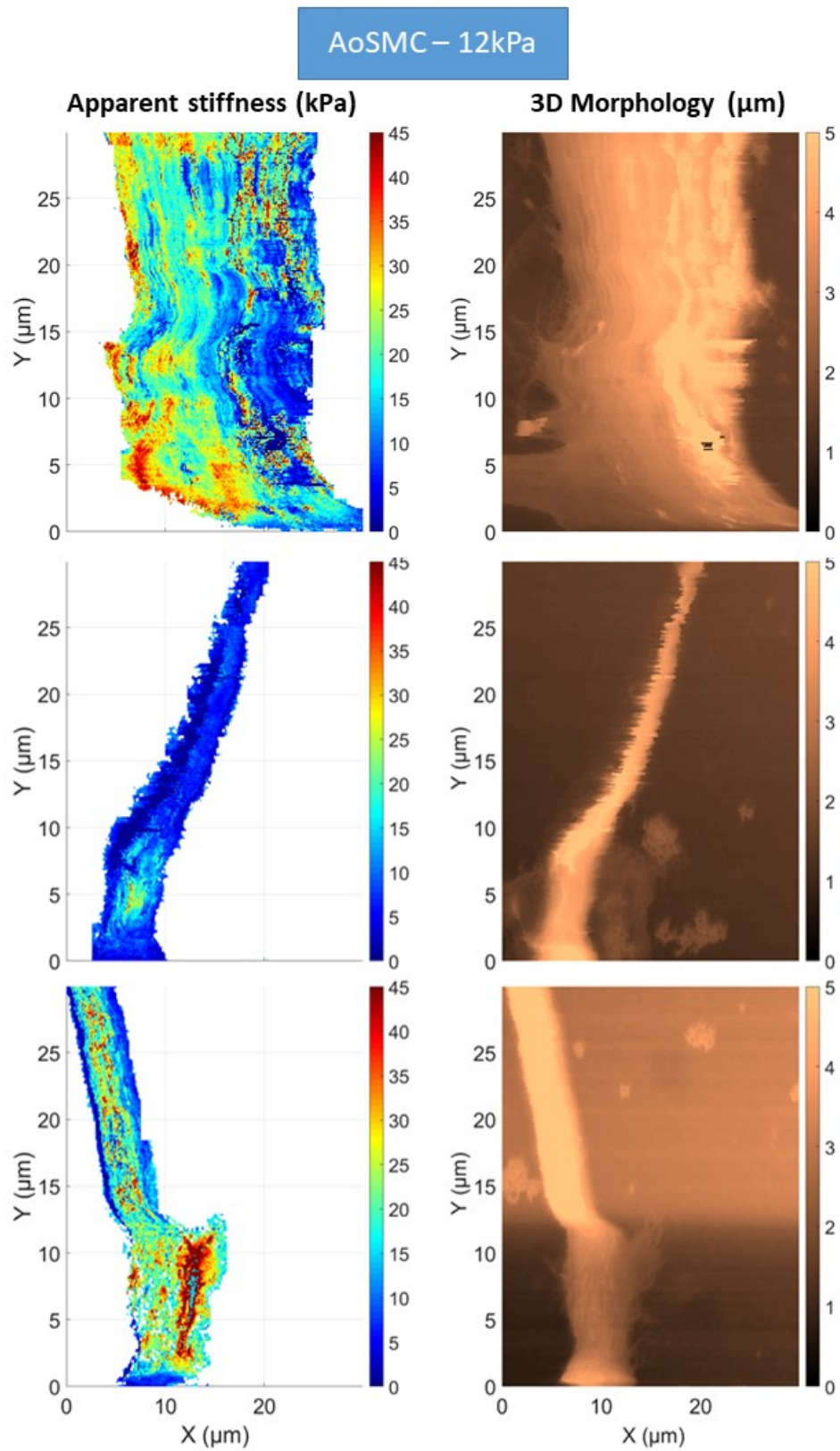


Figure S5.2: Apparent stiffness mapping (left) and cell morphology (right) images for AoSMCs on 12kPa gels obtained in QI mode.

AoSMC – 12kPa

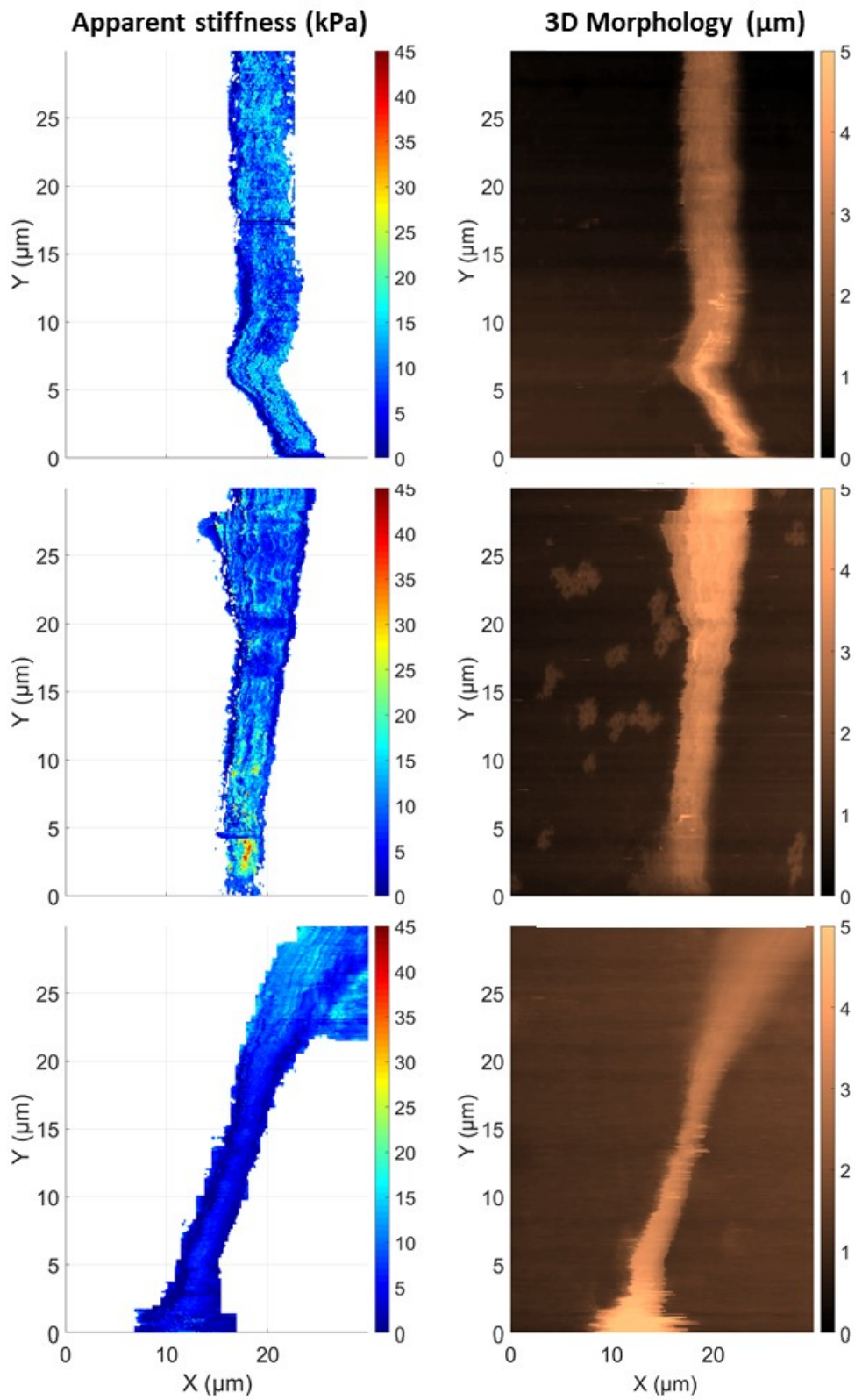


Figure S5.3: Apparent stiffness mapping (left) and cell morphology (right) images for AoSMCs on 12kPa gels obtained in QI mode.

AoSMC – 12kPa

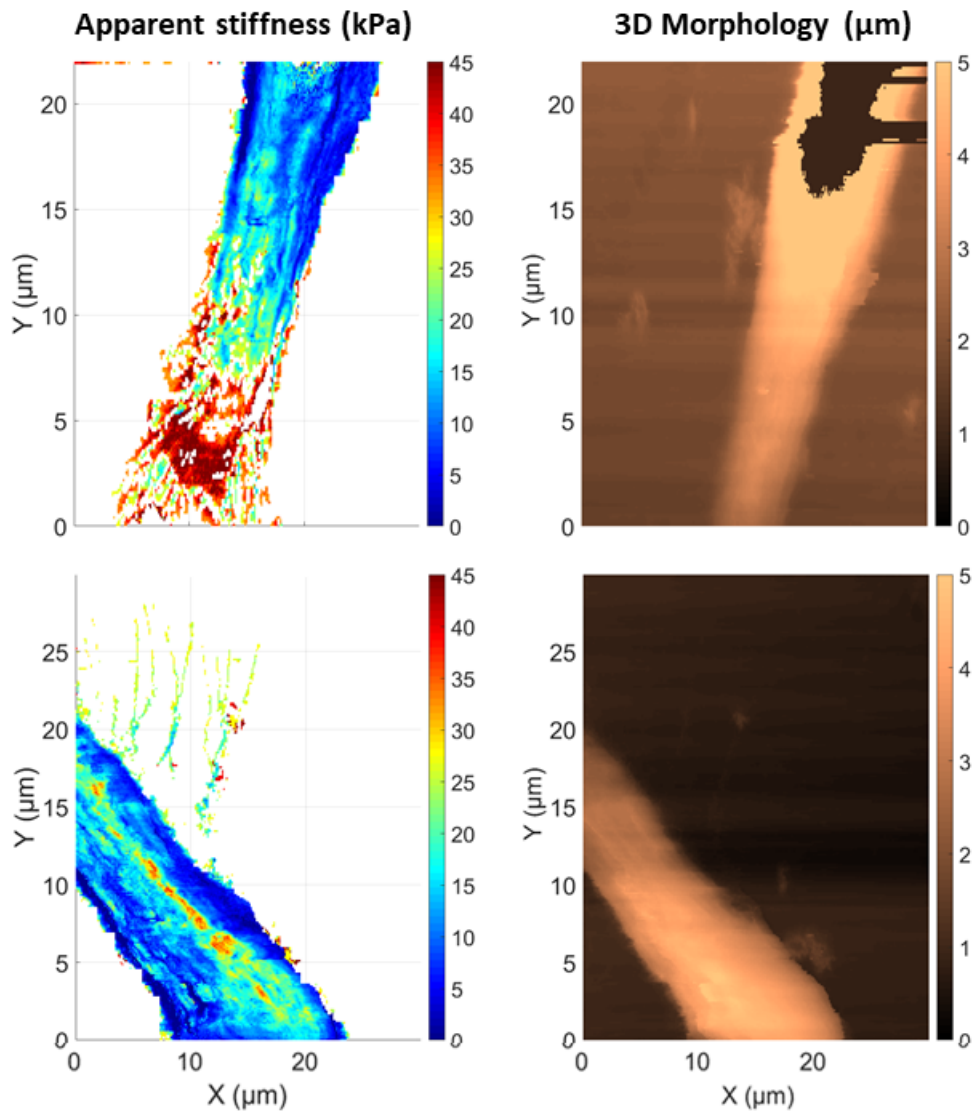


Figure S5.4: Apparent stiffness mapping (left) and cell morphology (right) images for AoSMCs on 12kPa gels obtained in QI mode.

AnevSMC – 12kPa

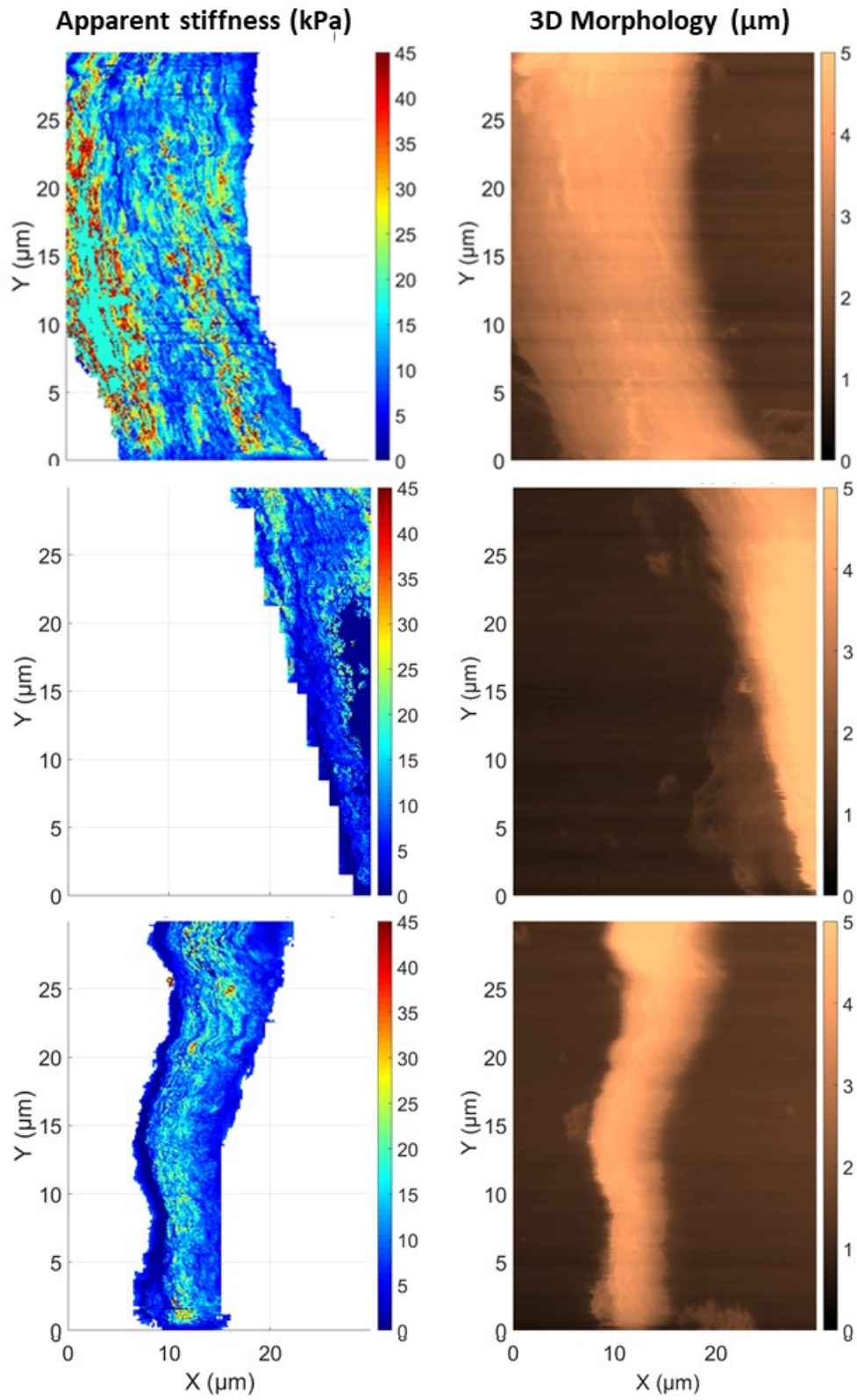


Figure S5.5: Apparent stiffness mapping (left) and cell morphology (right) images for AnevSMCs on 12kPa gels obtained in QI mode.

AnevSMC – 12kPa

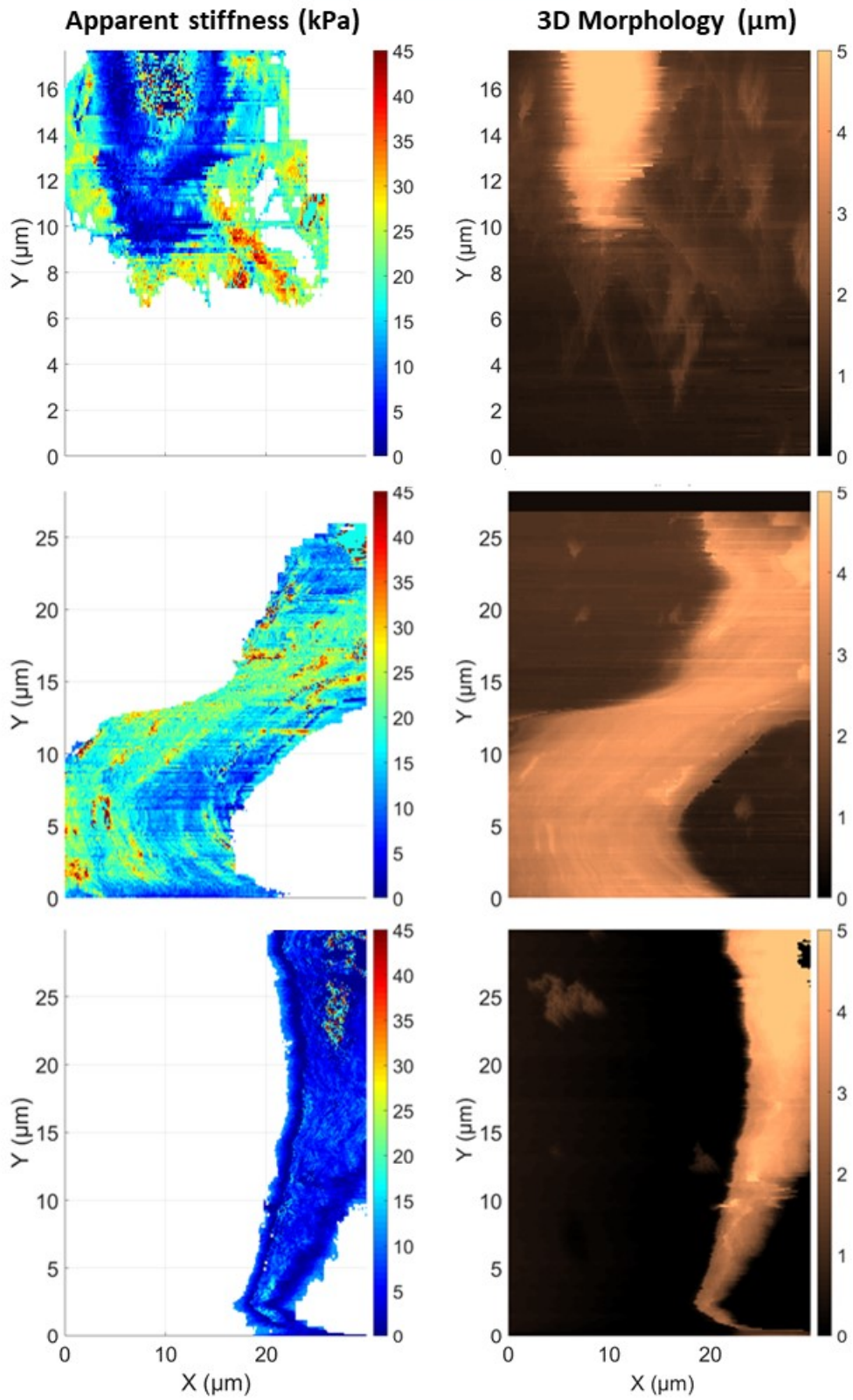


Figure S5.6: Apparent stiffness mapping (left) and cell morphology (right) images for AnevSMCs on 12kPa gels obtained in QI mode.

