



HAL
open science

Étude de l'adhérence de cellules individuelles par nanoscopie de fluorescence

Dalia El Arawi

► **To cite this version:**

Dalia El Arawi. Étude de l'adhérence de cellules individuelles par nanoscopie de fluorescence. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université de Technologie de Troyes, 2019. Français. NNT : 2019TROY0033 . tel-03623556

HAL Id: tel-03623556

<https://theses.hal.science/tel-03623556v1>

Submitted on 29 Mar 2022

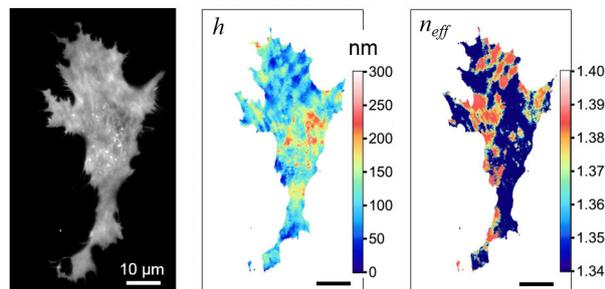
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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.

Thèse
de doctorat
de l'UTT

Dalia EL ARAWI

Étude de l'adhérence de cellules individuelles par nanoscopie de fluorescence



Champ disciplinaire :
Sciences pour l'Ingénieur

2019TROY0033

Année 2019

THESE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR

de l'UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE TROYES

EN SCIENCES POUR L'INGENIEUR

Spécialité : MATERIAUX, MECANIQUE, OPTIQUE, NANOTECHNOLOGIE

présentée et soutenue par

Dalia EL ARAWI

le 6 décembre 2019

**Étude de l'adhérence de cellules individuelles
par nanoscopie de fluorescence**

JURY

M. M. OHEIM	DIRECTEUR DE RECHERCHE CNRS	Président
Mme S. BRASSELET	DIRECTRICE DE RECHERCHE CNRS	Rapporteure
M. M. PIEL	DIRECTEUR DE RECHERCHE CNRS	Rapporteur
Mme M. DONTENWILL	DIRECTRICE DE RECHERCHE CNRS	Examinatrice
M. C. LE CLAINCHE	DIRECTEUR DE RECHERCHE CNRS	Examineur
Mme C. TERRYN	INGENIEURE DE RECHERCHE	Examinatrice
M. R. JAFFIOL	MAITRE DE CONFERENCES - HDR	Directeur de thèse

"LA VIE N'EST FACILE POUR AUCUN DE NOUS. MAIS QUOI, IL FAUT AVOIR DE LA PERSÉVÉRANCE, ET SURTOUT DE LA CONFIANCE EN SOI. IL FAUT CROIRE QUE L'ON EST DOUÉ POUR QUELQUE CHOSE, ET QUE, CETTE CHOSE, IL FAUT L'ATTEINDRE COÛTE QUE COÛTE"

Marie Curie

Physicienne, Scientifique (1867 – 1934)

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier Sophie Brasselet et Matthieu Piel d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse, et d'avoir contribué à l'amélioration de mon manuscrit. Je remercie également Monique Dontenwill, Christophe Le Clainche, Martin Oheim et Christine Terry d'avoir accepté de participer à mon jury malgré les difficultés générées par la grève de la SNCF.

Depuis mon entrée au L2n, j'ai rencontré de nombreuses personnes exceptionnelles qui m'ont soutenues et aidées durant mes trois années de thèse. Ainsi, j'aimerais les remercier toutes comme il se doit, en commençant par celles de mon laboratoire d'accueil : je remercie Renaud Bachelot et Christophe Couteau, les directeurs du Laboratoire Lumière, nanomatériaux et nanotechnologies – L2n. Merci de m'avoir accueillie au sein du laboratoire durant ma thèse et de travailler dans de très bonnes conditions.