AnevSMC – 12kPa

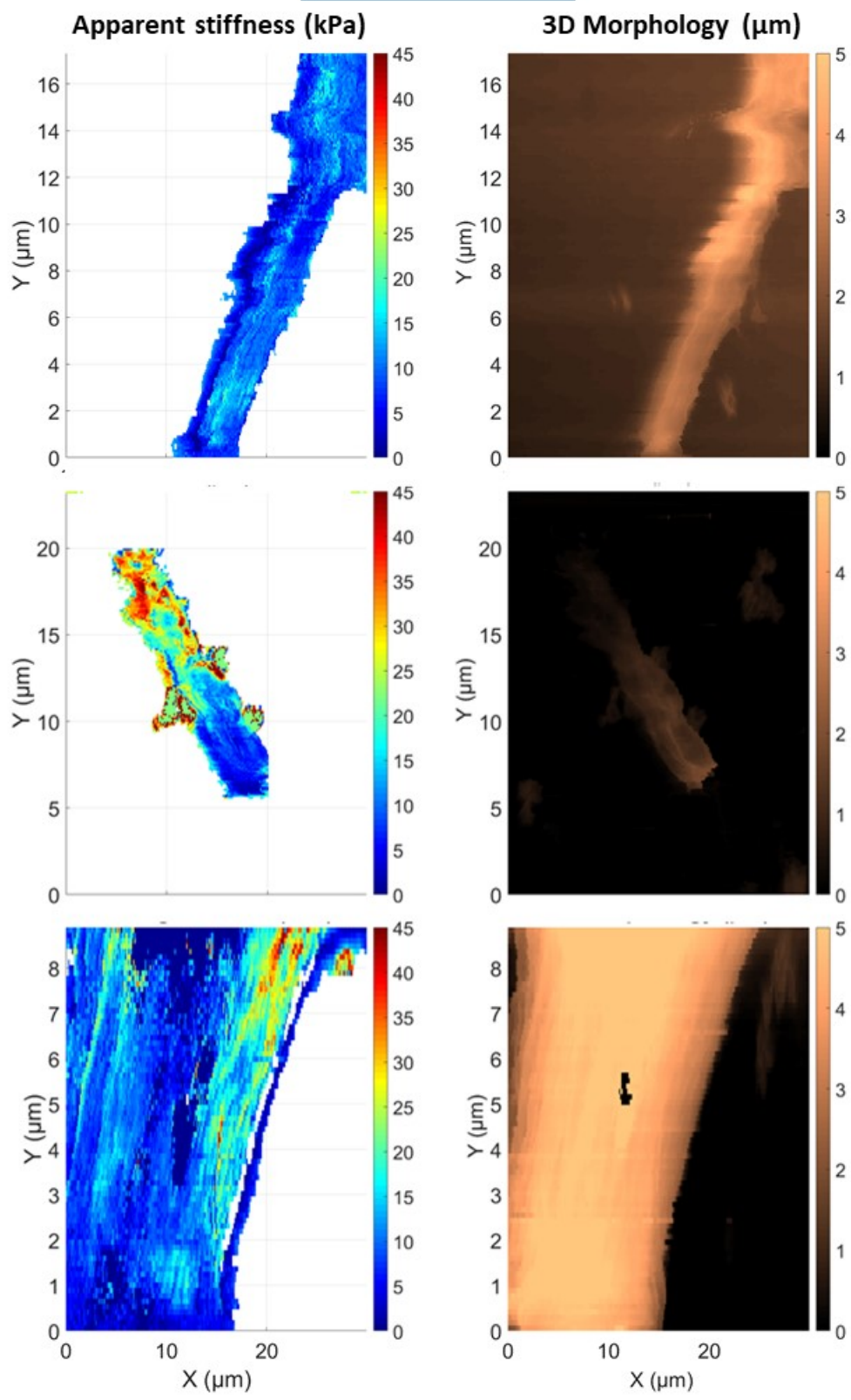


Figure S5.7: Apparent stiffness mapping (left) and cell morphology (right) images for AnevSMCs on 12kPa gels obtained in QI mode.

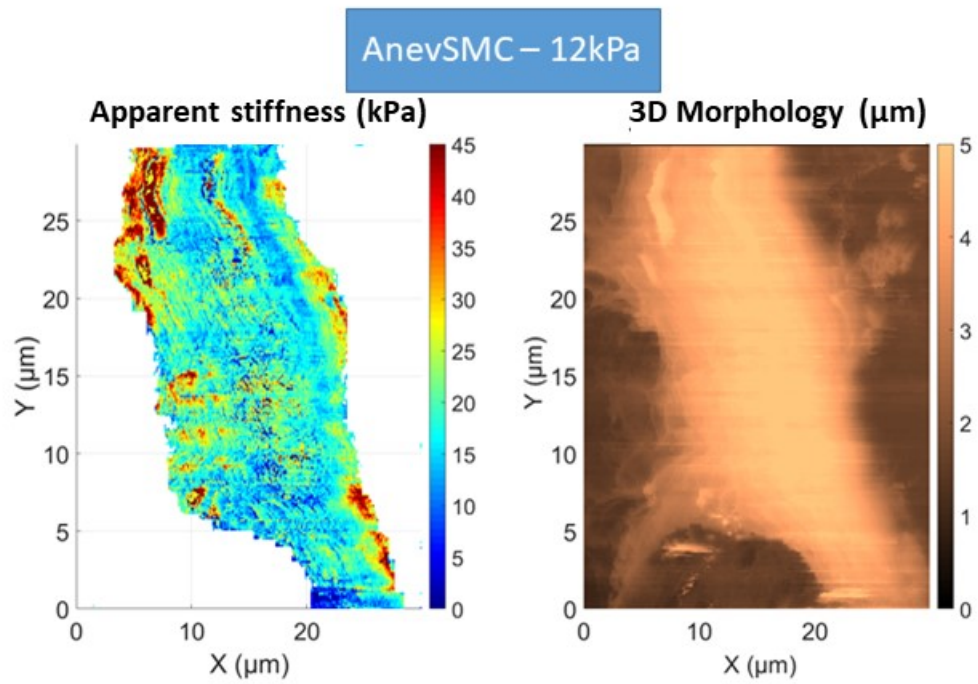


Figure S5.8: Apparent stiffness mapping (left) and cell morphology (right) images for AnevSMCs on 12kPa gels obtained in QI mode.

AoSMC – 25kPa

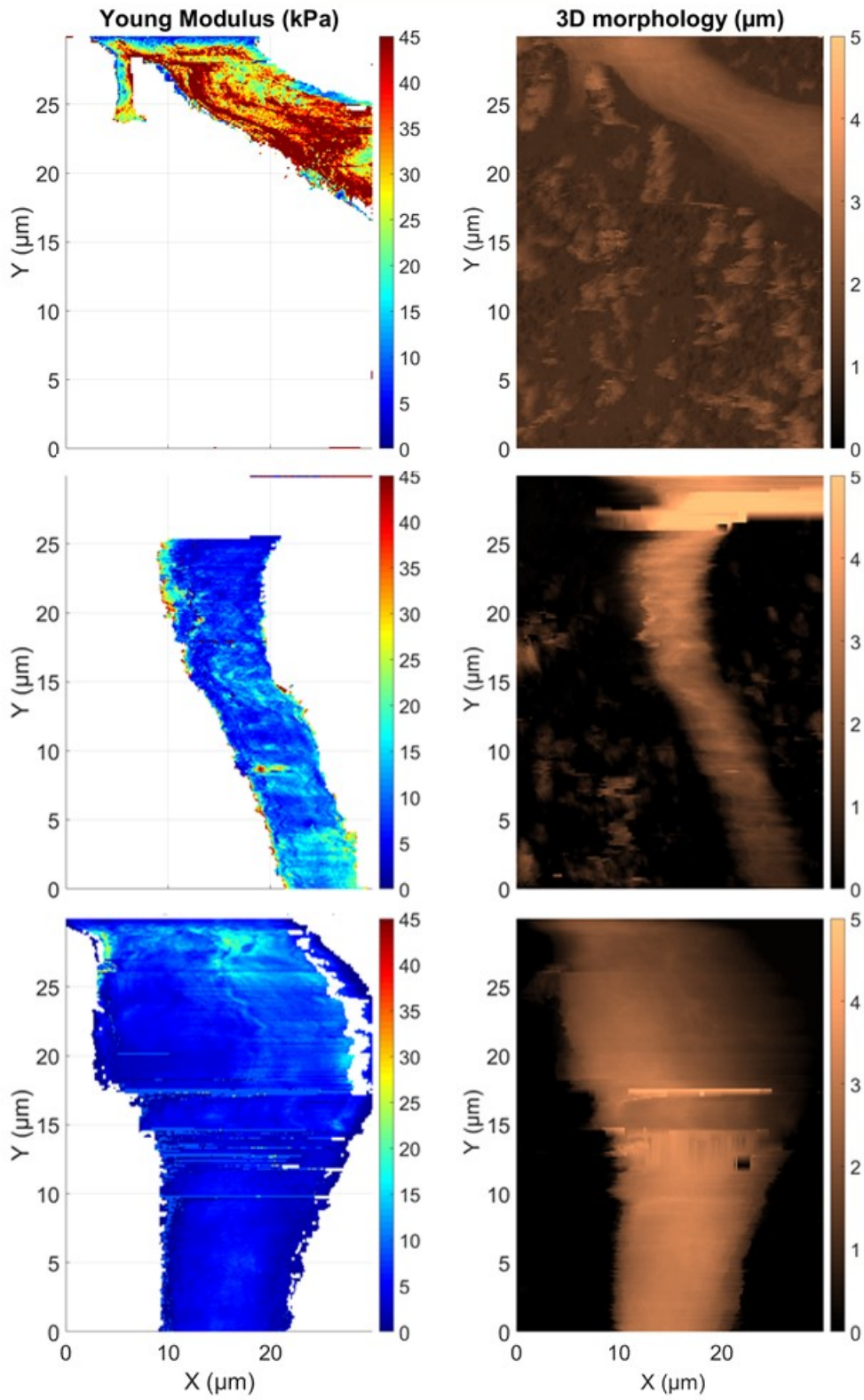


Figure S5.9: Apparent stiffness mapping (left) and cell morphology (right) images for AoSMCs on 25kPa gels obtained in QI mode.

AoSMC – 25kPa

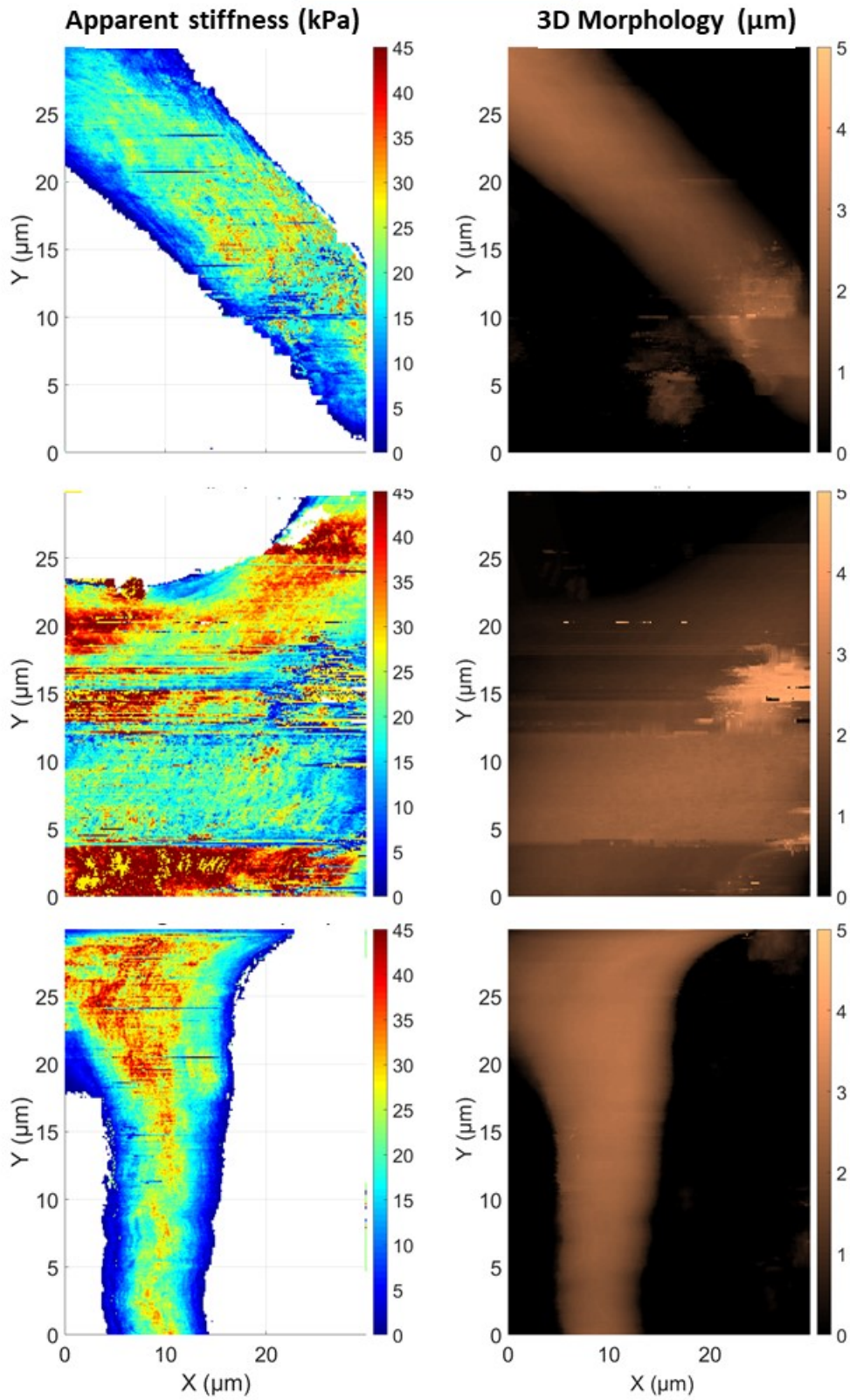


Figure S5.10: Apparent stiffness mapping (left) and cell morphology (right) images for AoSMCs on 25kPa gels obtained in QI mode.

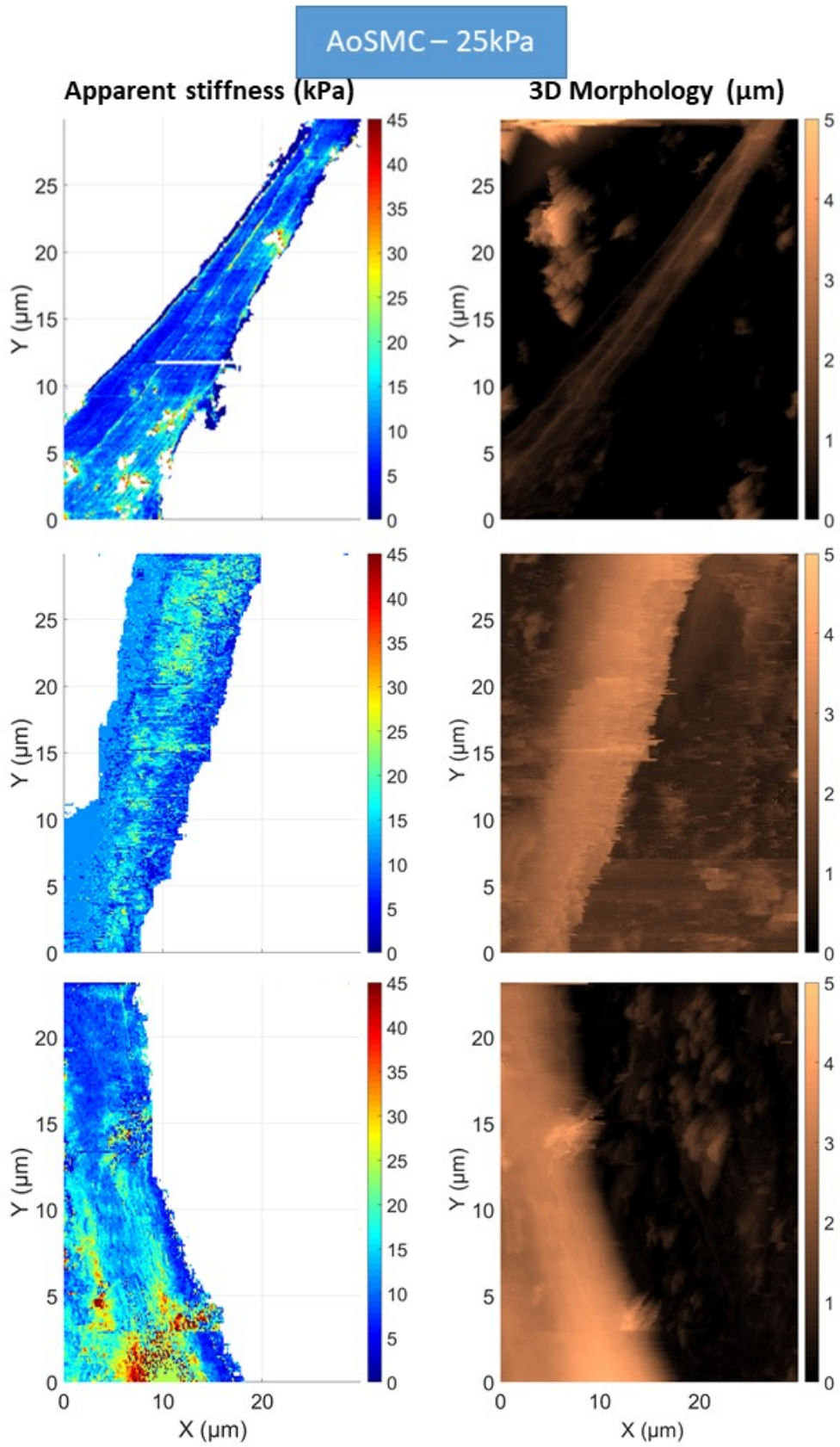


Figure S5.11: Apparent stiffness mapping (left) and cell morphology (right) images for AoSMCs on 25kPa gels obtained in QI mode.

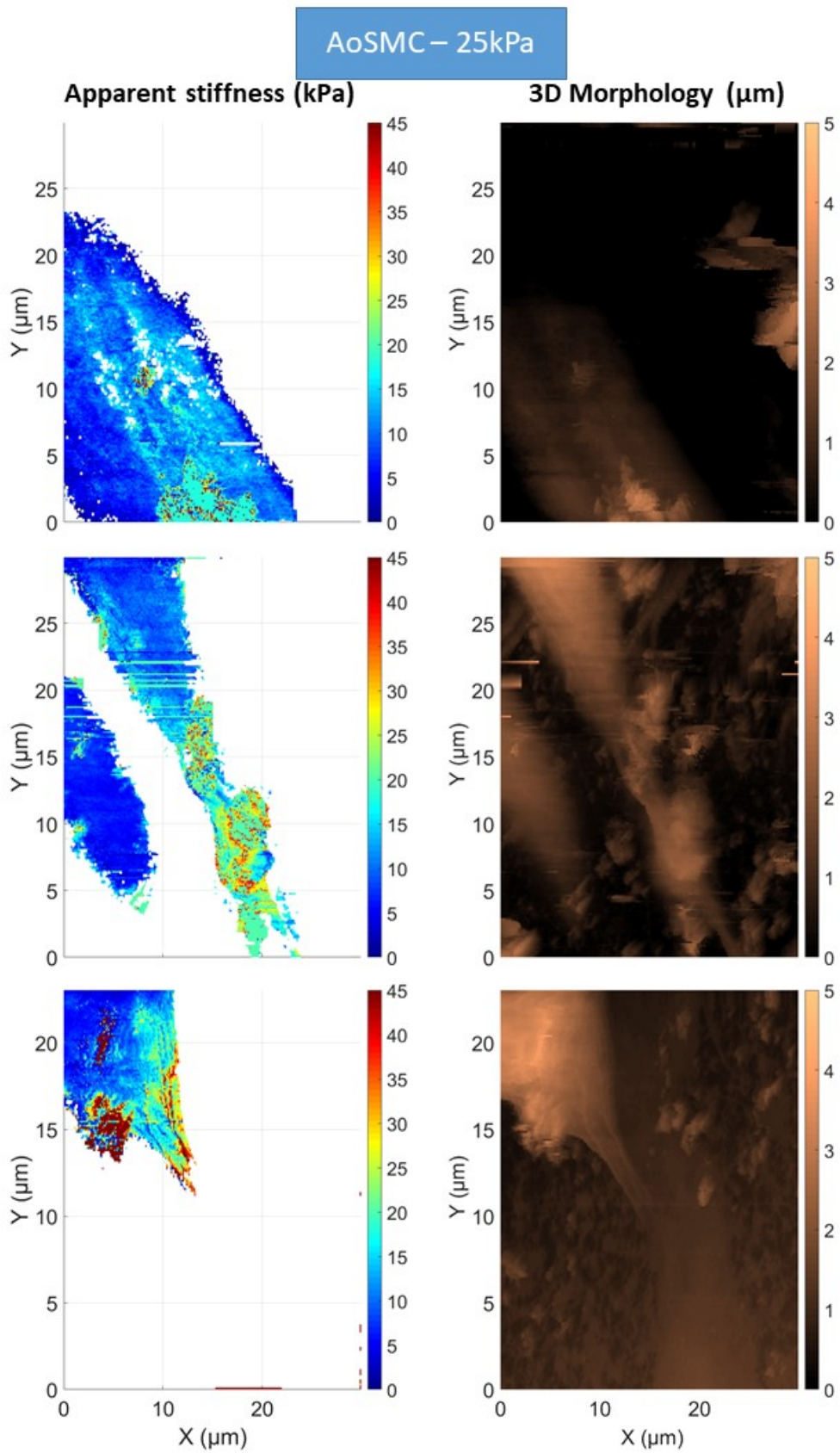


Figure S5.12: Apparent stiffness mapping (left) and cell morphology (right) images for AoSMCs on 25kPa gels obtained in QI mode.

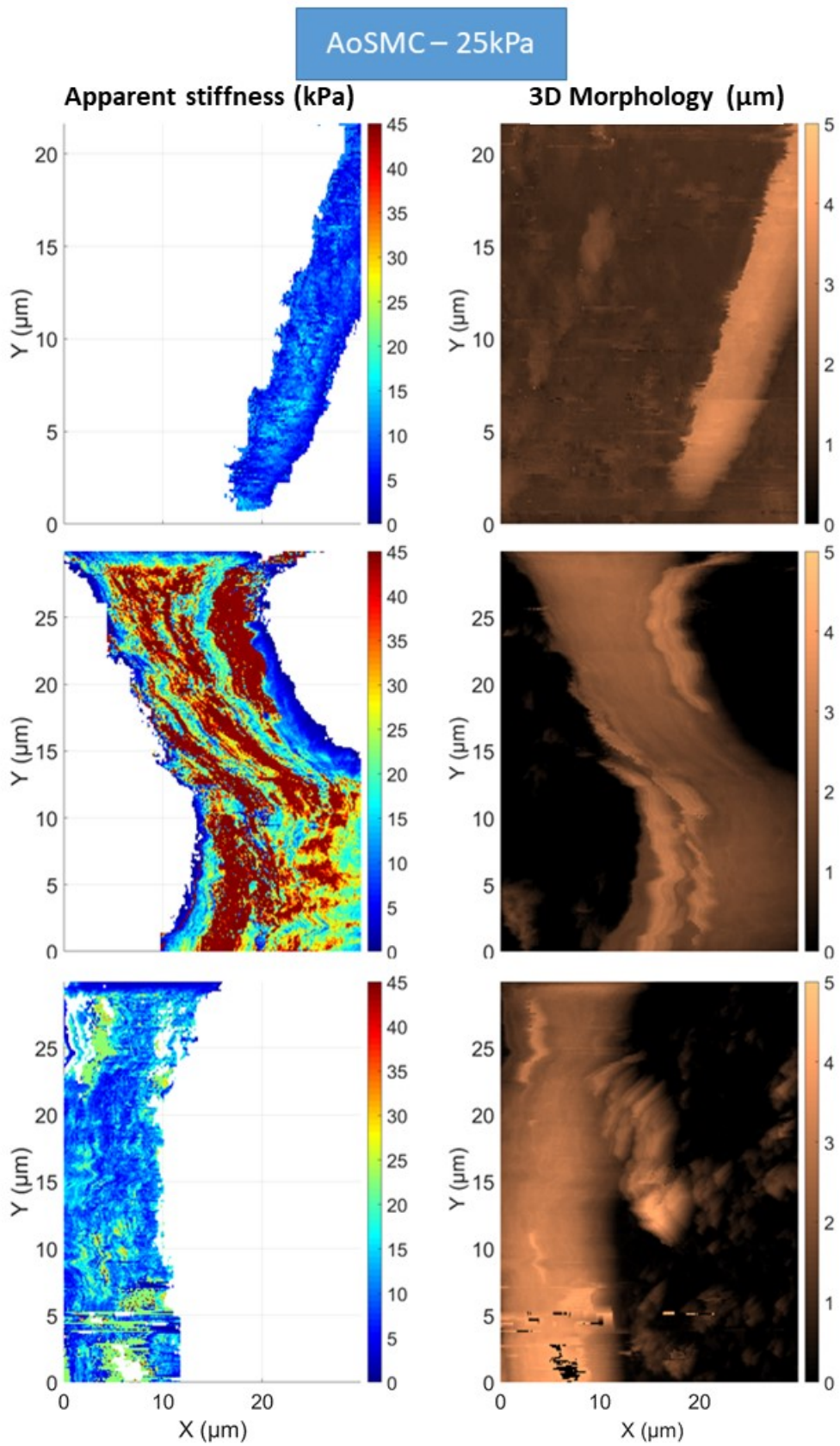


Figure S5.13: Apparent stiffness mapping (left) and cell morphology (right) images for AoSMCs on 25kPa gels obtained in QI mode.

B. Appendix S5.2. Full data about the distribution of apparent stiffness values

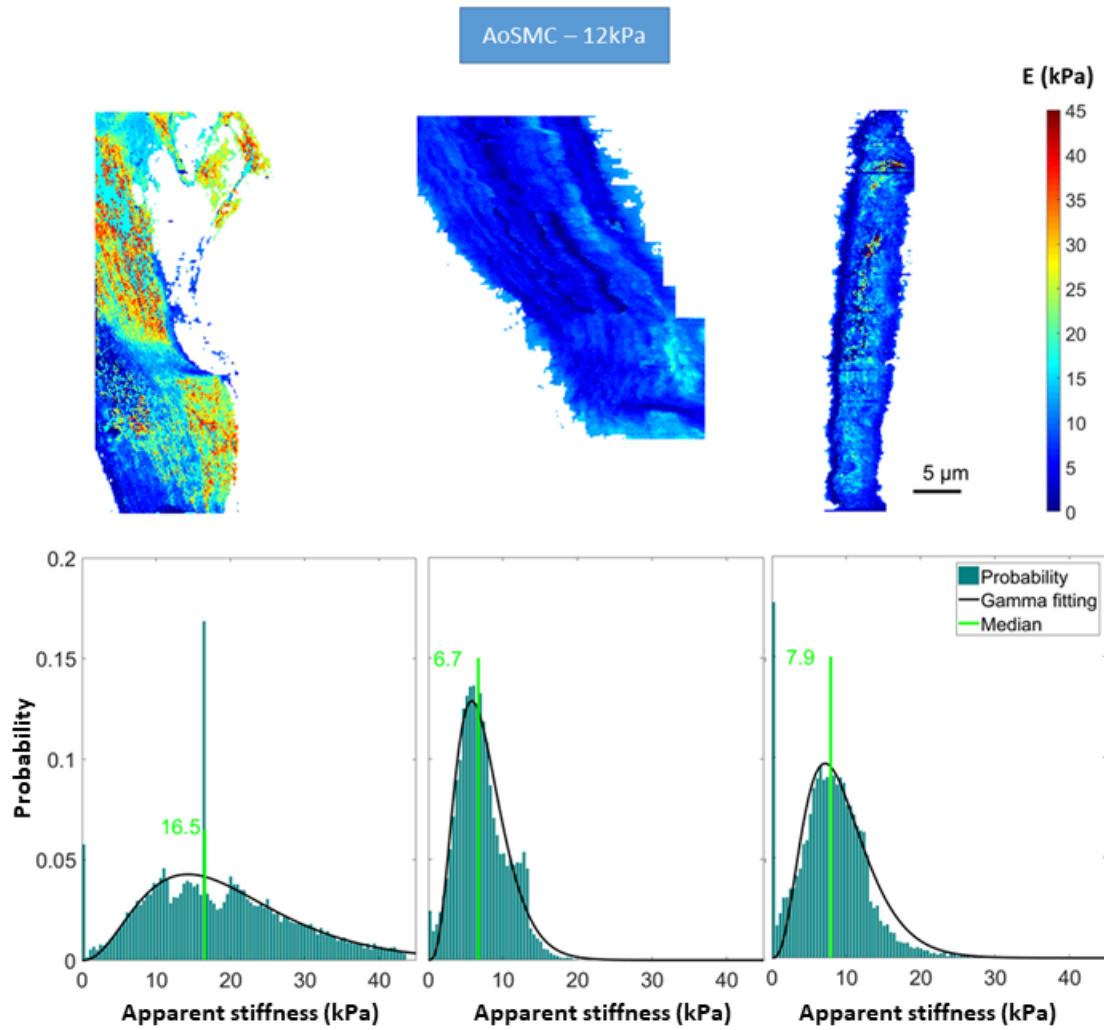


Figure S5.14: Apparent stiffness mapping (up) and corresponding distributions of the measured values (bottom) for AoSMCs on 12 kPa gels. The green vertical line represents the median, and the black curve the fitting of the data with a Gamma distribution.

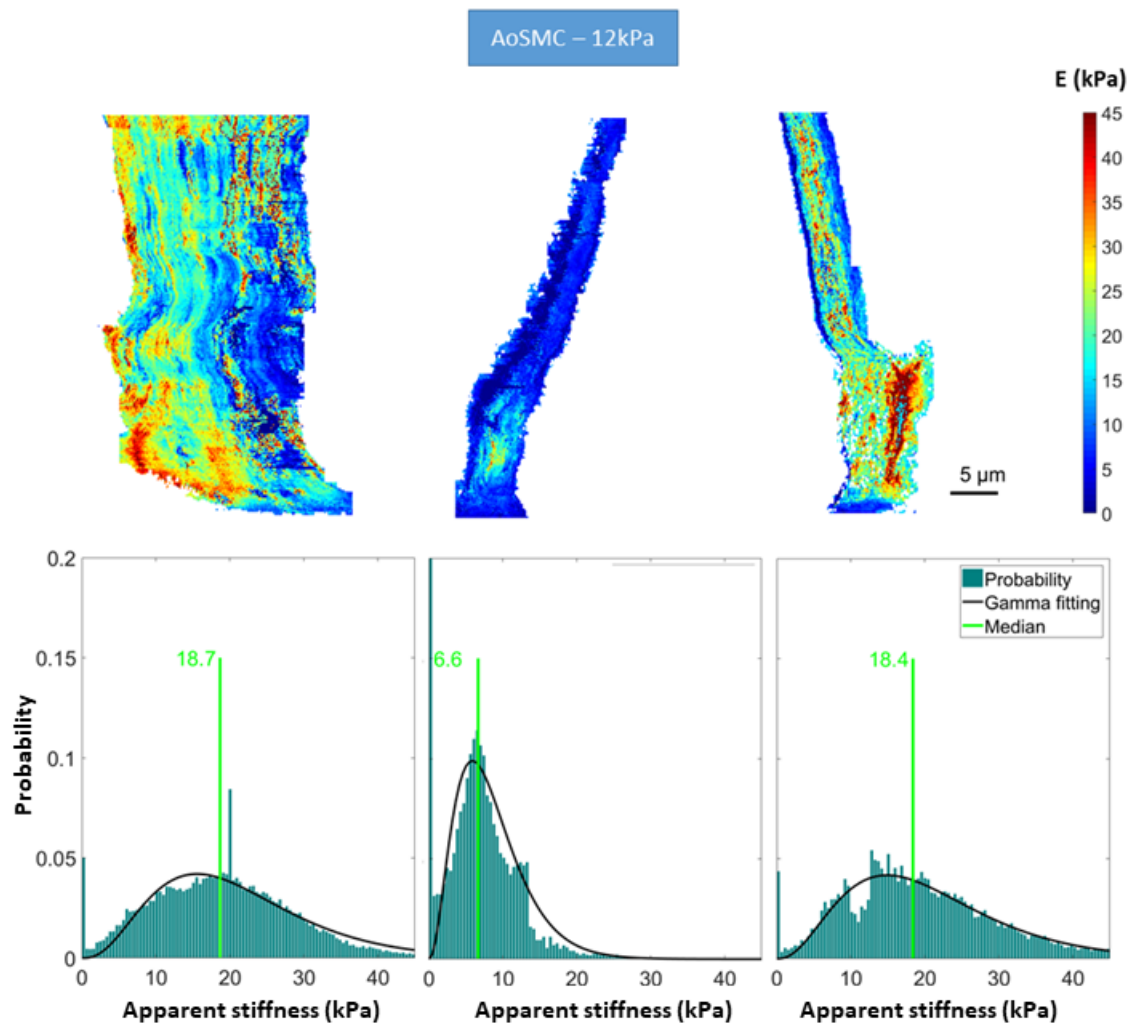


Figure S5.15: Apparent stiffness mapping (up) and corresponding distributions of the measured values (bottom) for AoSMCs on 12 kPa gels. The green vertical line represents the median, and the black curve the fitting of the data with a Gamma distribution.

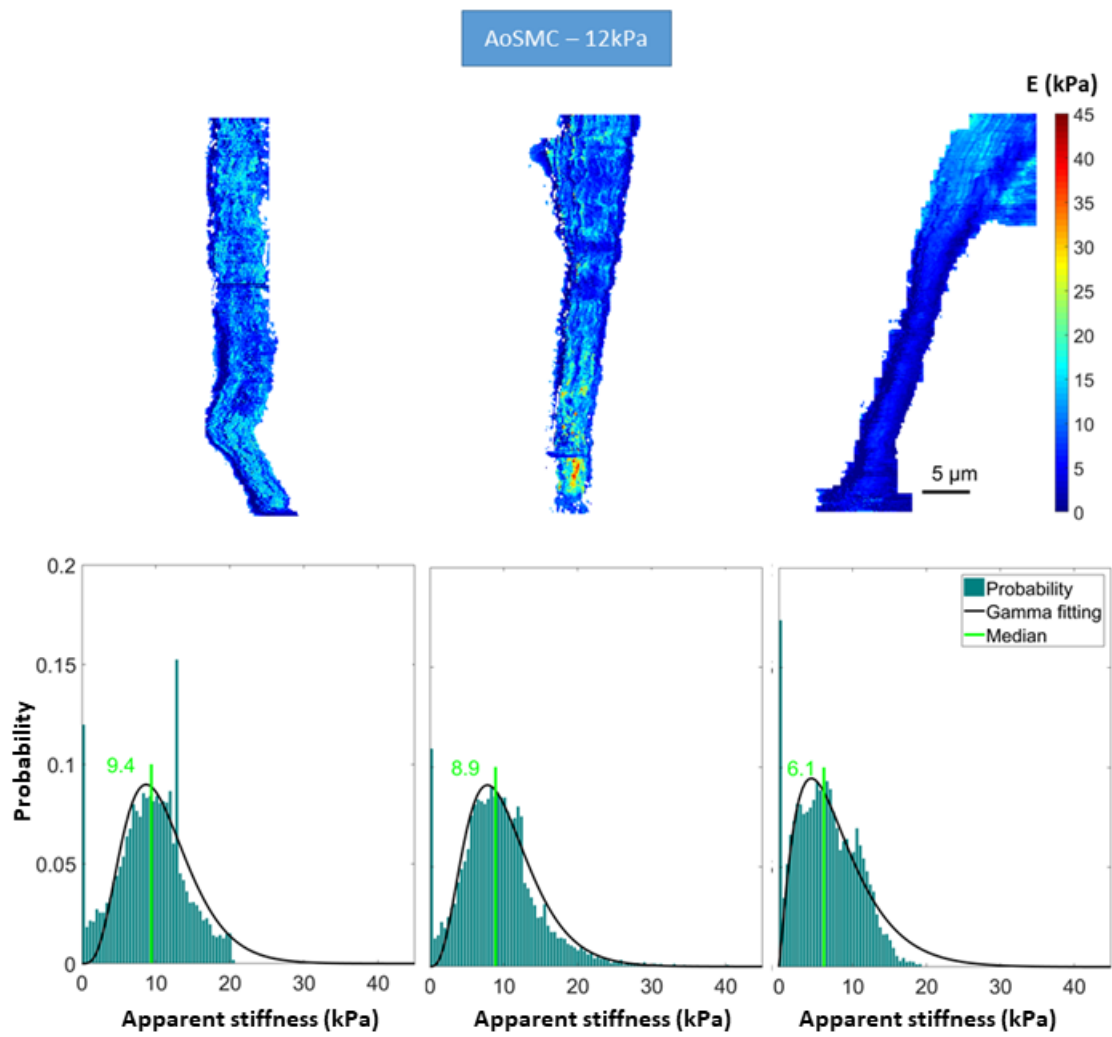


Figure S5.16: Apparent stiffness mapping (up) and corresponding distributions of the measured values (bottom) for AoSMCs on 12 kPa gels. The green vertical line represents the median, and the black curve the fitting of the data with a Gamma distribution.

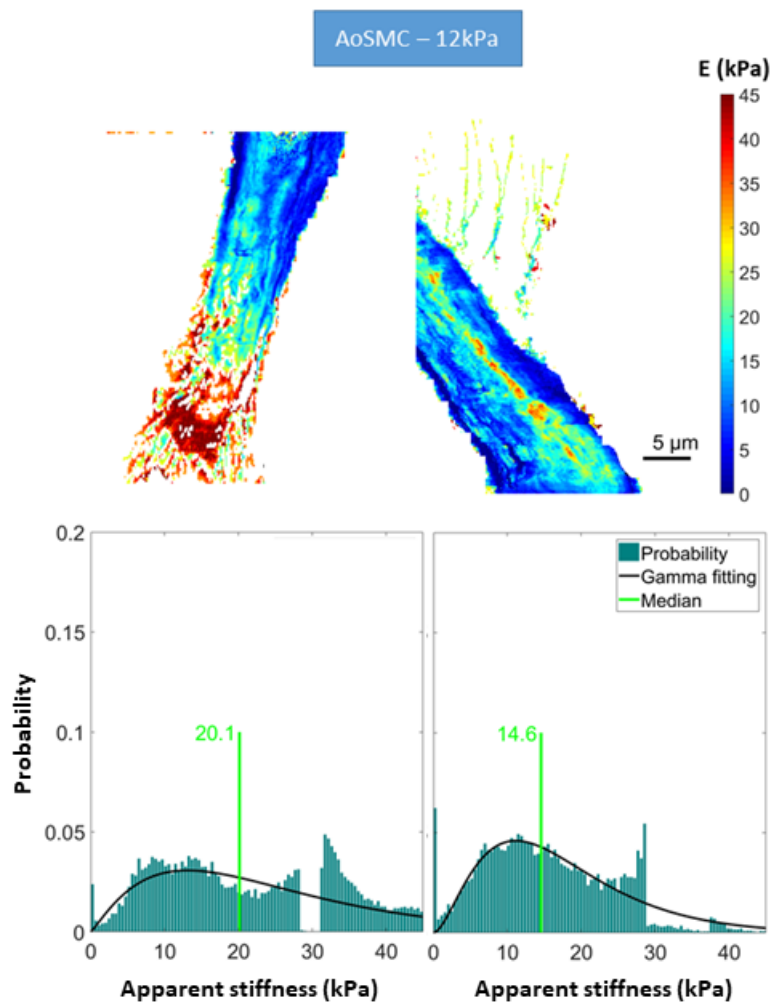


Figure S5.17: Apparent stiffness mapping (up) and corresponding distributions of the measured values (bottom) for AoSMCs on 12 kPa gels. The green vertical line represents the median, and the black curve the fitting of the data with a Gamma distribution.

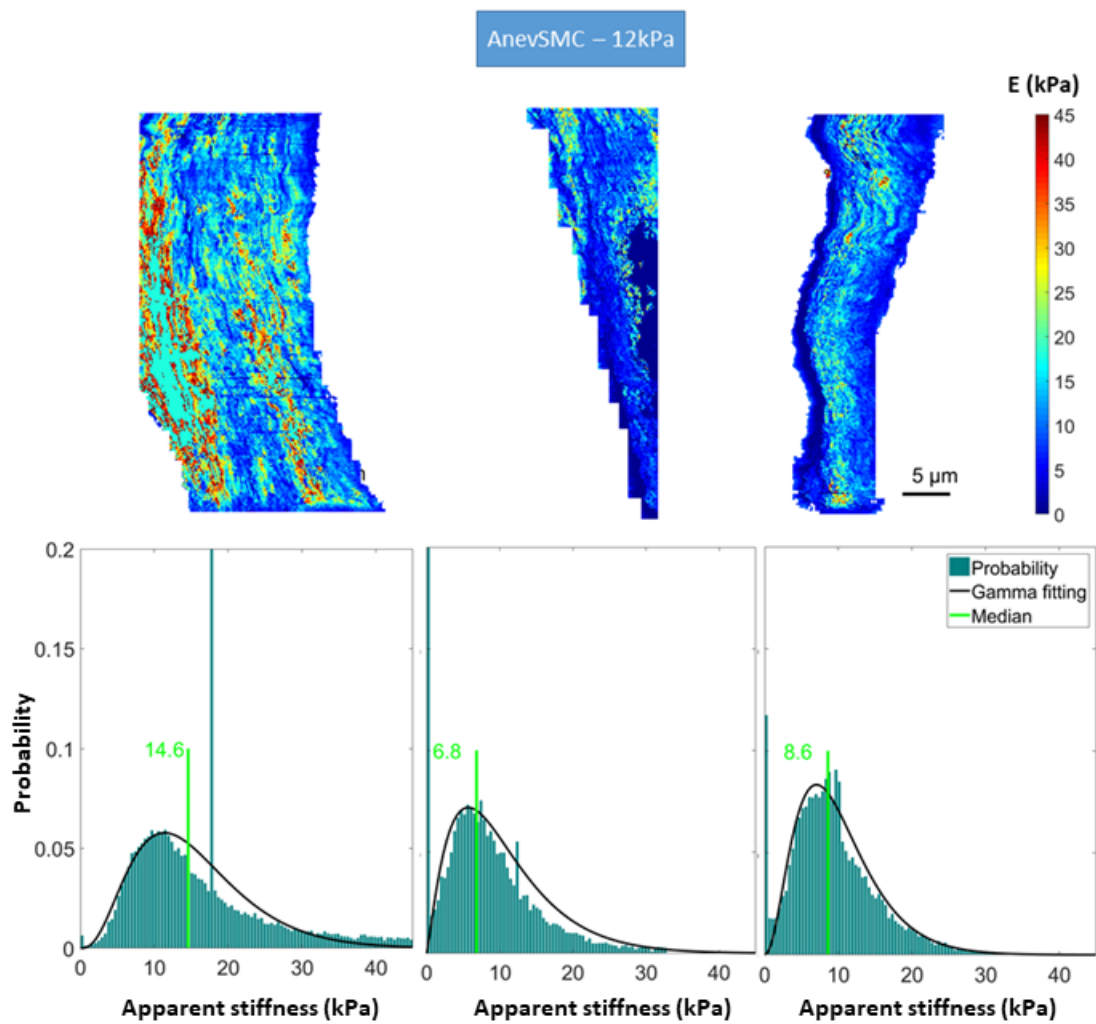


Figure S5.18: Apparent stiffness mapping (up) and corresponding distributions of the measured values (bottom) for AnevSMCs on 12 kPa gels. The green vertical line represents the median, and the black curve the fitting of the data with a Gamma distribution.