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse Rodolphe Jaffiol pour son encadrement, sa disponibilité et son immense aide. Ce fut un véritable plaisir de travailler avec lui et d'apprendre tellement de choses différentes. Merci de m'avoir accordé beaucoup de temps, d'être toujours disponible et d'avoir répondu à mes questions de « biologistes ». J'ai beaucoup apprécié ton côté pédagogique et tellement impressionné par ton savoir scientifique et culturel. Merci pour toutes les discussions qu'on a eues et tous tes conseils qui m'ont poussé à comprendre et intégrer le monde de la biophysique et de l'optique. Merci pour tes encouragements et ta passion pour la recherche qui m'ont motivé et poussé à faire pleins d'expériences. Merci pour tous ces moments passés en salle blanche, devant le microscope, où on était surexcité par nos petites cellules. Merci de m'avoir toujours donné un coup de main pour les grosses manips et les longs suivi de cellules. Merci pour ta patience pendant la partie instrumentation de ma thèse et surtout l'alignement du faisceau laser. J'ai eu vraiment beaucoup de chance de t'avoir comme directeur de thèse. Un grand merci pour ton aide, ton encouragement et ton soutien lors de la rédaction et des corrections de ce manuscrit. Et finalement, un dernier merci pour ton côté humain, de m'avoir invité à manger chez toi (avec Lila et mon père) et de m'avoir fait découvrir des plats français. Merci de toutes les discussions non scientifiques, de m'avoir instruit sur la culture et également l'histoire troyenne en particulier et française en général.

Je remercie également Delphine Ferry. Merci de m'avoir accueillie chaleureusement et de m'avoir invitée à manger et de me pousser à découvrir des plats que je ne connaissais pas ou bien n'osais pas essayer comme les escargots. Je te remercie pour m'avoir aidée avec enthousiasme et dynamisme pendant mon pot de thèse.

Je remercie tous les membres du laboratoire L2n qui ont contribué au bon déroulement de ce travail. Je vais commencer par Cyrille Vézy, un grand merci pour ton encouragement et ton aide avec le logiciel Igor et toutes les procédures que tu as développé pour mon travail. Je

vais toujours me souvenir de tous ces moments passés ensemble quand on parlait en conférence tous les deux avec Rodolphe, et surtout de tous les très bons restaurants que tu choisissais, c'était un régal. Ensuite un grand merci pour les ingénieurs du laboratoire Régis Deturche, Jérémie Béal et Serguei Kochtcheev et qui étaient présent pour m'aider et résoudre les problèmes techniques en salle blanche. Un grand merci à Régis, pour ta bonne humeur (tu m'as toujours fait rire et remonter le moral en salle blanche) et pour le logiciel que tu as développé qui m'a permis de faire tout mon travail de thèse. Un grand merci à Xavier Gassmann pour ta disponibilité et de ton aide pour préparer les TPs de chimie. Un grand merci à Anna et à nos petites discussions russes.

Un grand merci à tous mes amis doctorants et post-doctorants pour l'excellente ambiance pendant ces années de thèse. Merci à mes collègues de bureau, Ali, Ermelinda et Borui, pour votre bonne humeur et vos encouragements. Un grand merci à mes « coffee addicts », Lila et Avrilita, à toutes ces soirées de discuter de tout et de rien et à tous ces moments précieux partagés ensemble et surtout les Fiestas. Merci de m'avoir écoutée, encouragée et motivée, je ne pourrais pas imaginer survivre Troyes sans mes Mamacitas. Merci à mes amis Lasmissiens, en particulier Jérémy, Peishan et Quentin, de toutes ces soirées passées ensemble. Merci à Yann et à nos soirées passées au Berthom, à discuter et se plaindre de la vie du doctorant. Merci à Lisa qui m'a beaucoup aidée pendant mon séjour à Strasbourg et m'a accueillie très chaleureusement. Merci à Vanessa, malgré la distance qui nous sépare, les courts appels (3h de discussion) m'ont beaucoup aidé et relevé mon moral. Merci à mes amis libanais qui font plutôt partie de ma famille. Merci à mon trio, Isso, Julie et Racha, à tous ces petits-déjeuners gourmands et tous les moments partagés ensemble en essayant de garder les yeux ouverts pendant « unlock » (Ah Julie !!!). Merci à Zahra, Bara2a et Nazha pour leur immense soutien et leur accueil très chaleureux. Merci à Mello de partager ma passion pour Sherlock Holmes et les escape games. Merci à Jaber pour notre amour partagé pour le café et à toutes ces aventures vécues à Troyes, en particulier la journée passée au Lac d'orient. Merci Abbas et Hassan pour toutes les promenades à Troyes et votre soutien et votre aide surtout pour le pot de thèse. Merci à Abed, Alia, Amir, Daniel, Dona, Fadel, Hala, Hawraa, Hassoun, Hussein, Jenny, Lina, Mackrine, Marie, Melissa, Nour, Oussama, Roula, Samer, Sania, Sobhi, Zeinab...tout simplement d'être là, de m'encourager et de partager mes quotidiens.