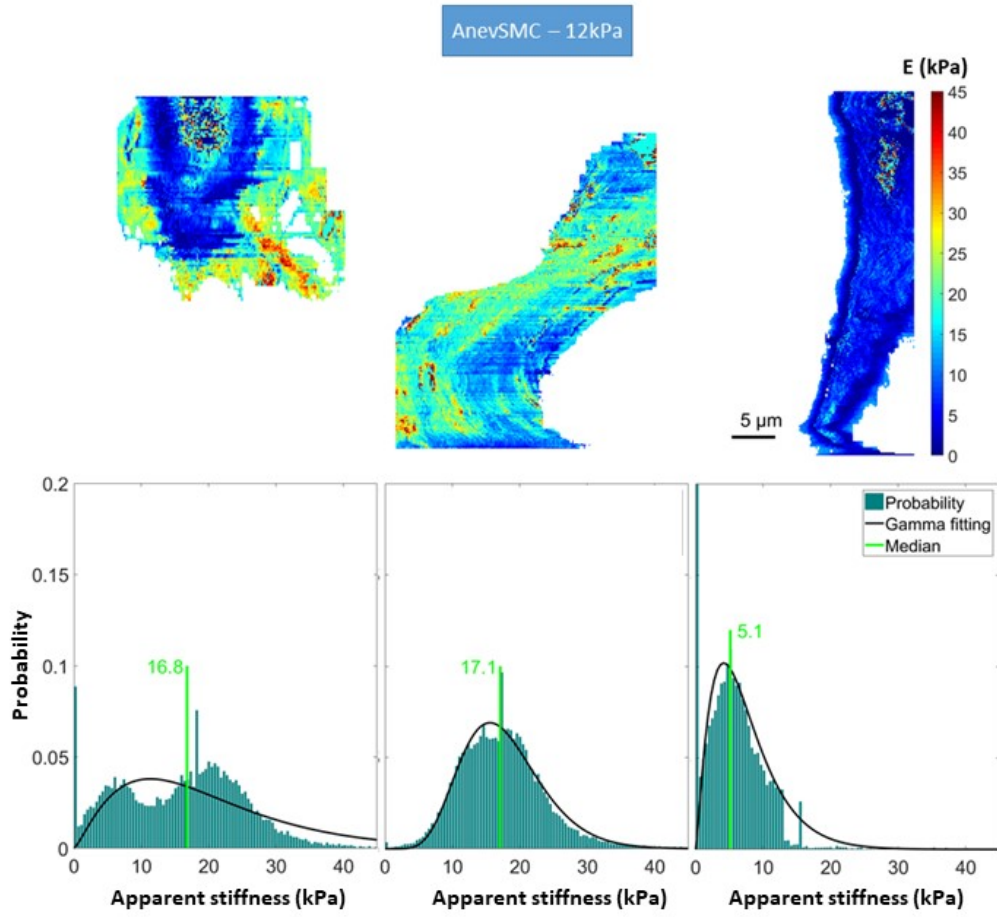


Figure S5.19: Apparent stiffness mapping (up) and corresponding distributions of the measured values (bottom) for AnevSMCs on 12 kPa gels. The green vertical line represents the median, and the black curve the fitting of the data with a Gamma distribution.

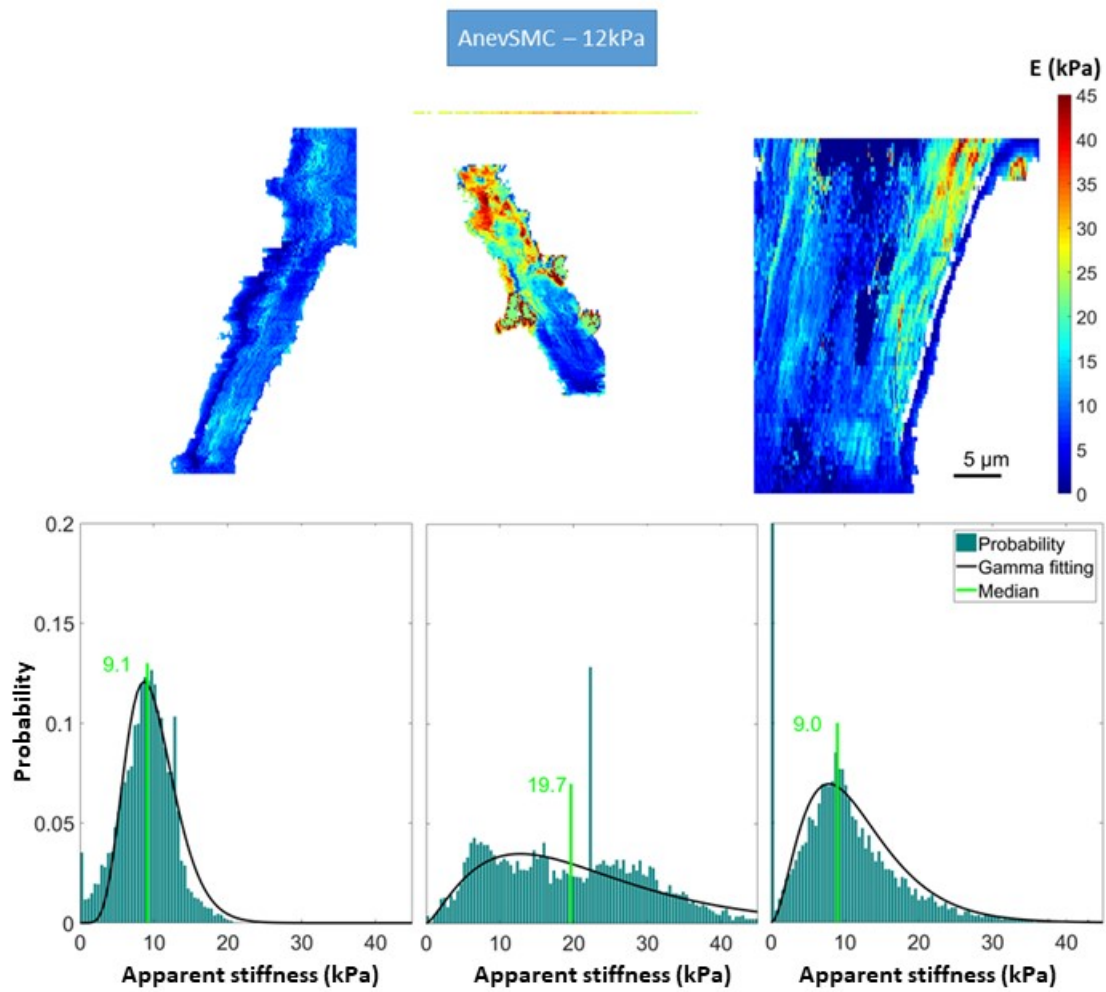


Figure S5.20: Apparent stiffness mapping (up) and corresponding distributions of the measured values (bottom) for AnevSMCs on 12 kPa gels. The green vertical line represents the median, and the black curve the fitting of the data with a Gamma distribution.

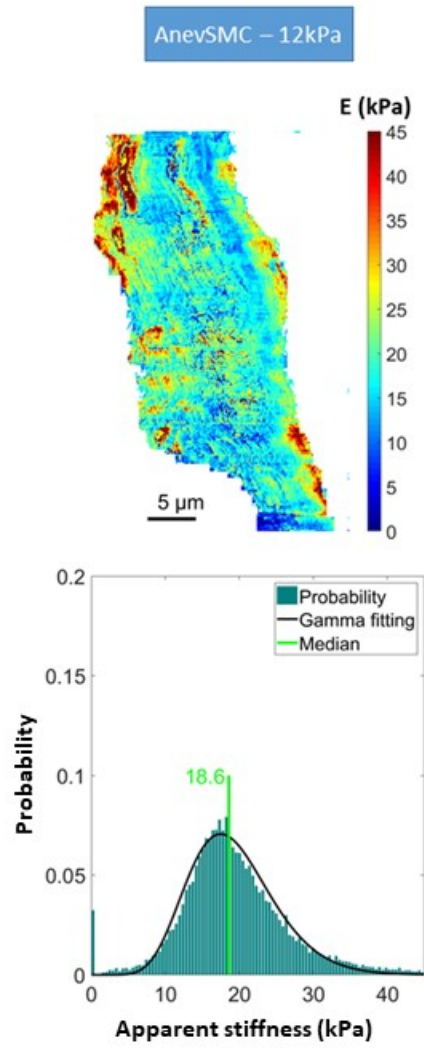


Figure S5.21: Apparent stiffness mapping (up) and corresponding distributions of the measured values (bottom) for AnevSMCs on 12 kPa gels. The green vertical line represents the median, and the black curve the fitting of the data with a Gamma distribution.

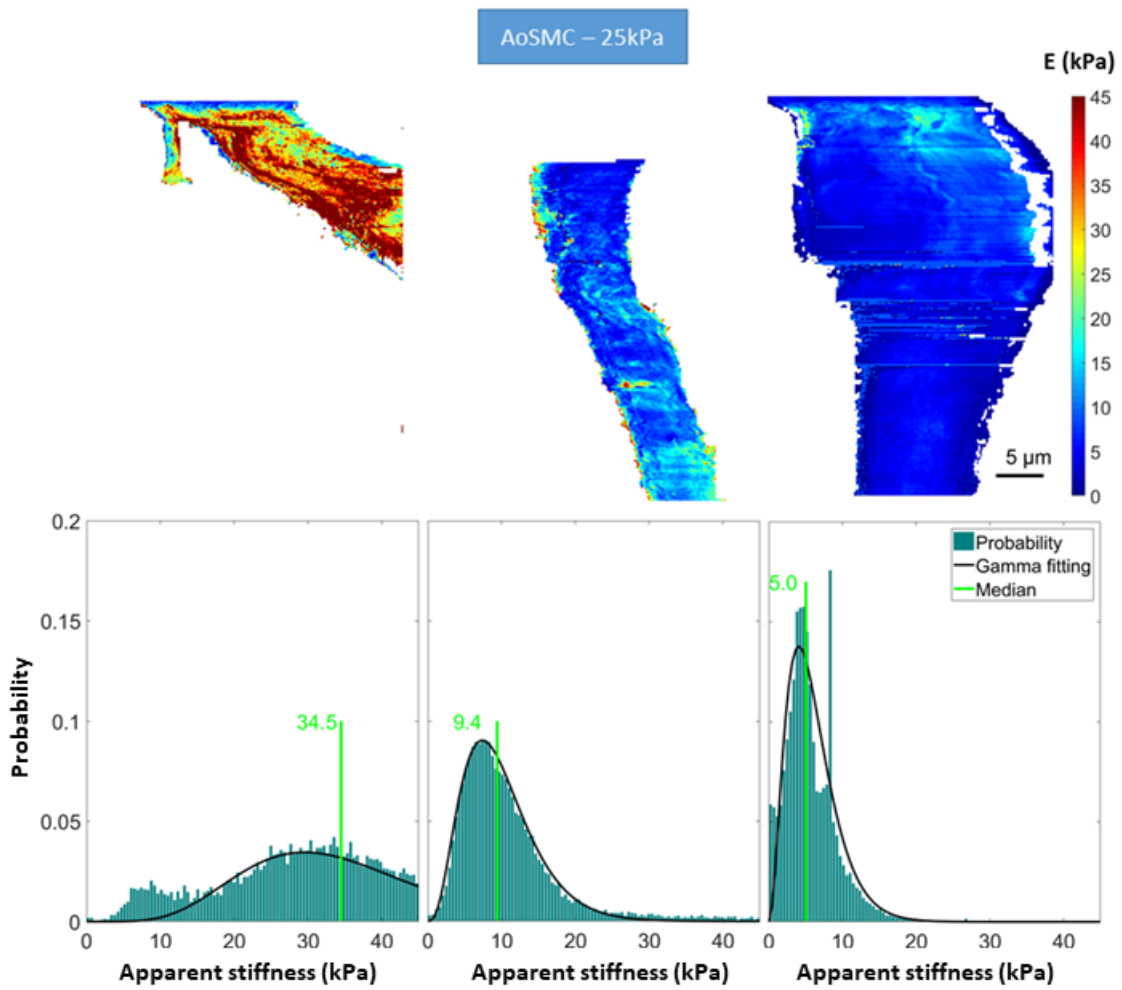


Figure S5.22: Apparent stiffness mapping (up) and corresponding distributions of the measured values (bottom) for AoSMCs on 25 kPa gels. The green vertical line represents the median, and the black curve the fitting of the data with a Gamma distribution.

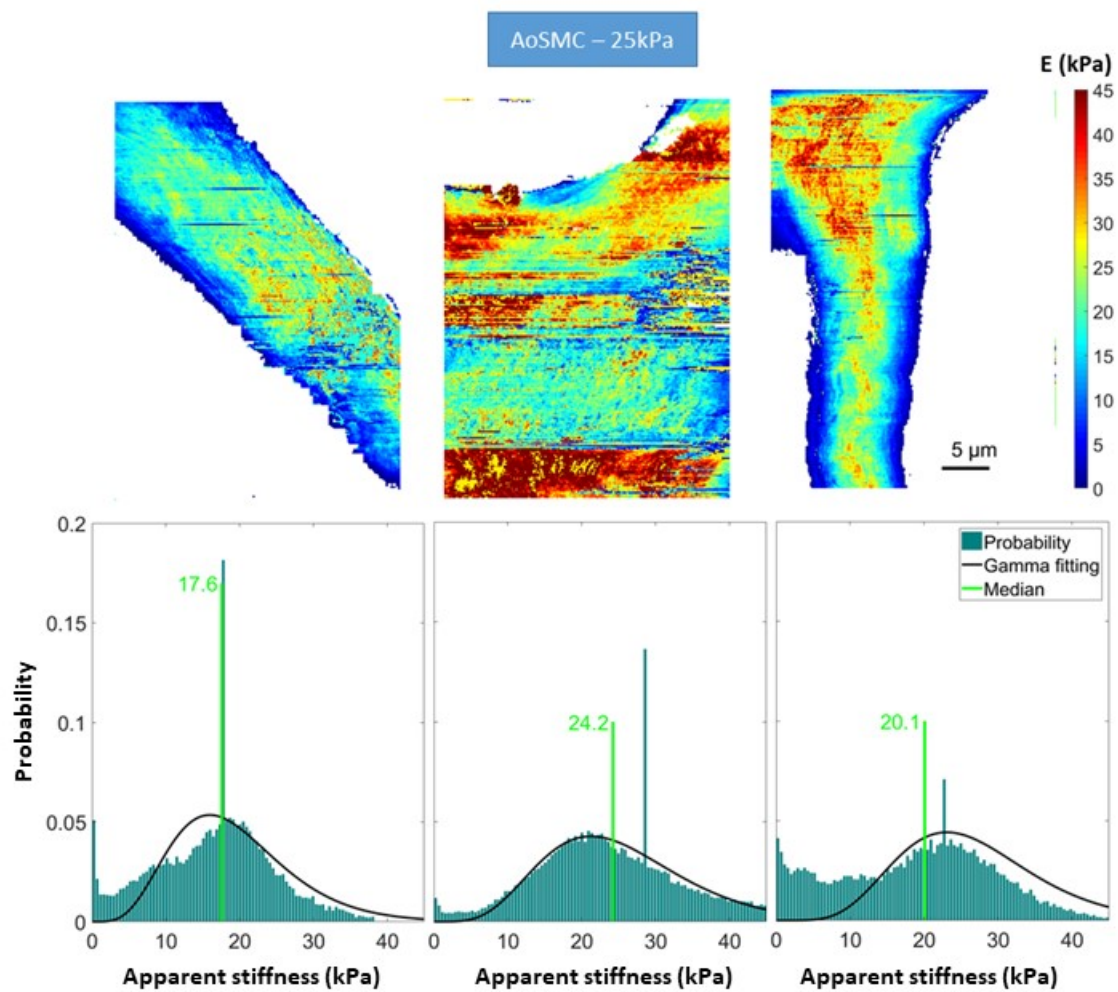


Figure S5.23: Apparent stiffness mapping (up) and corresponding distributions of the measured values (bottom) for AoSMCs on 25 kPa gels. The green vertical line represents the median, and the black curve the fitting of the data with a Gamma distribution.

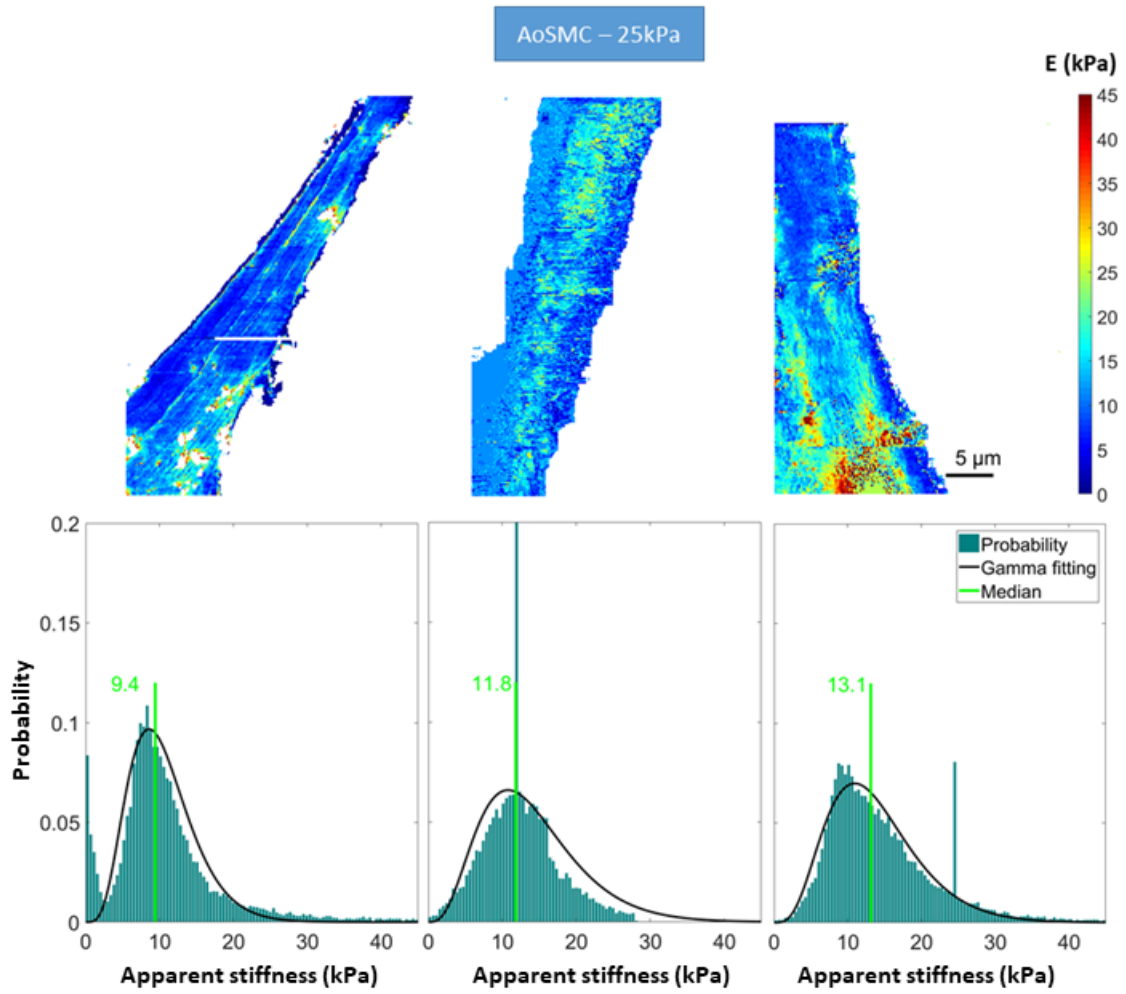


Figure S5.24: Apparent stiffness mapping (up) and corresponding distributions of the measured values (bottom) for AoSMCs on 25 kPa gels. The green vertical line represents the median, and the black curve the fitting of the data with a Gamma distribution.

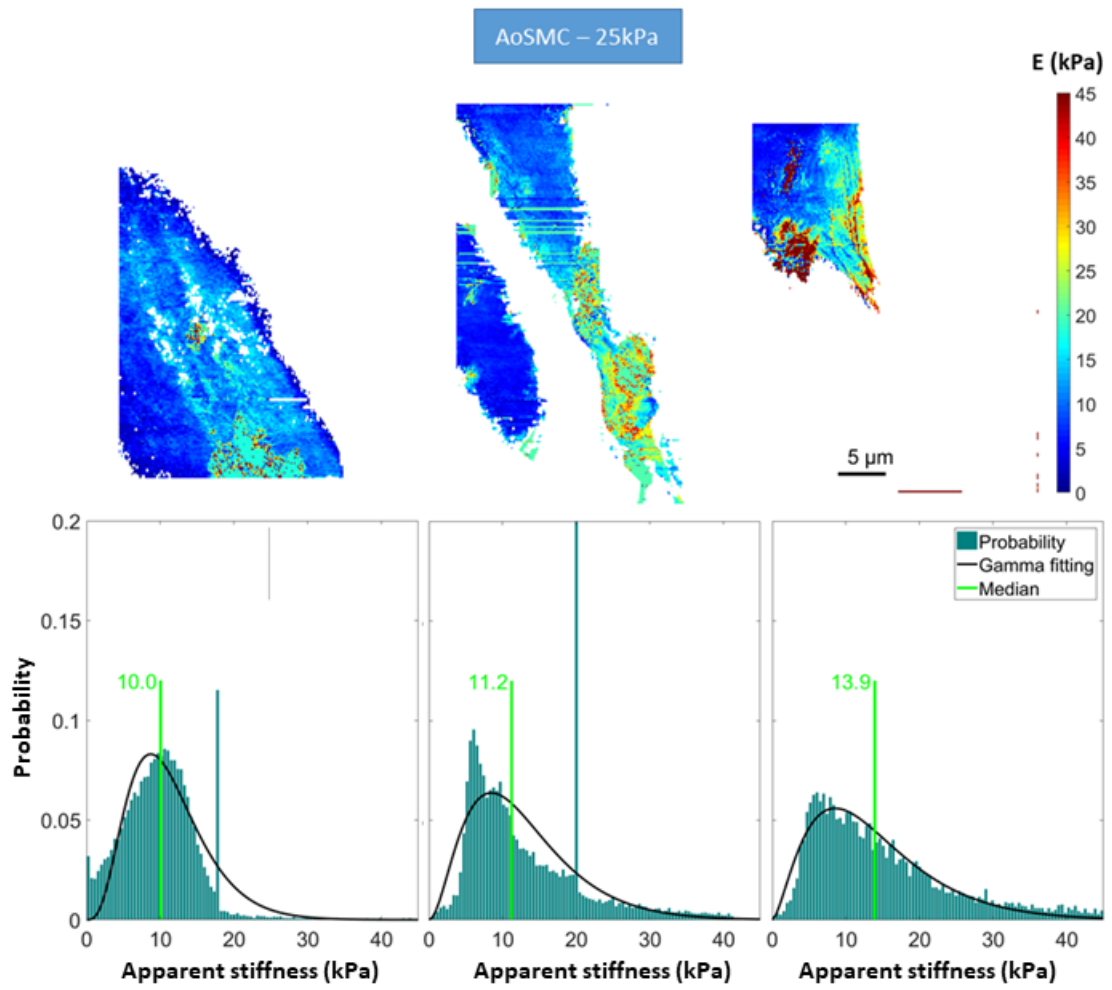


Figure S5.25: Apparent stiffness mapping (up) and corresponding distributions of the measured values (bottom) for AoSMCs on 25 kPa gels. The green vertical line represents the median, and the black curve the fitting of the data with a Gamma distribution.

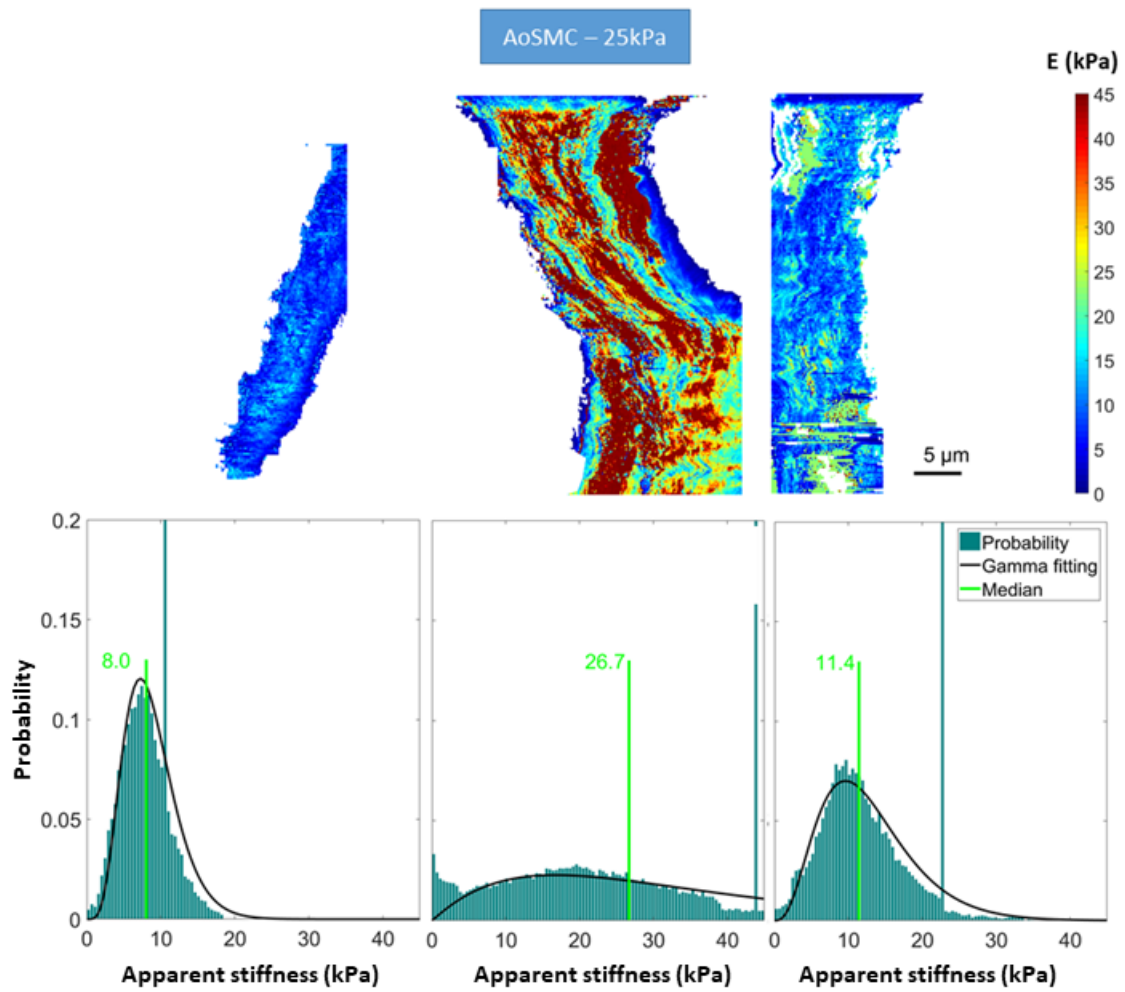


Figure S5.26: Apparent stiffness mapping (up) and corresponding distributions of the measured values (bottom) for AoSMCs on 25 kPa gels. The green vertical line represents the median, and the black curve the fitting of the data with a Gamma distribution.

C. Appendix S5.3. Full data about individual median values and fitting parameters

Table S5.1: Individual median values for cell apparent stiffness (kPa). For each group, we also indicated the number of elements N.

Median (kPa)	AoSMC/12kPa	AnevSMC/12kPa	AoSMC/25kPa
	16.5	14.6	34.5
	6.7	6.8	9.4
	7.9	8.6	5.0
	18.7	16.8	17.6
	6.6	17.1	24.2
	18.4	5.1	20.1
	9.4	9.1	9.4
	8.9	19.7	11.8
	6.1	9.0	13.1
	20.1	18.6	10.0
	14.6		11.2
			13.9
			8.0
			26.7
			11.4
N	11	10	15
Mean	12.2	12.5	15.1
Median	9.4	11.9	11.8

Table S5.2: Individual values for a-parameter of the Gamma fitting. For each group, we also indicated the number of elements N.

a-parameter	AoSMC/12kPa	AnevSMC/12kPa	AoSMC/25kPa
	3.5	3.9	7.7
	4.7	2.2	4.0
	4.2	3.3	3.1
	3.8	2.3	5.8
	3.3	8.4	6.3
	3.6	2.3	7.7
	5.0	8.1	5.5
	4.3	2.4	4.3
	2.2	3.0	4.8
	2.2	10.7	4.4
	2.8		3.0
			2.6
			5.9
			2.1
			4.0
N	11	10	15
Mean	3.6	4.7	4.7
Median	3.6	3.2	4.4

Table S5.3: Individual values for b-parameter of the Gamma fitting. For each group, we also indicated the number of elements N.

b-parameter	AoSMC/12kPa	AnevSMC/12kPa	AoSMC/25kPa
	5.7	4.0	4.4
	1.6	4.7	2.5
	2.3	3.0	1.9
	7.5	8.6	3.4
	2.6	2.1	4.0
	5.8	3.2	3.5
	2.2	1.2	1.9
	2.4	9.1	3.2
	3.6	3.9	2.9
	11.2	1.8	2.5
	6.2		4.3
			5.4
			1.5
			15.8
			3.2
N	11.0	10.0	15.0
Mean	4.6	4.2	4.0
Median	3.6	3.6	3.2

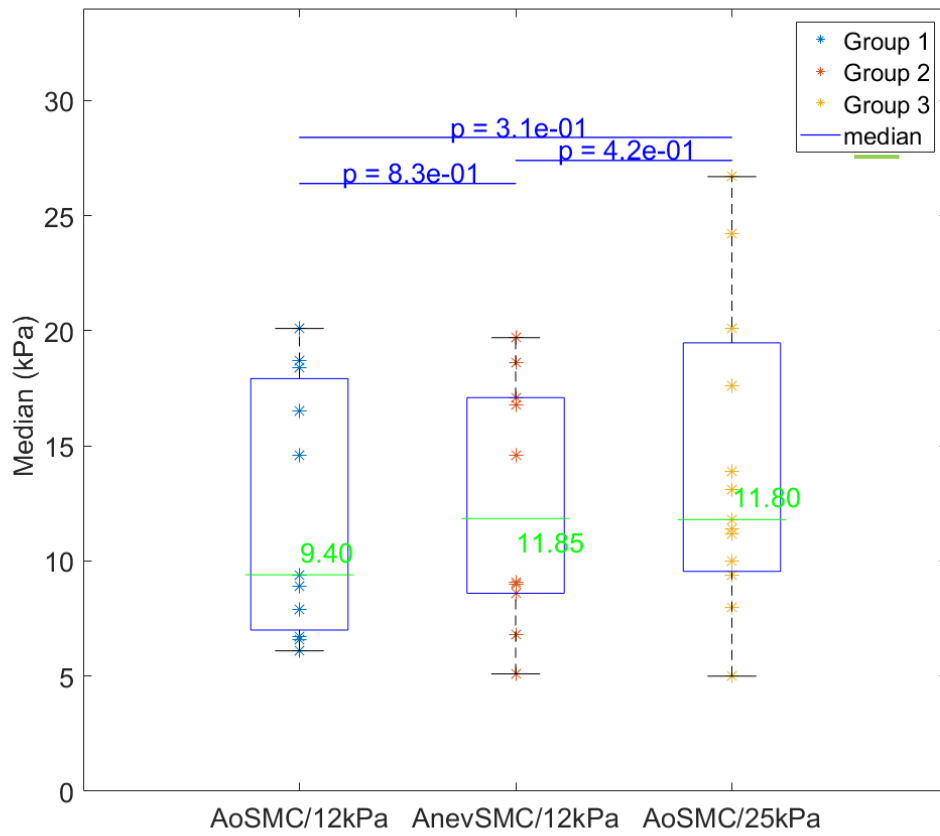


Figure S5.27: Boxplots showing the distribution of individual median values for each group. Significance between two populations was found using a Mann-Whitney test. Significance was stated there for $p < 5\%$. Median values are reported for a clearer comparison.

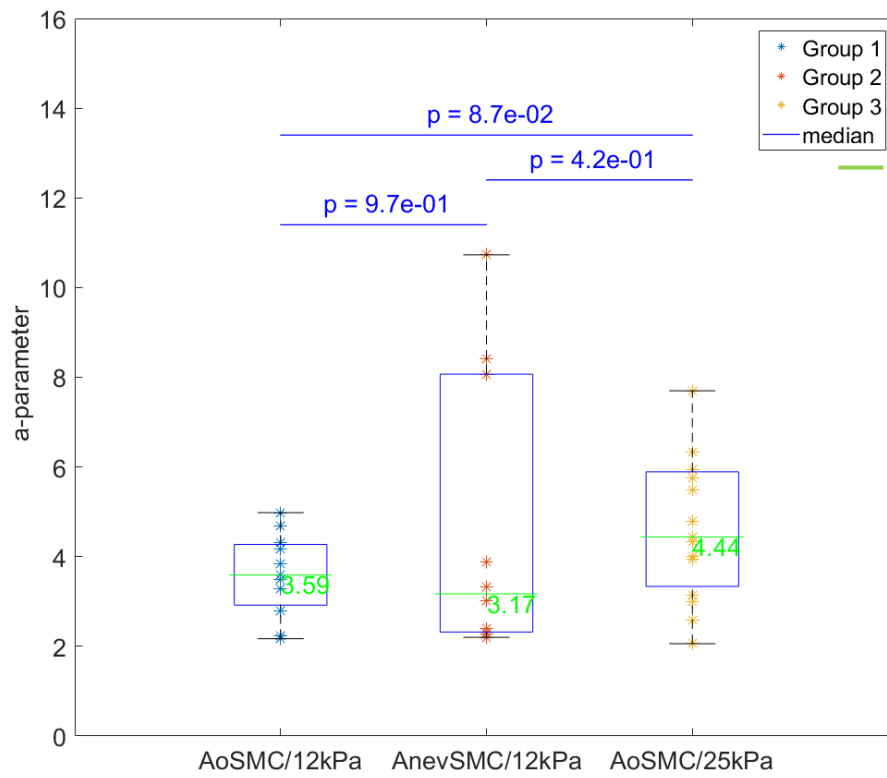


Figure S5.28: Boxplots showing the distribution of individual a -parameter values from Gamma fitting for each group. Significance between two populations was found using a Mann-Whitney test. Significance was stated there for $p < 5\%$. Median values are reported for a clearer comparison.

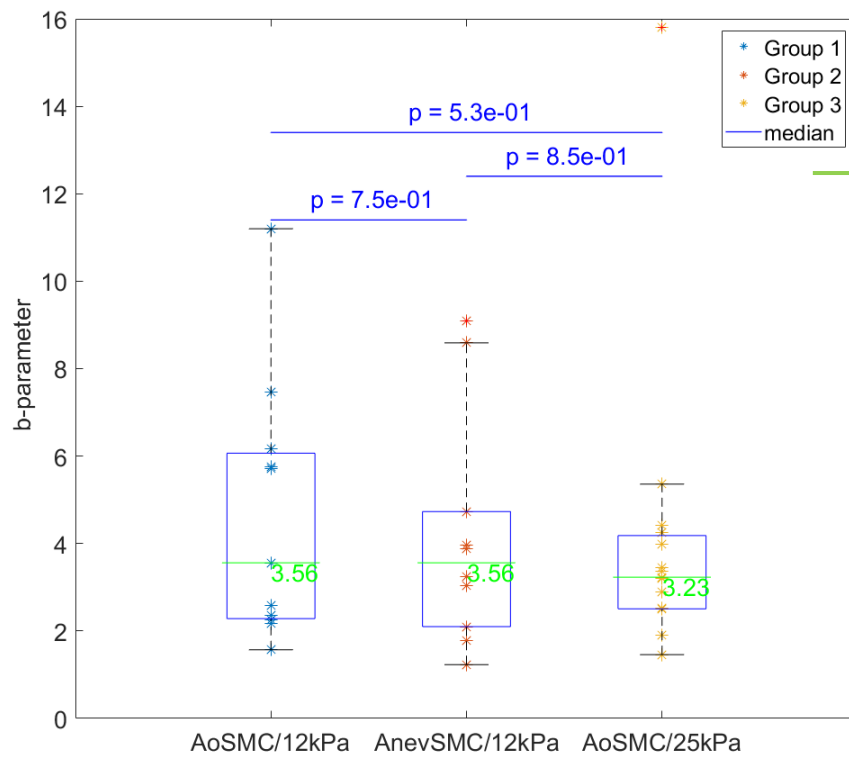


Figure S5.29: Boxplots showing the distribution of individual *b*-parameter values from Gamma fitting for each group. Significance between two populations was found using a Mann-Whitney test. Significance was stated there for $p < 5\%$. Median values are reported for a clearer comparison.

RÉFÉRENCES

- Ahmed, W.W., Fodor, É., Betz, T., 2015. Active cell mechanics: Measurement and theory. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Mechanobiology* 1853, 3083–3094. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.05.022>
- Akgul, Y., Mahendroo, M., 2014. 33 - Cervical Changes Accompanying Birth, in: Croy, B.A., Yamada, A.T., DeMayo, F.J., Adamson, S.L. (Eds.), *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. Academic Press, Boston, pp. 391–401. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394445-0.00033-3>
- An, S.S., Laudadio, R.E., Lai, J., Rogers, R.A., Fredberg, J.J., 2002. Stiffness changes in cultured airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 283, C792–801. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00425.2001>
- Anderson, S., DiCesare, L., Tan, I., Leung, T., SundarRaj, N., 2004. Rho-mediated assembly of stress fibers is differentially regulated in corneal fibroblasts and myofibroblasts. *Experimental Cell Research* 298, 574–583. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.05.005>
- Andrews, K., Mcguire, J., Triggler, C., 2003. A photosensitive vascular smooth muscle store of nitric oxide in mouse aorta: No dependence on expression of endothelial nitric oxide synthase. *British journal of pharmacology* 138, 932–40. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705115>
- Arribas, S.M., Hinek, A., González, M.C., 2006. Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacology & Therapeutics* 111, 771–791. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.12.003>
- Athamneh, A.I.M., Suter, D.M., 2015. Quantifying mechanical force in axonal growth and guidance. *Front. Cell. Neurosci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00359>
- Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Rivelino, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L., Geiger, B., 2001. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nature Cell Biology* 3, 466–472. <https://doi.org/10.1038/35074532>
- Balas, D., Philip, P., 2002. Tissus musculaires [WWW Document]. *Cours d’histologie générale*. URL <http://www.db-gersite.com/HISTOLOGIE/HISTGENE/histgen1/histgen6/histgen6.htm> (accessed 10.24.17).
- Balasubramanian, L., Lo, C.-M., Sham, J.S.K., Yip, K.-P., 2013. Remanent cell traction force in renal vascular smooth muscle cells induced by integrin-mediated mechanotransduction. *Am J Physiol Cell Physiol* 304, C382–C391. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00234.2012>
- Bangasser, B.L., Odde, D.J., 2013. Master equation-based analysis of a motor-clutch model for cell traction force. *Cell Mol Bioeng* 6, 449–459. <https://doi.org/10.1007/s12195-013-0296-5>
- Bangasser, B.L., Rosenfeld, S.S., Odde, D.J., 2013. Determinants of Maximal Force Transmission in a Motor-Clutch Model of Cell Traction in a Compliant Microenvironment. *Biophysical Journal* 105, 581–592. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.06.027>
- Bao, G., Suresh, S., 2003. Cell and molecular mechanics of biological materials. *Nature Materials* 2, 715–725. <https://doi.org/10.1038/nmat1001>
- Barker, A.J., Markl, M., Bürk, J., Lorenz, R., Bock, J., Simon Bauer, Schulz-Menger, J., von Knobelsdorff-Brenkenhoff, F., 2012. Bicuspid aortic valve is associated with altered wall shear stress in the ascending aorta. *Circ Cardiovasc Imaging* 5, 457–466. <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.112.973370>
- Belikov, A.V., 2017. The number of key carcinogenic events can be predicted from cancer incidence. *Sci Rep* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12448-7>
- Bell, G.I., 1978. Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science* 200, 618–627. <https://doi.org/10.1126/science.347575>