Je n'oublie évidemment pas ma famille, mes parents et mes frères. Merci d'avoir cru en moi et merci pour le soutien moral et ces instants Skype passés à rigoler, discuter et se plaindre (surtout moi). Un grand merci à mon père, d'être venu à Troyes malgré toutes les difficultés. Merci de m'avoir supporté la semaine de ma présentation orale et de tous les encouragements. Merci à Hiba pour tes appels, ton soutien et tes petits piques. Merci à Zanzoun et nano pour simplement d'être là pour moi.

Je remercie également le personnel de l'école doctorale le directeur Khemais Saanouni, Mme Pascale Denis, Mme Thérèse Kazarian et Mme Isabelle Leclercq pour leur aide tout au long de mon séjour à l'UTT avec tous les papiers administratifs.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	1
TABLE DES MATIÈRES.....	3
LISTE DES ABRÉVIATIONS	7
INTRODUCTION.....	11
1. ADHÉRENCE ET MIGRATION CELLULAIRE	13
1.1 Introduction.....	13
1.2 Principaux acteurs de l'adhérence cellulaire.....	14
1.2.1 Matrice extracellulaire	14
1.2.2 Intégrines.....	16
1.2.3 Cytosquelette d'actine et migration cellulaire	21
1.2.4 Autres facteurs qui influencent l'adhérence	26
1.2.5 Spécificité et non-spécificité.....	30
1.3 Méthodes d'étude et de mesure de l'adhérence cellulaire	31
1.3.1 Mesure d'ensemble.....	32
1.3.2 Mesure à l'échelle de la cellule unique	33
1.3.3 Mesure de force à l'échelle subcellulaire	35
1.3.4 Conclusion	36
2. FLUORESCENCE ET RÉFLEXION TOTALE INTERNE.....	38
2.1 Principe de la fluorescence	38
2.1.1 Diagramme de Jablonski	38
2.1.2 Propriétés des fluorophores	40
2.2 Marquage fluorescent en biologie cellulaire.....	41
2.2.1 Marquage direct.....	42
2.2.2 Immunomarquage.....	42
2.2.3 Protéines fluorescentes génétiquement modifiées	43
2.3 Microscopie de fluorescence grand champ (épi-fluorescence).....	44
2.3.1 Principe	44
2.3.2 Résolution en microscopie de fluorescence standard	46
2.3.3 Super-résolution	47
2.4 Microscopie de fluorescence par réflexion totale interne.....	49
2.4.1 Introduction.....	49
2.4.2 Principe de la microscopie TIRF	49
2.4.3 TIRF : Cadre théorique.....	50
2.4.4 Configuration sans prisme vs avec prisme	54
3. DISPOSITIF EXPERIMENTAL VA-TIRFM.....	58

3.1 Principe du va-TIRFM.....	58
3.1.1 Introduction.....	58
3.1.2 Contraste en microscopie TIRF.....	60
3.1.3 va-TIRFM : exemple d'images et de traitement de données	64
3.2 Caractérisation du montage expérimental à 2 λ	66
3.2.1 Description physique du système.....	66
3.2.2 Caractéristiques de la voie d'excitation	70
3.2.3 Porte-échantillon	74
3.3 Calibration de l'angle d'incidence.....	74
3.3.1 Echantillon de calibration	75
3.3.2 Caractérisation de l'angle d'incidence θ	77
3.3.3 Facteur de correction	81
3.3.4 Vérification du zéro ($h = 0$)	82
3.3.5 Conclusion	83
4. EVALUATION DE L'ADHERENCE DE CELLULES	
INDIVIDUELLES PAR VA-TIRFM.....	84
4.1 Introduction.....	84
4.2 Matériels et méthodes	85
4.2.1 Choix du modèle cellulaire : lignée U-87 MG	85
4.2.2 Culture cellulaire	86
4.2.3 Préparation des échantillons	86
4.2.4 Test de migration des cellules.....	91
4.3 Origines biologiques des contacts proches	92
4.3.1 Notions de contacts « proches » et « distants »	92
4.3.2 Définition des différents paramètres de seuillage.....	93
4.3.3 Origine de n_{eff}	94
4.3.4 Origine des contacts proches	97
4.4 Energie d'adhérence	101
4.5 Mise en évidence de la surexpression de $\alpha 5$ par va-TIRFM.....	102
4.5.1 Approche expérimentale.....	102
4.5.2 Résultats et discussion	103
4.6 Conclusion	108
5. ETUDE DU RÔLE DE DIFFERENTS ACTEURS DE	
L'ADHERENCE.....	109
5.1 Introduction.....	109
5.2 Effet des antagonistes d'intégrines sur l'adhérence	110
5.2.1 Impacts sur la morphologie	110
5.2.2 Effets sur la hauteur membrane/substrat	112
5.2.3 Effets sur les contacts proches et distants	113
5.2.4 Effets sur l'énergie d'adhérence	115
5.2.5 Discussion et conclusion	116
5.3 Effet des inhibiteurs d'Arp2/3 et des ROCK sur l'adhérence.....	119