- Bellini, C., Ferruzzi, J., Roccabianca, S., Di Martino, E.S., Humphrey, J.D., 2014. A microstructurally motivated model of arterial wall mechanics with mechanobiological implications. *Ann Biomed Eng* 42, 488–502. <https://doi.org/10.1007/s10439-013-0928-x>
- Bentzon Jacob Fog, Otsuka Fumiyuki, Virmani Renu, Falk Erling, 2014. Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. *Circulation Research* 114, 1852–1866. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302721>
- Berridge, M.J., 2008. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol* 586, 5047–5061. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.160440>
- Berridge, M.J., Galione, A., 1988. Cytosolic calcium oscillators. *FASEB J* 2, 3074–3082.
- Bersi, M.R., Bellini, C., Di Achille, P., Humphrey, J.D., Genovese, K., Avril, S., 2016. Novel Methodology for Characterizing Regional Variations in the Material Properties of Murine Aortas. *J Biomech Eng* 138. <https://doi.org/10.1115/1.4033674>
- Blaber, J., Adair, B., Antoniou, A., 2015. Ncorr: Open-Source 2D Digital Image Correlation Matlab Software. *Exp Mech* 55, 1105–1122. <https://doi.org/10.1007/s11340-015-0009-1>
- Bogunovic, N., Meekel, J.P., Micha, D., Blankensteijn, J.D., Hordijk, P.L., Yeung, K.K., 2019. Impaired smooth muscle cell contractility as a novel concept of abdominal aortic aneurysm pathophysiology. *Scientific Reports* 9, 6837. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43322-3>
- Bown, M.J., Sutton, A.J., Bell, P.R.F., Sayers, R.D., 2002. A meta-analysis of 50 years of ruptured abdominal aortic aneurysm repair. *Br J Surg* 89, 714–730. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2168.2002.02122.x>
- Braunsmann, C., Seifert, J., Rheinlaender, J., Schäffer, T.E., 2014. High-speed force mapping on living cells with a small cantilever atomic force microscope. *Review of Scientific Instruments* 85, 073703. <https://doi.org/10.1063/1.4885464>
- Brown, X.Q., Bartolak-Suki, E., Williams, C., Walker, M.L., Weaver, V.M., Wong, J.Y., 2010. Effect of substrate stiffness and PDGF on the behavior of vascular smooth muscle cells: implications for atherosclerosis. *J Cell Physiol* 225, 115–122. <https://doi.org/10.1002/jcp.22202>
- Brownstein, A.J., Ziganshin, B.A., Kuivaniemi, H., Body, S.C., Bale, A.E., Elefteriades, J.A., 2017. Genes Associated with Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection: An Update and Clinical Implications. *Aorta (Stamford)* 5, 11–20. <https://doi.org/10.12945/j.aorta.2017.17.003>
- Brozovich, F.V., Nicholson, C.J., Degen, C.V., Gao, Y.Z., Aggarwal, M., Morgan, K.G., 2016. Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders. *Pharmacol Rev* 68, 476–532. <https://doi.org/10.1124/pr.115.010652>
- Brunon, A., Bruyère-Garnier, K., Coret, M., 2011. Characterization of the nonlinear behaviour and the failure of human liver capsule through inflation tests. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, Special Issue Soft Tissues* 4, 1572–1581. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2010.12.016>
- Cabrera Fischer, E.I., 2019. Structural basis of the circulatory system. *Biomechanical Modeling of the Cardiovascular System*, 2053-2563. <https://doi.org/10.1088/2053-2563/aafb0dch1>
- Caire, R., Audoux, E., Courbon, G., Chafchafi, M., Michaud, E., Petit, C., Thomas, M., Vanden-Bossche, A., Navarro, L., Linossier, M.-T., Peyroche, S., Guignandon, A., Vico, L., Paul, S., Marotte, H., Submitted. YAP is a key actor in inflammatory responses. *Immunity*.
- Calzado-Martín, A., Encinar, M., Tamayo, J., Calleja, M., San Paulo, A., 2016. Effect of Actin Organization on the Stiffness of Living Breast Cancer Cells Revealed by Peak-Force Modulation Atomic Force Microscopy. *ACS Nano* 10, 3365–3374. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b07162>
- Cardamone, L., Valentín, A., Eberth, J.F., Humphrey, J.D., 2009. Origin of axial prestretch and residual stress in arteries. *Biomech Model Mechanobiol* 8, 431–446. <https://doi.org/10.1007/s10237-008-0146-x>
- Cartagena-Rivera, A.X., Wang, W.-H., Geahlen, R.L., Raman, A., 2015. Fast, multi-frequency, and quantitative nanomechanical mapping of live cells using the atomic force microscope. *Scientific Reports* 5, 11692. <https://doi.org/10.1038/srep11692>

- Cavinato, C., Badel, P., Krasny, W., Avril, S., Morin, C., 2020. Experimental Characterization of Adventitial Collagen Fiber Kinematics Using Second-Harmonic Generation Imaging Microscopy: Similarities and Differences Across Arteries, Species and Testing Conditions, in: Zhang, Y. (Ed.), *Multi-Scale Extracellular Matrix Mechanics and Mechanobiology*, Studies in Mechanobiology, Tissue Engineering and Biomaterials. Springer International Publishing, Cham, pp. 123–164. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20182-1_5
- Cavinato, C., Helfenstein-Didier, C., Olivier, T., du Roscoat, S.R., Laroche, N., Badel, P., 2017. Biaxial loading of arterial tissues with 3D in situ observations of adventitia fibrous microstructure: A method coupling multi-photon confocal microscopy and bulge inflation test. *J Mech Behav Biomed Mater* 74, 488–498. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.07.022>
- Challande, P., Briet, M., Bézie, Y., Boutouyrie, P., 2007. Méthodes d'exploration fonctionnelle des gros troncs artériels, in: *Biologie et Pathologie Du Coeur et Des Vaisseaux*. John Libbery Eurotext, Paris, pp. 427–33.
- Chalut, K.J., Paluch, E.K., 2016. The Actin Cortex: A Bridge between Cell Shape and Function. *Developmental Cell* 38, 571–573. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.09.011>
- Chan, C.E., Odde, D.J., 2008. Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. *Science* 322, 1687–1691. <https://doi.org/10.1126/science.1163595>
- Chen, H., Luo, T., Zhao, X., Lu, X., Huo, Y., Kassab, G.S., 2013. Microstructural constitutive model of active coronary media. *Biomaterials* 34, 7575–7583. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.06.035>
- Chen, J., Li, H., SundarRaj, N., Wang, J.H.-C., 2007. Alpha-smooth muscle actin expression enhances cell traction force. *Cell Motil. Cytoskeleton* 64, 248–257. <https://doi.org/10.1002/cm.20178>
- Chen, Z., Xu, Y., Bujalowski, P., Oberhauser, A.F., Boor, P.J., 2015. N-(2-Aminoethyl) Ethanolamine-Induced Morphological, Biochemical, and Biophysical Alterations in Vascular Matrix Associated With Dissecting Aortic Aneurysm. *Toxicological Sciences* 148, 421–432. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv194>
- Choudhury, N., Bouchot, O., Rouleau, L., Tremblay, D., Cartier, R., Butany, J., Mongrain, R., Leask, R.L., 2009. Local mechanical and structural properties of healthy and diseased human ascending aorta tissue. *Cardiovascular Pathology* 18, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2008.01.001>
- Clark, J.M., Glagov, S., 1985. Transmural organization of the arterial media. The lamellar unit revisited. *Arteriosclerosis* 5, 19–34.
- Cox, T.R., Eler, J.T., 2011. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech* 4, 165–178. <https://doi.org/10.1242/dmm.004077>
- Croeze, A., Pittman, L., Reynolds, W., 2012. *Nonlinear Least-Squares Problems with the Gauss-Newton and Levenberg-Marquardt Methods*.
- Crosas-Molist, E., Meirelles, T., López-Luque, J., Serra-Peinado, C., Selva, J., Caja, L., Gorbenko del Blanco, D., Uriarte, J.J., Bertran, E., Mendizábal, Y., Hernández, V., García-Calero, C., Busnadiago, O., Condom, E., Toral, D., Castellà, M., Forteza, A., Navajas, D., Sarri, E., Rodríguez-Pascual, F., Dietz, H.C., Fabregat, I., Egea, G., 2015. Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Changes in Patients With Marfan SyndromeSignificance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 35, 960–972. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304412>
- Dartsch, P.C., Hämmerle, H., 1986. Orientation response of arterial smooth muscle cells to mechanical stimulation. *Eur J Cell Biol* 41, 339–346.
- David Odde Laboratory [WWW Document], 2017. . University of Minnesota. URL <http://oddelab.umn.edu/software.html> (accessed 9.12.19).
- Davis, E.C., 1993. Smooth muscle cell to elastic lamina connections in developing mouse aorta. Role in aortic medial organization. *Lab. Invest.* 68, 89–99.

- Davis, M.J., Donovitz, J.A., Hood, J.D., 1992. Stretch-activated single-channel and whole cell currents in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 262, C1083–C1088.
- De Moudt, S., Leloup, A., Van Hove, C., De Meyer, G., Fransen, P., 2017. Isometric Stretch Alters Vascular Reactivity of Mouse Aortic Segments. *Front. Physiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00157>
- Didelot, M., 2018. Activités pro-coagulantes et pro-oxydantes des cellules musculaires lisses issues d'anévrismes aortique : implication des récepteurs PARs.
- Dillon, P.F., Aksoy, M.O., Driska, S.P., Murphy, R.A., 1981. Myosin phosphorylation and the cross-bridge cycle in arterial smooth muscle. *Science* 211, 495–497.
- Dingemans, K.P., Teeling, P., Lagendijk, J.H., Becker, A.E., 2000. Extracellular matrix of the human aortic media: an ultrastructural histochemical and immunohistochemical study of the adult aortic media. *Anat. Rec.* 258, 1–14.
- Dorrington, K.L., McCrum, N.G., 1977. Elastin as a rubber. *Biopolymers* 16, 1201–1222. <https://doi.org/10.1002/bip.1977.360160604>
- Dua, M.M., Dalman, R.L., 2010. Hemodynamic Influences on Abdominal Aortic Aneurysm Disease: Application of Biomechanics to Aneurysm Pathophysiology. *Vascul Pharmacol* 53, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2010.03.004>
- Duprey, A., Trabelsi, O., Vola, M., Favre, J.-P., Avril, S., 2016. Biaxial rupture properties of ascending thoracic aortic aneurysms. *Acta Biomaterialia* 42, 273–285. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.06.028>
- Farzaneh, S., Trabelsi, O., Chavent, B., Avril, S., 2019. Identifying Local Arterial Stiffness to Assess the Risk of Rupture of Ascending Thoracic Aortic Aneurysms. *Ann Biomed Eng* 47, 1038–1050. <https://doi.org/10.1007/s10439-019-02204-5>
- Fay, F.S., Delise, C.M., 1973. Contraction of Isolated Smooth-Muscle Cells—Structural Changes. *PNAS* 70, 641–645. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.3.641>
- Fillinger, M., 2007. Who should we operate on and how do we decide: predicting rupture and survival in patients with aortic aneurysm. *Semin Vasc Surg* 20, 121–127. <https://doi.org/10.1053/j.semvascsurg.2007.04.001>
- Fillinger, M.F., Raghavan, M.L., Marra, S.P., Cronenwett, J.L., Kennedy, F.E., 2002. In vivo analysis of mechanical wall stress and abdominal aortic aneurysm rupture risk. *Journal of Vascular Surgery* 36, 589–597. <https://doi.org/10.1067/mva.2002.125478>
- Finet, G., Tabib, A., 1999. L'athérosclérose, in: *Cardiologie*. Presses universitaires de Lyon, Lyon, pp. 491–9.
- Fujiwara, T., Uehara, Y., 1992. The cytoarchitecture of the medial layer in rat thoracic aorta: a scanning electron-microscopic study. *Cell Tissue Res.* 270, 165–172.
- Gaballa, M.A., Jacob, C.T., Raya, T.E., Liu, J., Simon, B., Goldman, S., 1998. Large artery remodeling during aging: biaxial passive and active stiffness. *Hypertension* 32, 437–443.
- Gasser, T. C., 2017. Structure and basic properties of the arterial wall.
- Gavara, N., 2017. A beginner's guide to atomic force microscopy probing for cell mechanics. *Microsc Res Tech* 80, 75–84. <https://doi.org/10.1002/jemt.22776>
- Gerthoffer, W.T., 2005. Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle contraction. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 83, 851–856. <https://doi.org/10.1139/y05-088>
- Gillis, E., Laer, L.V., Loeys, B.L., 2013. Genetics of Thoracic Aortic Aneurysm: At the Crossroad of Transforming Growth Factor- β Signaling and Vascular Smooth Muscle Cell Contractility. *Circulation Research* 113, 327–340. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300675>
- Goffin, J.M., Pittet, P., Csucs, G., Lussi, J.W., Meister, J.-J., Hinz, B., 2006a. Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of α -smooth muscle actin to stress fibers. *J Cell Biol* 172, 259–268. <https://doi.org/10.1083/jcb.200506179>
- Goffin, J.M., Pittet, P., Csucs, G., Lussi, J.W., Meister, J.-J., Hinz, B., 2006b. Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of α -smooth muscle actin to stress fibers. *J Cell Biol* 172, 259–268. <https://doi.org/10.1083/jcb.200506179>

- Goldfinger, J.Z., Halperin, J.L., Marin, M.L., Stewart, A.S., Eagle, K.A., Fuster, V., 2014. Thoracic aortic aneurysm and dissection. *J. Am. Coll. Cardiol.* 64, 1725–1739. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.08.025>
- Gomer, C.J., Rucker, N., Murphree, A.L., 1988. Differential cell photosensitivity following porphyrin photodynamic therapy. *Cancer Res.* 48, 4539–4542.
- Gomez, D., Swiatlowska, P., Owens, G.K., 2015. Epigenetic Control of Smooth Muscle Cell Identity and Lineage Memory. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35, 2508–2516. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.305044>
- Gunst, S.J., Fredberg, J.J., 2003. The first three minutes: smooth muscle contraction, cytoskeletal events, and soft glasses. *Journal of Applied Physiology* 95, 413–425. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00277.2003>
- Guo, D.-C., Pannu, H., Tran-Fadulu, V., Papke, C.L., Yu, R.K., Avidan, N., Bourgeois, S., Estrera, A.L., Safi, H.J., Sparks, E., Amor, D., Ades, L., McConnell, V., Willoughby, C.E., Abuelo, D., Willing, M., Lewis, R.A., Kim, D.H., Scherer, S., Tung, P.P., Ahn, C., Buja, L.M., Raman, C.S., Shete, S.S., Milewicz, D.M., 2007. Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections. *Nat. Genet.* 39, 1488–1493. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.6>
- Guzzardi, D.G., Barker, A.J., van Ooij, P., Malaisrie, S.C., Puthumana, J.J., Belke, D.D., Mewhort, H.E.M., Svystonyuk, D.A., Kang, S., Verma, S., Collins, J., Carr, J., Bonow, R.O., Markl, M., Thomas, J.D., McCarthy, P.M., Fedak, P.W.M., 2015. Valve-Related Hemodynamics Mediate Human Bicuspid Aortopathy: Insights From Wall Shear Stress Mapping. *J Am Coll Cardiol* 66, 892–900. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.06.1310>
- Haase, K., Pelling, A.E., 2015. Investigating cell mechanics with atomic force microscopy. *J. R. Soc. Interface.* 12, 20140970. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0970>
- Hagan, P.G., Nienaber, C.A., Isselbacher, E.M., Bruckman, D., Karavite, D.J., Russman, P.L., Evangelista, A., Fattori, R., Suzuki, T., Oh, J.K., Moore, A.G., Malouf, J.F., Pape, L.A., Gaca, C., Sechtem, U., Lenferink, S., Deutsch, H.J., Diedrichs, H., Marcos y Robles, J., Llovet, A., Gilon, D., Das, S.K., Armstrong, W.F., Deeb, G.M., Eagle, K.A., 2000. The International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD): New Insights Into an Old Disease. *JAMA* 283, 897. <https://doi.org/10.1001/jama.283.7.897>
- Hai, C.M., Murphy, R.A., 1988. Cross-bridge phosphorylation and regulation of latch state in smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 254, C99–C106.
- Hall, A., Chan, P., Sheets, K., Apperson, M., Delaughter, C., Gleason, T.G., Phillippi, J.A., Nain, A., 2017. Nanonet force microscopy for measuring forces in single smooth muscle cells of the human aorta. *Mol. Biol. Cell* 28, 1894–1900. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-01-0053>
- Hamon, L., Curmi, P.A., Pastré, D., 2010. High-resolution imaging of microtubules and cytoskeleton structures by atomic force microscopy. *Methods Cell Biol.* 95, 157–174. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(10\)95009-7](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(10)95009-7)
- Hayashi, K., Kamiya, A., Ono, K., 2012. *Biomechanics: Functional Adaption and Remodeling*. Springer Science & Business Media.
- Hayashi, K., Naiki, T., 2009. Adaptation and remodeling of vascular wall; biomechanical response to hypertension. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 2, 3–19. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2008.05.002>
- Hedin, U., Bottger, B.A., Forsberg, E., Johansson, S., Thyberg, J., 1988. Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* 107, 307–319.
- Hegner M., Guntherodt H.-J., 2001. Nanometer scale science and technology - The impact of STM and AFM. *ENFI* 144, 11–31. <https://doi.org/10.3254/978-1-61499-000-0-11>
- Heo, S.-J., Szczesny, S.E., Kim, D.H., Saleh, K.S., Mauck, R.L., 2017. Expansion of mesenchymal stem cells on electrospun scaffolds maintains stemness, mechano-responsivity, and differentiation potential: MESENCHYMAL STEM CELL ISOLATION ON NANOFIBROUS SCAFFOLDS. *Journal of Orthopaedic Research*. <https://doi.org/10.1002/jor.23772>

- Hersch, N., Wolters, B., Dreissen, G., Springer, R., Kirchgeßner, N., Merkel, R., Hoffmann, B., 2013. The constant beat: cardiomyocytes adapt their forces by equal contraction upon environmental stiffening. *Biology Open* BIO20133830. <https://doi.org/10.1242/bio.20133830>
- Hill-Eubanks, D.C., Werner, M.E., Heppner, T.J., Nelson, M.T., 2011. Calcium Signaling in Smooth Muscle. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004549>
- Holzapfel, G.A., Gasser, T.C., 2001. A viscoelastic model for fiber-reinforced composites at finite strains: Continuum basis, computational aspects and applications. *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering* 190, 4379–4403. [https://doi.org/10.1016/S0045-7825\(00\)00323-6](https://doi.org/10.1016/S0045-7825(00)00323-6)
- Holzapfel, G.A., Gasser, T.C., Ogden, R.W., 2000. A New Constitutive Framework for Arterial Wall Mechanics and a Comparative Study of Material Models. *Journal of Elasticity* 61, 1–48. <https://doi.org/10.1023/A:1010835316564>
- Holzapfel, G.A., Gasser, T.C., Stadler, M., 2002. A structural model for the viscoelastic behavior of arterial walls: Continuum formulation and finite element analysis. *European Journal of Mechanics - A/Solids* 21, 441–463. [https://doi.org/10.1016/S0997-7538\(01\)01206-2](https://doi.org/10.1016/S0997-7538(01)01206-2)
- Hong, Z., Reeves, K.J., Sun, Z., Li, Z., Brown, N.J., Meininger, G.A., 2015. Vascular Smooth Muscle Cell Stiffness and Adhesion to Collagen I Modified by Vasoactive Agonists. *PLOS ONE* 10, e0119533. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119533>
- Hong, Z., Sun, Z., Li, M., Li, Z., Bunyak, F., Ersoy, I., Trzeciakowski, J.P., Staiculescu, M.C., Jin, M., Martinez-Lemus, L., Hill, M.A., Palaniappan, K., Meininger, G.A., 2014. Vasoactive agonists exert dynamic and coordinated effects on vascular smooth muscle cell elasticity, cytoskeletal remodelling and adhesion. *J Physiol* 592, 1249–1266. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.264929>
- Hubmayr, R.D., Shore, S.A., Fredberg, J.J., Planus, E., Panettieri, R.A., Moller, W., Heyder, J., Wang, N., 1996. Pharmacological activation changes stiffness of cultured human airway smooth muscle cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 271, C1660–C1668.
- Humphrey, J.D., 2002. *Cardiovascular Solid Mechanics*. Springer New York, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-21576-1>
- Humphrey, J.D., Schwartz, M.A., Tellides, G., Milewicz, D.M., 2015. Role of Mechanotransduction in Vascular Biology: Focus on Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections. *Circulation Research* 116, 1448–1461. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.304936>
- Humphrey, J.D., Taylor, C.A., 2008. Intracranial and Abdominal Aortic Aneurysms: Similarities, Differences, and Need for a New Class of Computational Models. *Annu Rev Biomed Eng* 10, 221–246. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160439>
- Huxley, H.E., 1953. Electron microscope studies of the organisation of the filaments in striated muscle. *Biochimica et Biophysica Acta* 12, 387–394. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(53\)90156-5](https://doi.org/10.1016/0006-3002(53)90156-5)
- Isabey, D., Pelle, G., André Dias, S., Bottier, M., Nguyen, N.-M., Filoche, M., Louis, B., 2016. Multiscale evaluation of cellular adhesion alteration and cytoskeleton remodeling by magnetic bead twisting. *Biomech Model Mechanobiol* 15, 947–963. <https://doi.org/10.1007/s10237-015-0734-5>
- Isselbacher, E.M., 2005. Thoracic and Abdominal Aortic Aneurysms. *Circulation* 111, 816–828. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000154569.08857.7A>
- Jansen, K.A., Atherton, P., Ballestrom, C., 2017. Mechanotransduction at the cell-matrix interface. *Seminars in Cell & Developmental Biology, Mechanosensing: from molecules to tissues* 71, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.07.027>
- Jayendiran, R., Campisi, S., Viallon, M., Croisille, P., Avril, S., 2020. Hemodynamics alteration in patient-specific dilated ascending thoracic aortas with tricuspid and bicuspid aortic valves. *J Biomech* 110, 109954. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2020.109954>
- JPK Instruments AG, n.d. Application Note : QI mode - Quantitative Imaging with the NanoWizard 3 AFM.

- Kanda, K., Matsuda, T., 1994. Mechanical stress-induced Orientation and Ultrastructural Change of Smooth Muscle Cells Cultured in Three-dimensional Collagen Lattices. *Cell Transplantation* 3, 481–492.
- Karaki, H., Urakawa, N., Kutsy, P., 1984. Potassium-induced contraction in smooth muscle. *Nihon Heikatsukin Gakkai Zasshi* 20, 427–444.
- Karnik, S.K., 2003. A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease. *Development* 130, 411–423. <https://doi.org/10.1242/dev.00223>
- Kassab, G.S., 2008. Mechanical Homeostasis of Cardiovascular Tissue, in: Artmann, G.M., Chien, S. (Eds.), *Bioengineering in Cell and Tissue Research*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 371–391. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75409-1_15
- Keech, M.K., 1960. Electron microscope study of the normal rat aorta. *J Biophys Biochem Cytol* 7, 533–538.
- Kielty, C.M., Whittaker, S.P., Grant, M.E., Shuttleworth, C.A., 1992. Attachment of human vascular smooth muscles cells to intact microfibrillar assemblies of collagen VI and fibrillin. *Journal of Cell Science* 103, 445–451.
- Kim, J.-H., Avril, S., Duprey, A., Favre, J.-P., 2012. Experimental characterization of rupture in human aortic aneurysms using a full-field measurement technique. *Biomech Model Mechanobiol* 11, 841–853. <https://doi.org/10.1007/s10237-011-0356-5>
- Kim, J.-H., Badel, P., Duprey, A., Favre, J.P., Avril, S., 2011. Characterisation of failure in human aortic tissue using digital image correlation. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering* 14, 73–74. <https://doi.org/10.1080/10255842.2011.592368>
- Koeppen, B.M., Stanton, B.A., 2009. *Berne & Levy Physiology, Updated Edition E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Kolodney, M.S., Wysolmerski, R.B., 1992. Isometric contraction by fibroblasts and endothelial cells in tissue culture: a quantitative study. *J. Cell Biol.* 117, 73–82.
- Kuang, S.-Q., Kwartler, C.S., Byanova, K.L., Pham, J., Gong, L., Prakash, S.K., Huang, J., Kamm, K.E., Stull, J.T., Sweeney, H.L., Milewicz, D.M., 2012. Rare, Non-Synonymous Variant in the Smooth Muscle-Specific Isoform of Myosin Heavy Chain, MYH11, R247C, Alters Force Generation in the Aorta and Phenotype of Smooth Muscle Cells. *Circ Res* 110, 1411–1422. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.261743>
- Lacolley, P., Regnault, V., Avolio, A.P., 2018a. Smooth muscle cell and arterial aging: basic and clinical aspects. *Cardiovasc Res* 114, 513–528. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy009>
- Lacolley, P., Regnault, V., Avolio, A.P., 2018b. Smooth muscle cell and arterial aging: basic and clinical aspects. *Cardiovasc Res* 114, 513–528. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy009>
- Lacolley, P., Regnault, V., Nicoletti, A., Li, Z., Michel, J.-B., 2012. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc. Res.* 95, 194–204. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs135>
- Laurent, V.M., Hénon, S., Planus, E., Fodil, R., Balland, M., Isabey, D., Gallet, F., 2002. Assessment of mechanical properties of adherent living cells by bead micromanipulation: comparison of magnetic twisting cytometry vs optical tweezers. *J Biomech Eng* 124, 408–421.
- Layton, T.B., Williams, L., Colin-York, H., McCann, F.E., Cabrita, M., Feldmann, M., Brown, C., Xie, W., Fritzsche, M., Furniss, D., Nanchahal, J., 2020. Single cell force profiling of human myofibroblasts reveals a biophysical spectrum of cell states. *Biology Open* 9, bio049809. <https://doi.org/10.1242/bio.049809>
- L.D. Landau & E.M. Lifshitz, n.d. *Theory of Elasticity*.
- Legant, W.R., Choi, C.K., Miller, J.S., Shao, L., Gao, L., Betzig, E., Chen, C.S., 2013. Multidimensional traction force microscopy reveals out-of-plane rotational moments about focal adhesions. *PNAS* 110, 881–886. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207997110>
- Li, C., Xu, Q., 2007. Mechanical stress-initiated signal transduction in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Cellular Signalling* 19, 881–891. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.01.004>

- Li, Q., Muragaki, Y., Hatamura, I., Ueno, H., Ooshima, A., 1998. Stretch-induced collagen synthesis in cultured smooth muscle cells from rabbit aortic media and a possible involvement of angiotensin II and transforming growth factor-beta. *J. Vasc. Res.* 35, 93–103. <https://doi.org/10.1159/000025570>
- Lilly, B., 2014. We Have Contact: Endothelial Cell-Smooth Muscle Cell Interactions. *Physiology* 29, 234–241. <https://doi.org/10.1152/physiol.00047.2013>
- Lin, D.C., Dimitriadis, E.K., Horkay, F., 2007. Robust strategies for automated AFM force curve analysis--I. Non-adhesive indentation of soft, inhomogeneous materials. *J Biomech Eng* 129, 430–440. <https://doi.org/10.1115/1.2720924>
- Lindeman, J.H.N., Ashcroft, B.A., Beenakker, J.-W.M., van Es, M., Koekkoek, N.B.R., Prins, F.A., Tielemans, J.F., Abdul-Hussien, H., Bank, R.A., Oosterkamp, T.H., 2010. Distinct defects in collagen microarchitecture underlie vessel-wall failure in advanced abdominal aneurysms and aneurysms in Marfan syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 862–865. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910312107>
- Liu, M., Gomez, D., n.d. Smooth Muscle Cell Phenotypic Diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 9.
- Livne, A., Geiger, B., 2016. The inner workings of stress fibers – from contractile machinery to focal adhesions and back. *J Cell Sci* 129, 1293–1304. <https://doi.org/10.1242/jcs.180927>
- Lohner, J., Rupprecht, J.F., Hu, J., Mandriota, N., Saxena, M., Araujo, D.P. de, Hone, J., Sahin, O., Prost, J., Sheetz, M., 2019. Large and reversible myosin-dependent forces in rigidity sensing. *Nature Physics* 15, 689–695. <https://doi.org/10.1038/s41567-019-0477-9>
- Ma, X., Wang, Y., Stephens, N.L., 1998. Serum deprivation induces a unique hypercontractile phenotype of cultured smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 274, C1206-1214.
- Malekzadeh, S., Fraga-Silva, R.A., Trachet, B., Montecucco, F., Mach, F., Stergiopoulos, N., 2013. Role of the renin–angiotensin system on abdominal aortic aneurysms. *Eur J Clin Invest* 43, 1328–1338. <https://doi.org/10.1111/eci.12173>
- Malmqvist, U., Arner, A., 1999. Kinetics of contraction in depolarized smooth muscle from guinea-pig taenia coli after photodestruction of nifedipine. *J Physiol* 519, 213–221. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.02130.x>
- Mannan, S. (Ed.), 2012. Chapter 7 - Reliability Engineering, in: *Lees' Loss Prevention in the Process Industries (Fourth Edition)*. Butterworth-Heinemann, Oxford, pp. 131–203. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397189-0.00007-0>
- Mao, N., Gu, T., Shi, E., Zhang, G., Yu, L., Wang, C., 2015. Phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in animal model of rat thoracic aortic aneurysm. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery* 21, 62–70. <https://doi.org/10.1093/icvts/ivv074>
- Matsumoto, T., Tsuchida, M., Sato, M., 1996. Change in intramural strain distribution in rat aorta due to smooth muscle contraction and relaxation. *Am. J. Physiol.* 271, H1711-1716. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1996.271.4.H1711>
- Mecham, R.P., Schwartz, S.M., 1995. *Vascular Smooth Muscle Cell: Molecular and Biological Responses to the Extracellular Matrix (Biology of extracellular matrix series)*. Academic Press.
- Megson, I.L., Flitney, F.W., Bates, J., Webster, R., 1995. Repriming of Vascular Smooth Muscle Photorelaxation is Dependent upon Endothelium-derived Nitric Oxide. *Endothelium* 3, 39–46. <https://doi.org/10.3109/10623329509024657>
- Michel, J.-B., Jondeau, G., Milewicz, D.M., 2018. From genetics to response to injury: vascular smooth muscle cells in aneurysms and dissections of the ascending aorta. *Cardiovasc. Res.* 114, 578–589. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy006>
- Milewicz, D.M., Trybus, K.M., Guo, D., Sweeney, H.L., Regalado, E., Kamm, K., Stull, J.T., 2016. Altered Smooth Muscle Cell Force Generation as a Driver of Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 16.303229. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.303229>
- Miller, B.G., Gattone, V.H., Overhage, J.M., Bohlen, H.G., Evan, A.P., 1986. Morphological evaluation of vascular smooth muscle cell: Length and width from a single scanning electron micrograph of microvessels. *Anat. Rec.* 216, 95–103. <https://doi.org/10.1002/ar.1092160116>

- Miller, F.J., Sharp, W.J., Fang, X., Oberley, L.W., Oberley, T.D., Weintraub, N.L., 2002. Oxidative stress in human abdominal aortic aneurysms: a potential mediator of aneurysmal remodeling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 560–565.
- Mironov, V., 2014. *Fundamentals of Scanning Probe Microscopy*.
- Morkvėnaitė-Vilkončienė, I., Ramanavičienė, A., Ramanavičius, A., 2013. Atomic force microscopy as a tool for the investigation of living cells. *Medicina (Kaunas)* 49, 155–164.
- Müller, D.J., Dufrêne, Y.F., 2011. Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface. *Trends Cell Biol.* 21, 461–469. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.04.008>
- Murray, T.R., Marshall, B.E., Macarak, E.J., 1990. Contraction of vascular smooth muscle in cell culture. *J. Cell. Physiol.* 143, 26–38. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041430105>
- Murtada, S.C., Arner, A., Holzapfel, G.A., 2012. Experiments and mechanochemical modeling of smooth muscle contraction: significance of filament overlap. *J. Theor. Biol.* 297, 176–186. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2011.11.012>
- Murtada, S.-I., Ferruzzi, J., Yanagisawa, H., Humphrey, J.D., 2016a. Reduced Biaxial Contractility in the Descending Thoracic Aorta of Fibulin-5 Deficient Mice. *Journal of Biomechanical Engineering* 138, 051008. <https://doi.org/10.1115/1.4032938>
- Murtada, S.-I., Lewin, S., Arner, A., Humphrey, J.D., 2016b. Adaptation of active tone in the mouse descending thoracic aorta under acute changes in loading. *Biomech Model Mechanobiol* 15, 579–592. <https://doi.org/10.1007/s10237-015-0711-z>
- O’Connell, M.K., Murthy, S., Phan, S., Xu, C., Buchanan, J., Spilker, R., Dalman, R.L., Zarins, C.K., Denk, W., Taylor, C.A., 2008. The Three-Dimensional Micro- and Nanostructure of the Aortic Medial Lamellar Unit Measured Using 3D Confocal & Electron Microscopy Imaging. *Matrix Biol* 27, 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2007.10.008>
- Osborne-Pellegrin, M.J., 1978. Some ultrastructural characteristics of the renal artery and abdominal aorta in the rat. *J Anat* 125, 641–652.
- Owens, G.K., Kumar, M.S., Wamhoff, B.R., 2004. Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiological Reviews* 84, 767–801. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2003>
- Owens, G.K., Rabinovitch, P.S., Schwartz, S.M., 1981. Smooth muscle cell hypertrophy versus hyperplasia in hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7759–7763.
- Pan, B., Xie, H., Wang, Z., 2010. Equivalence of digital image correlation criteria for pattern matching. *Appl. Opt.*, AO 49, 5501–5509. <https://doi.org/10.1364/AO.49.005501>
- Papke, C.L., Cao, J., Kwartler, C.S., Villamizar, C., Byanova, K.L., Lim, S.-M., Sreenivasappa, H., Fischer, G., Pham, J., Rees, M., Wang, M., Chaponnier, C., Gabbiani, G., Khakoo, A.Y., Chandra, J., Trache, A., Zimmer, W., Milewicz, D.M., 2013. Smooth muscle hyperplasia due to loss of smooth muscle α -actin is driven by activation of focal adhesion kinase, altered p53 localization and increased levels of platelet-derived growth factor receptor- β . *Hum Mol Genet* 22, 3123–3137. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt167>
- Papke, C.L., Yamashiro, Y., Yanagisawa, H., 2015. MMP17/MT4-MMP and Thoracic Aortic Aneurysms: OPning New Potential for Effective Treatment. *Circulation Research* 117, 109–112. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.306851>
- Park, J.S., Chu, J.S., Tsou, A.D., Diop, R., Tang, Z., Wang, A., Li, S., 2011. The effect of matrix stiffness on the differentiation of mesenchymal stem cells in response to TGF- β . *Biomaterials* 32, 3921–3930. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.02.019>
- Parker, K.K., Brock, A.L., Brangwynne, C., Mannix, R.J., Wang, N., Ostuni, E., Geisse, N.A., Adams, J.C., Whitesides, G.M., Ingber, D.E., 2002. Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *FASEB J.* 16, 1195–1204. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0038com>
- Pasta, S., Rinaudo, A., Luca, A., Pilato, M., Scardulla, C., Gleason, T.G., Vorp, D.A., 2013. Difference in hemodynamic and wall stress of ascending thoracic aortic aneurysms with bicuspid and tricuspid aortic valve. *J Biomech* 46, 1729–1738. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.03.029>

- Petit, C., 2017. Caractérisation combinée en microscopies à force atomique et à fluorescence confocale sur la cellule isolée d'ostéoblaste de souris à destination de travaux pratiques multidisciplinaires, entre les nanosciences, la physique instrumentale et la biologie (Rapport de Projet de Fin d'Etudes). Grenoble INP, Institute for Advanced Biosciences, CIME Nanotech, ENISE, Grenoble.
- Petit, C., Guignandon, A., Avril, S., 2019a. Traction Force Measurements of Human Aortic Smooth Muscle Cells Reveal a Motor-Clutch behavior. *Molecular and Cell Biomechanics* 16, 87–108. <https://doi.org/DOI>: <https://doi.org/10.32604/mcb.2019.06415>
- Petit, C., Karkhaneh Yousefi, A.-A., Ben Moussa, O., Michel, J.-B., Alain Guignandon, Avril, S., 2021. Regulation of SMC traction forces in human aortic thoracic aneurysms. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*. <https://doi.org/10.1007/s10237-020-01412-6>
- Petit, C., Kechiche, M., Ivan, I.-A., Toscano, R., Bolcato, V., Planus, E., Marchi, F., 2020. Visuo-haptic virtual exploration of single cell morphology and mechanics based on AFM mapping in fast mode. *Journal of Micro-Bio Robotics* 16, 147–160. <https://doi.org/10.1007/s12213-020-00140-5>
- Petit, C., Kechiche, M., Ivan, I.-A., Toscano, R., Bolcato, V., Planus, E., Marchi, F., 2019b. Characterization of micro/nano-rheology properties of soft and biological matter combined with a virtual reality haptic exploration. Presented at the MARSS 2019 (International Conference on Manipulation Automation and Robotics at Small Scales), Helsinki, Finland.
- Petit, C., Planus, E., Marchi, F., Ivan, I. A., 2017. Caractérisation Combinée par Microscopie à Force Atomique en Mode PeakForce et par Microscopie Confocale à Fluorescence de la Cellule Animale Isolée Fixée sur un Micro Motif Adhésif à Destination de Futurs Travaux Pratiques de Nanobiophysique. Non publié.
- Pittenger, B., Erina, N., Su, C., 2014. Mechanical Property Mapping at the Nanoscale Using PeakForce QNM Scanning Probe Technique, in: Tiwari, A. (Ed.), *Nanomechanical Analysis of High Performance Materials, Solid Mechanics and Its Applications*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 31–51. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6919-9_2
- Pittman, R.N., 2011. *Oxygen Transport, Regulation of Tissue Oxygenation*. Morgan & Claypool Life Sciences.
- Planus, E., 2017. E. Planus, Cours de M1.
- Poon, B., Rittel, D., Ravichandran, G., 2008. An analysis of nanoindentation in linearly elastic solids. *International Journal of Solids and Structures* 45, 6018–6033. <https://doi.org/10.1016/j.ijsolstr.2008.07.021>
- Powers, K.A., Dharmoon, A.S., 2020. *Physiology, Pulmonary Ventilation and Perfusion*, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Qiu, H., Zhu, Y., Sun, Z., Trzeciakowski, J.P., Gansner, M., Depre, C., Resuello, R.R.G., Natividad, F.F., Hunter, W.C., Genin, G.M., Elson, E.L., Vatner, D.E., Meininger, G.A., Vatner, S.F., 2010. Vascular Smooth Muscle Cell Stiffness as a Mechanism for Increased Aortic Stiffness with Aging. *Circ Res* 107, 615–619. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.221846>
- Rachev, A., Hayashi, K., 1999. Theoretical Study of the Effects of Vascular Smooth Muscle Contraction on Strain and Stress Distributions in Arteries. *Annals of Biomedical Engineering* 27, 459–468. <https://doi.org/10.1114/1.191>
- Raines, E.W., Koyama, H., Carragher, N.O., 2000. The extracellular matrix dynamically regulates smooth muscle cell responsiveness to PDGF. *Annals of the New York Academy of Sciences* 902, 39–52.
- Raines, E.W., Ross, R., 1993. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J* 69, S30–S37.
- Rapp, J., 1997. *Oscillatory Flow Effects on Rat Aortic Smooth Muscle Cells*. diplom.de.
- Regalado, E.S., Guo, D., Prakash, S., Bensed, T.A., Flynn, K., Estrera, A., Safi, H., Liang, D., Hyland, J., Child, A., Arno, G., Boileau, C., Jondeau, G., Braverman, A., Moran, R., Morisaki, T., Morisaki, H., Consortium, M.A., Pyeritz, R., Coselli, J., LeMaire, S., Milewicz, D.M., 2015. *Aortic Disease*

- Presentation and Outcome Associated With ACTA2 Mutations CLINICAL PERSPECTIVE. *Circulation: Cardiovascular Genetics* 8, 457–464. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.114.000943>
- Reusch, P., Wagdy, H., Reusch, R., Wilson, E., Ives, H.E., 1996. Mechanical Strain Increases Smooth Muscle and Decreases Nonmuscle Myosin Expression in Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research* 79, 1046–1053. <https://doi.org/10.1161/01.RES.79.5.1046>
- Riches, K., Angelini, T.G., Mudhar, G.S., Kaye, J., Clark, E., Bailey, M.A., Sohrabi, S., Korossis, S., Walker, P.G., Scott, D.J.A., Porter, K.E., 2013. Exploring smooth muscle phenotype and function in a bioreactor model of abdominal aortic aneurysm. *Journal of Translational Medicine* 11, 208. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-208>
- Riches, K., Clark, E., Helliwell, R.J., Angelini, T.G., Hemmings, K.E., Bailey, M.A., Bridge, K.I., Scott, D.J.A., Porter, K.E., 2018. Progressive Development of Aberrant Smooth Muscle Cell Phenotype in Abdominal Aortic Aneurysm Disease. *J. Vasc. Res.* 55, 35–46. <https://doi.org/10.1159/000484088>
- Rigato, A., Rico, F., Eghiaian, F., Piel, M., Scheuring, S., 2015. Atomic Force Microscopy Mechanical Mapping of Micropatterned Cells Shows Adhesion Geometry-Dependent Mechanical Response on Local and Global Scales. *ACS Nano* 9, 5846–5856. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b00430>
- Riveros, F., Chandra, S., Finol, E.A., Gasser, T.C., Rodriguez, J.F., 2013. A pull-back algorithm to determine the unloaded vascular geometry in anisotropic hyperelastic AAA passive mechanics. *Ann Biomed Eng* 41, 694–708. <https://doi.org/10.1007/s10439-012-0712-3>
- Rodríguez, J.F., Ruiz, C., Doblaré, M., Holzapfel, G.A., 2008. Mechanical stresses in abdominal aortic aneurysms: influence of diameter, asymmetry, and material anisotropy. *J Biomech Eng* 130, 021023. <https://doi.org/10.1115/1.2898830>
- Roduit, C., Longo, G., Benmessaoud, I., Volterra, A., Saha, B., Dietler, G., Kasas, S., 2012. Stiffness tomography exploration of living and fixed macrophages. *J. Mol. Recognit.* 25, 241–246. <https://doi.org/10.1002/jmr.2184>
- Romo, A., 2014. Caractérisation biomécanique des anévrismes de l'aorte thoracique ascendante (phdthesis). Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne.
- Romo, A., Badel, P., Duprey, A., Favre, J.-P., Avril, S., 2014. In vitro analysis of localized aneurysm rupture. *J Biomech* 47, 607–616. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.12.012>
- Roy, J., Tran, P.K., Religa, P., Kazi, M., Henderson, B., Lundmark, K., Hedin, U., 2002. Fibronectin promotes cell cycle entry in smooth muscle cells in primary culture. *Exp. Cell Res.* 273, 169–177. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5427>
- Rubbia, L., Gabbiani, G., 1989. Phénotype des cellules musculaires lisses artérielles et athérosclérose. *médecine/sciences* 5, 389. <https://doi.org/10.4267/10608/3984>
- Rzucidlo, E. M., Martin, K. A., Powell, R. J., 2007. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *Journal of Vascular Surgery* 45, A25–A32. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2007.03.001>
- Saez, A., Ghibaudo, M., Ladoux, B., Buguin, A., Silberzan, P., 2007. Les cellules vivantes répondent à la rigidité de leur substrat. *Images de la physique* 94–100.
- Sawada, H., Rateri, D.L., Moorleggen, J.J., Majesky, M.W., Daugherty, A., 2017. Smooth Muscle Cells Derived From Second Heart Field and Cardiac Neural Crest Reside in Spatially Distinct Domains in the Media of the Ascending Aorta—Brief Report. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 37, 1722–1726. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309599>
- Sazonova, O.V., Isenberg, B.C., Herrmann, J., Lee, K.L., Purwada, A., Valentine, A.D., Buczek-Thomas, J.A., Wong, J.Y., Nugent, M.A., 2015. Extracellular matrix presentation modulates vascular smooth muscle cell mechanotransduction. *Matrix Biology* 41, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.11.001>
- Schildmeyer, L.A., Braun, R., Taffet, G., Debiasi, M., Burns, A.E., Bradley, A., Schwartz, R.J., 2000. Impaired vascular contractility and blood pressure homeostasis in the smooth muscle alpha-actin null mouse. *FASEB J.* 14, 2213–2220. <https://doi.org/10.1096/fj.99-0927com>

- Schnell, S., Smith, D.A., Barker, A.J., Entezari, P., Honarmand, A.R., Maria L. Carr, Malaisrie, S.C., McCarthy, P.M., Collins, J., Carr, J.C., Markl, M., 2016. Altered aortic shape in bicuspid aortic valve relatives influences blood flow patterns. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 17, 1239–1247. <https://doi.org/10.1093/ehjci/jew149>
- Sehgel, N.L., Vatner, S.F., Meininger, G.A., 2015. “Smooth Muscle Cell Stiffness Syndrome” — Revisiting the Structural Basis of Arterial Stiffness. *Front Physiol* 6. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00335>
- Sehgel, N.L., Zhu, Y., Sun, Z., Trzeciakowski, J.P., Hong, Z., Hunter, W.C., Vatner, D.E., Meininger, G.A., Vatner, S.F., 2013. Increased vascular smooth muscle cell stiffness: a novel mechanism for aortic stiffness in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 305, H1281–H1287. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00232.2013>
- Sherifova, S., Holzapfel, and G.A., 2020. Biochemomechanics of the thoracic aorta in health and disease. *Prog. Biomed. Eng.* 2, 032002. <https://doi.org/10.1088/2516-1091/ab9a29>
- Sirghi, L., 2010. Atomic Force Microscopy indentation of living cells 8.
- Skalli, O., Ropraz, P., Trzeciak, A., Benzouana, G., Gillesen, D., Gabbiani, G., 1986. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 103, 2787–2796.
- Smith, B.A., Tolloczko, B., Martin, J.G., Grütter, P., 2005. Probing the Viscoelastic Behavior of Cultured Airway Smooth Muscle Cells with Atomic Force Microscopy: Stiffening Induced by Contractile Agonist. *Biophysical Journal* 88, 2994–3007. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.046649>
- Smolyakov, G., Formosa-Dague, C., Severac, C., Duval, R.E., Dague, E., 2016. High speed indentation measures by FV, QI and QNM introduce a new understanding of bionanomechanical experiments. *Micron* 85, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2016.03.002>
- Somlyo, A.P., Somlyo, A.V., 2003. Ca²⁺ Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. *Physiological Reviews* 83, 1325–1358. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2003>
- Somlyo, A.P., Somlyo, A.V., 1994. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372, 231. <https://doi.org/10.1038/372231a0>
- Stadler, E., Campbell, J.H., Campbell, G.R., 1989. Do cultured vascular smooth muscle cells resemble those of the artery wall? If not, why not? *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 14 Suppl 6, S1-8.
- Stary, H.C., Chandler, A.B., Glagov, S., Guyton, J.R., Insull, W., Rosenfeld, M.E., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., Wissler, R.W., 1994. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 89, 2462–2478. <https://doi.org/10.1161/01.cir.89.5.2462>
- Sugita, S., Mizutani, E., Hozaki, M., Nakamura, M., Matsumoto, T., 2019. Photoelasticity-based evaluation of cellular contractile force for phenotypic discrimination of vascular smooth muscle cells. *Scientific Reports* 9, 3960. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40578-7>
- Taggart, M.J., 2001. Smooth Muscle Excitation-Contraction Coupling: a Role for Caveolae and Caveolins? *Physiology* 16, 61–65.
- Tan, J.L., Tien, J., Pirone, D.M., Gray, D.S., Bhadriraju, K., Chen, C.S., 2003a. Cells lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force. *PNAS* 100, 1484–1489. <https://doi.org/10.1073/pnas.0235407100>
- Tan, J.L., Tien, J., Pirone, D.M., Gray, D.S., Bhadriraju, K., Chen, C.S., 2003b. Cells lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force. *PNAS* 100, 1484–1489. <https://doi.org/10.1073/pnas.0235407100>
- Tan, T., De Vita, R., 2015. A structural constitutive model for smooth muscle contraction in biological tissues. *International Journal of Non-Linear Mechanics, Instabilities and Nonlinearities in Soft Systems: From Fluids to Biomaterials* 75, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijnonlinmec.2015.02.009>
- Thomas, G., Burnham, N.A., Camesano, T.A., Wen, Q., 2013. Measuring the Mechanical Properties of Living Cells Using Atomic Force Microscopy. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/50497>

- Thyberg, J., Blomgren, K., Hedin, U., Dryjski, M., 1995. Phenotypic modulation of smooth muscle cells during the formation of neointimal thickenings in the rat carotid artery after balloon injury: an electron-microscopic and stereological study. *Cell Tissue Res.* 281, 421–433.
- Thyberg, J., Blomgren, K., Roy, J., Tran, P.K., Hedin, U., 1997. Phenotypic modulation of smooth muscle cells after arterial injury is associated with changes in the distribution of laminin and fibronectin. *J. Histochem. Cytochem.* 45, 837–846.
<https://doi.org/10.1177/002215549704500608>
- Thyberg, J., Hedin, U., Sjölund, M., Palmberg, L., Bottger, B.A., 1990. Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis* 10, 966–990.
- Timraz, S.B.H., Rezgui, R., Boularaoui, S.M., Teo, J.C.M., 2015. Stiffness of Extracellular Matrix Components Modulates the Phenotype of Human Smooth Muscle Cells in Vitro and Allows for the Control of Properties of Engineered Tissues. *Procedia Engineering*, 4th International Conference on Tissue Engineering, ICTE2015, An ECCOMAS Thematic Conference 110, 29–36.
<https://doi.org/10.1016/j.proeng.2015.07.006>
- Tolić-Nørrelykke, I.M., Butler, J.P., Chen, J., Wang, N., 2002. Spatial and temporal traction response in human airway smooth muscle cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 283, C1254–C1266. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00169.2002>
- Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., Brown, R.A., 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, 349–363. <https://doi.org/10.1038/nrm809>
- Tonar, Z., Kochova, P., Cimrman, R., Perktold, J., Witter, K., 2015. Segmental differences in the orientation of smooth muscle cells in the tunica media of porcine aortae. *Biomech Model Mechanobiol* 14, 315–332. <https://doi.org/10.1007/s10237-014-0605-5>
- Tong, M.H., Huang, N., Zhang, W., Zhou, Z.L., Ngan, A.H.W., Du, Y., Chan, B.P., 2016. Multiphoton photochemical crosslinking-based fabrication of protein micropatterns with controllable mechanical properties for single cell traction force measurements. *Sci Rep* 6, 20063.
<https://doi.org/10.1038/srep20063>
- Trabelsi, O., Davis, F.M., Rodriguez-Matas, J.F., Duprey, A., Avril, S., 2015. Patient specific stress and rupture analysis of ascending thoracic aneurysms. *Journal of Biomechanics* 48, 1836–1843.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2015.04.035>
- Tran, T., McNeill, K.D., Gerthoffer, W.T., Unruh, H., Halayko, A.J., 2006. Endogenous laminin is required for human airway smooth muscle cell maturation. *Respiratory Research* 7.
<https://doi.org/10.1186/1465-9921-7-117>
- Tran-Lundmark, K., Tannenberg, P., Rauch, B.H., Ekstrand, J., Tran, P.-K., Hedin, U., Kinsella, M.G., 2015. Perlecan Heparan Sulfate Is Required for the Inhibition of Smooth Muscle Cell Proliferation by All- *trans* -Retinoic Acid: ATRA INHIBITION OF SMCs REQUIRES PERLECAN HS. *Journal of Cellular Physiology* 230, 482–487. <https://doi.org/10.1002/jcp.24731>
- Tremblay, D., Cartier, R., Mongrain, R., Leask, R.L., 2010. Regional dependency of the vascular smooth muscle cell contribution to the mechanical properties of the pig ascending aortic tissue. *Journal of Biomechanics* 43, 2448–2451.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2010.04.018>
- Tsamis, A., Krawiec, J.T., Vorp, D.A., 2013. Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: a review. *J R Soc Interface* 10.
<https://doi.org/10.1098/rsif.2012.1004>
- Tuna, B.G., Bakker, E.N.T.P., VanBavel, E., 2012. Smooth Muscle Biomechanics and Plasticity: Relevance for Vascular Calibre and Remodelling. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 110, 35–41. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00794.x>
- Vahabi, S., Nazemi Salman, B., Javanmard, A., 2013. Atomic Force Microscopy Application in Biological Research: A Review Study. *Iran J Med Sci* 38, 76–83.
- Wagenseil, J.E., Mecham, R.P., 2009. Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics. *Physiol Rev* 89, 957–989. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2008>

- Wagner, P.D., 2015. The physiological basis of pulmonary gas exchange: implications for clinical interpretation of arterial blood gases. *Eur Respir J* 45, 227–243. <https://doi.org/10.1183/09031936.00039214>
- Wang, H., Yang, Y., Erie, D.A., 2007. Characterization of Protein–Protein Interactions Using Atomic Force Microscopy, in: Schuck, P. (Ed.), *Protein Interactions: Biophysical Approaches for the Study of Complex Reversible Systems*, Protein Reviews. Springer US, Boston, MA, pp. 39–77. https://doi.org/10.1007/978-0-387-35966-3_2
- Wang, J.H.-C., Lin, J.-S., 2007. Cell traction force and measurement methods. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 6, 361–371. <https://doi.org/10.1007/s10237-006-0068-4>
- Wang, N., 2017. Review of Cellular Mechanotransduction. *J Phys D Appl Phys* 50.
- Wanjare, M., Kuo, F., Gerecht, S., 2013a. Derivation and maturation of synthetic and contractile vascular smooth muscle cells from human pluripotent stem cells. *Cardiovasc Res* 97, 321–330. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs315>
- Wanjare, M., Kuo, F., Gerecht, S., 2013b. Derivation and maturation of synthetic and contractile vascular smooth muscle cells from human pluripotent stem cells. *Cardiovasc. Res.* 97, 321–330. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs315>
- Whited, A.M., Park, P.S.-H., 2014. Atomic force microscopy: A multifaceted tool to study membrane proteins and their interactions with ligands. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Structural and biophysical characterisation of membrane protein-ligand binding 1838, 56–68. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.04.011>
- Win, Z., Buksa, J.M., Steucke, K.E., Gant Luxton, G.W., Barocas, V.H., Alford, P.W., 2017. Cellular Microbiaxial Stretching to Measure a Single-Cell Strain Energy Density Function. *J Biomech Eng* 139. <https://doi.org/10.1115/1.4036440>
- Wolinsky, H., Glagov, S., 1967. A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals. *Circ. Res.* 20, 99–111.
- Wolinsky, H., Glagov, S., 1964. Structural Basis for the Static Mechanical Properties of the Aortic Media. *Circulation Research* 14, 400–413. <https://doi.org/10.1161/01.RES.14.5.400>
- Yang, Z., 2011. Validation of the Boussinesq equation for use in traction field determination. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* 14, 1065–1070. <https://doi.org/10.1080/10255842.2010.506642>
- Ye, G.J.C., Aratyn-Schaus, Y., Nesmith, A.P., Pasqualini, F.S., Alford, P.W., Parker, K.K., 2014. The contractile strength of vascular smooth muscle myocytes is shape dependent. *Integr Biol (Camb)* 6, 152–163. <https://doi.org/10.1039/c3ib40230d>
- Zhang, Y., Ng, S.S., Wang, Y., Feng, H., Chen, W.N., Chan-Park, M.B., Li, C., Chan, V., 2014. Collective cell traction force analysis on aligned smooth muscle cell sheet between three-dimensional microwalls. *Interface Focus* 4. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2013.0056>
- Zhu, Y., He, L., Zhou, Y., 2018. Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Stiffness and Adhesion by [Ca²⁺]_i: an Atomic Force Microscopy-Based Study. *Microsc Microanal* 24, 708–712. <https://doi.org/10.1017/S1431927618015519>
- Zulliger, M.A., Rachev, A., Stergiopoulos, N., 2004. A constitutive formulation of arterial mechanics including vascular smooth muscle tone. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 287, H1335–H1343. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00094.2004>
- Zündel, M., Ehret, A.E., Mazza, E., 2017. Factors influencing the determination of cell traction forces. *PLOS ONE* 12, e0172927. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172927>

CLAUDIE PETIT

August 30th 1993

— Postdoctoral Fellow —



CONTACT



2, impasse du Jougtier
42160 Andrézieux-Bouthéon



claudie.petit@hotmail.com



+336 99 94 92 52



0000-0003-3817-8456

EDUCATION

PHD THESIS - BIOMECHANICS

Mines Saint-Etienne
PhD school EDSIS 488
Saint-Etienne, France
2017-2021 (April 26th)

Master - Biomechanics

Faculté des Sciences et Technologies
Université Lyon 1, Lyon, France
2016-2017

Engineering degree - Mechanical and Sensory Engineering

Ecole Nationale d'Ingénieurs de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France
Ecole Centrale de Lyon, Lyon, France
2014-2017

LANGUAGE

French – Native language

English – Advanced
B2 – TOEIC: 880/990 (2016)

Spanish – Intermediate

PROFILE

Multidisciplinary engineer and scientist with interest in biomechanical engineering, sensory engineering and cell biology. Mainly experimentalist, I am also interested by modeling in applied physics and instrumentation. My passion is knowledge transfer and teaching.

EXPERIENCE

POSTDOCTORAL FELLOW - RESEARCH ENGINEER

May 2021 (18 months)

Mines Saint-Etienne
SAINBIOSE (INSERM U1059), France

PhD THESIS - RESEARCH ENGINEER

Oct. 2017 – Avr. 2021

PhD defense : April 26th 2021
Mines Saint-Etienne
SAINBIOSE (INSERM U1059), France
Supervisor: Avril, S.

Propriétés mécaniques des cellules musculaires lisses isolées issues d'aortes humaines saines et anévrysmales

TEACHING AND SUPERVISION

Contract of assistant professor at Université Jean Monnet, France

Oct. 2017 – Avr. 2021

Thermodynamics, Thermal science, Optics
Mines Saint-Etienne, Saint-Etienne, France
Tutoring: 4 master students

MASTER THESIS

Institut Néel (CNRS UPR2940) *CIME Nanotech* – Grenoble, France
Institute for Advanced Biosciences (CR UGA / Inserm U1209 / CNRS UMR5039)

Feb. – Aug. 2017

Supervisors: Marchi, F.; Planus, E.; Ivan, I. A.

Combined characterization of isolated animal cells spread on adhesive micropattern using AFM nanomechanical mapping technique and Fluorescence Microscopy for educational purpose.

LIST OF PUBLICATIONS

• Book chapter

Petit, C.; Mousavi, S. J.; Avril, S. Review of the essential roles of SMCs in ATAA biomechanics. *Advances in Biomechanics and Tissue Regeneration*, Mohamed Hamdy Doweidar, p.500. **2 0 1 9**

• Peer-reviewed journal papers

Petit, C.; Karkhaneh Yousefi, A.-A.; Ben Moussa, O.; et al. Regulation of SMC traction forces in human aortic thoracic aneurysms. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*. **2 0 2 1**

Petit, C.; Kechiche, M.; Ivan, I.A.; et al. Visuo-haptic virtual exploration of single cell morphology and mechanics based on AFM mapping in fast mode. *Journal of Micro-Bio Robotics*, vol.16, pp.147-160. **2 0 2 0**

Petit, C.; Guignandon, A.; Avril, S. Traction Force Measurements of Human Aortic Smooth Muscle Cells Reveal a Motor-Clutch behavior. *Molecular and Cell Biomechanics*, vol.16, no.2, pp.87-108. **2 0 1 9**

Karkhaneh Yousefi, A.-A.; Petit, C.; Avril S. Stiffness Sensing by Aortic Smooth Muscle Cells: Continuum Mechanics Modeling of the Acto-Myosin Role. *ASME Journal of Biomechanical Engineering*, Submitted in January 2021

Caire, R.; Audoux, E.; Courbon, G.; Chafchafi, M.; Michaud, E.; Petit, C.; et al. YAP is a key actor in inflammatory responses, *Cell Reports*, Submitted in January 2021.

• Conferences

Petit, C.; Kechiche, M.; Ivan, I. A.; et al. Characterization of micro/nano-rheology properties of soft and biological matter combined with a virtual reality haptic exploration. *MARSS 2019 (International Conference on Manipulation Automation and Robotics at Small Scales)*, Jul 2019, Helsinki, Finland. **2 0 1 9**

Ivan, I. A.; Petit, C.; Gurgu, I. V.; Toscano, R. AFM Nanocyte – Development of an education oriented high resolution profilometer. *IFAC-PapersOnLine*, 20th IFAC World Congress, vol.50, no.1, pp.2385-2390. **2 0 1 7**

SB3C 2020 – Virtual Summer Biomechanics, Bioengineering, and Biotransport Conference	Vidéo	Jun. 17-20	2 0 2 0
Semaine Manutech Sleight – Saint-Etienne, France	Poster	Jan. 13-17	2 0 2 0
GDR 3570 MECABIO – Mécanique des Matériaux et Fluides Biologiques – Marseille, France	Oral	Dec. 11-13	2 0 1 9
Bruker Annual Atomic Force Microscopy Users Meeting – Grenoble, France	Oral	Nov. 20-21	2 0 1 9
SB 2019 – 44ème Congrès de la Société de Biomécanique – Poitiers, France	Oral	Oct. 28-30	2 0 1 9
ESB 2019 – European Society of Biomechanics – Vienna, Austria	Poster	Jul. 6-9	2 0 1 9
MARSS 2019 – International Conference on Manipulation Automation and Robotics at Small Scales – Helsinki, Finland (Presentator: Marchi, F.)	Oral	Jul. 1-5	2 0 1 9
ISACB 2018 – International Society for Applied Cardiovascular Biology – Bordeaux, France	Poster	Sep. 16-19	2 0 1 8

NNT : 2021LYSEM014

Claudie PETIT

MECHANICAL PROPERTIES OF SMOOTH MUSCLE CELLS ISOLATED FROM HEALTHY AND ANEURYSMAL HUMAN AORTAE

Speciality : Biomechanics

Keywords : Smooth Muscle Cells, Aortic Wall, Cell Biomechanics, Human Primary Culture, Atomic Force Microscopy, Nanoindentation, Traction Force Microscopy, Mechanical Modelling, Aortic Aneurysm, Basal Tone

Abstract :

Smooth muscle cells (SMC) play a major role in the mechanobiological response of the aortic wall. Certain influencing factors, such as pathological conditions, lead to deregulation of the mechanosensitivity and mechanotransduction processes of the SMC. These changes are reflected in particular by a phenotypic change of the SMC, from contractile to synthetic, in order to repair the tissue which is perceived as deficient. Remodeling induces stiffening and weakening of the wall. Given the lack of quantitative data about the mechanical properties of human aortic SMCs, we undertook their characterization in normal and pathological conditions, in order to better anticipate alterations leading to injury. Accordingly, this thesis presents a set experimental studies carried out on SMCs from primary cultures of human origin, from healthy and aneurysmal donors. The characterization of SMCs is based on two engineering techniques: traction force microscopy to measure the basal tone, and nanoindentation by atomic force microscopy to measure the apparent stiffness of isolated SMCs. Results show increased tensile forces in aneurysmal cells, but no significant change in stiffness. Future work aims to characterize the mechanical properties in the cytoskeleton of these cells and to assess how mechanical stimuli affect these properties.

NNT : 2021LYSEM014

Claudie PETIT

PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES ISOLÉES ISSUES D'AORTES HUMAINES SAINES ET ANÉVRYSMALES

Spécialité: Biomécanique

Mots clefs : Cellules Musculaires Lisses, Paroi Aortique, Biomécanique Cellulaire, Culture Primaire Humaine, Microscopie à Force Atomique, Nanoindentation, Traction Force Microscopy, Modélisation Mécanique, Anévrisme Aortique, Tonus Basal

Résumé :

La cellule musculaire lisse (CML) joue un rôle majeur dans la réponse biomécanique de la paroi aortique. Certains facteurs d'influence, telles que des conditions pathologiques, entraînent une dérégulation des processus de mécanosensibilité et de mécanotransduction de la CML. Ces changements se traduisent notamment par un changement de phénotype des CML contractiles vers synthétiques, afin de réparer le tissu qu'elles perçoivent comme défectueux. Le remodelage induit une rigidification et une fragilisation de la paroi qui devient alors plus sujette au risque de rupture. Toutefois, au vu du manque de données quantitatives à propos des propriétés mécaniques des CML aortiques humaines, leur caractérisation nous est apparue essentielle en conditions normales et pathologiques, afin de mieux anticiper les altérations conduisant à une lésion. Dans cette perspective, cette thèse présente un ensemble de travaux expérimentaux menés sur des CML issues de culture primaire d'origine humaine, issues de donneurs sains et anévrysmaux. La caractérisation des CML repose sur deux techniques d'ingénierie : la traction force microscopie pour mesurer le tonus basal, et la nanoindentation par microscopie à force atomique pour accéder à la rigidité apparente de CML isolées. Les résultats montrent une augmentation des forces de traction dans les cellules anévrysmales, mais pas de changement de rigidité significatif. Les perspectives envisagées sont de caractériser les propriétés mécaniques dans le cytosquelette de ces cellules et d'évaluer comment les stimulations mécaniques affectent ces propriétés.