5.3.1 Impacts sur la morphologie	119
5.3.2 Effets sur la hauteur membrane/substrat	120
5.3.3 Effets sur les contacts proches et distants	121
5.3.4 Effets sur l'énergie d'adhérence	122
5.3.5 Discussion et conclusion	123
CONCLUSION	125
ANNEXES	128
RÉFÉRENCES.....	130

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A

ABP	Actin Binding Protein
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADP	Adénosine Diphosphate
AFM	Atomic Force Microscopy
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ARP2/3	Actin Related Proteins 2 and 3
ATP	Adénosine Triphosphate

B

BFP	Back Focal Plane
BSA	Bovine Serum Albumin

C

CAM	Cell Adhesion Molecules
CapZ	F-actin Capping Protein within the Z-disc
CC	Close Contact
CCD	Charge Coupled Device
Cdc42	Cell division cycle 42
CD43	Cluster de Différenciation 43
CD44	Cluster de Différenciation 44
CdSe/ZnS	cœur de Cadmium-Sélénium et coquille de Zinc-Soufre
CHO	Chinese Hamster Ovary cells
CK666	2-Fluoro-N-[2-(2-methyl-1H-indol-3-yl)ethyl]benzamide
CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductor
COO ⁻	Groupe carboxylate

D

DC	Distant Contact
DIC	Differential Interference Contrast microscopy,
DiO	3,3'-Diocadecyloxycarbocyanine perchlorate
DM	Dichroic Mirror
DMEM ^{gfp-2}	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dSTORM	Direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy

E

EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein

EMEM Eagle's Minimum Essential Medium
Ena/VASP Enabled/Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein
F

FA Focal Adhesion
F-actine Filamenteuse-actine
FAK Focal Adhesion Kinase
FN Fibronectine
FRAP Fluorescence Recovery After Photobleaching,

G

G-actine Globulaire-actine
GAGs Glycosaminoglycanes
GFP Green Fluorescent Protein
GTPases Guanosine Triphosphatases

H

HEPES 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HT1080 Human fibrosarcoma cell lines

I

iPALM interferometric PhotoActivated Localization Microscopy

L

LED Light-Emitting Diode
LFA-1 Lymphocyte Function-Associated antigen 1
LR Ligand-Récepteur

M

MAPK Mitogen-Activated Protein Kinases
MDCK II Madin-Darby Canine Kidney II
MEB Microscopie Electronique à Balayage
MEC Matrice ExtraCellulaire
MEF Mouse Embryonic Fibroblasts
Mg²⁺ Magnésium ²⁺
MIET Metal-Induced Energy Transfer
MM Masse Molaire
M_R Miroir Rotatif

N

NPFs Nucleation Promoting Factors

O

ON Ouverture Numérique

P

PALM Photoactivated Localization Microscopy
PBS Phosphate-Buffered Saline
PDMS Polydimethylsiloxane
PEG Polyéthylène Glycol
PFA Points Focaux d'Adhérence
PLL-g-PEG Poly-L-lysine-grafted-PEG
Polar-dSTORM Polarization-resolved direct STORM
PMMA Poly(methyl methacrylate)
Pol-s Polarisation perpendiculaire (de l'allemand senkrecht)
Pol-p Polarisation parallèle (de l'allemand parallel) au plan d'incidence
PSF Point Spread Function

Q

QDs Quantum Dots

R

Rac Ras-related C3 botulinum toxin substrate
Ras Rat Sarcoma viral oncogene homolog
REF52 Rat Embryonic Fibroblast 52
RGD Arginine-Glycine-Aspartate
Rho Ras homolog gene family
RICM Reflection Interference Contrast Microscopy
ROCK Rho-associated protein Kinase

S

SAF Supercritical Angle Fluorescence
SCAMA Single Cell Adhesion Measuring Apparatus
SCFS Single Cell Force Spectroscopy
shRNA Short hairpin Ribonucleic Acid
SIM Structured Illumination Microscopy
SO₃⁻ Groupement Sulfonate
STED Stimulated Emission Depletion
STORM Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
SVF Sérum de Veau Fœtal

T

TE Transverse Electrique
TEM Transmission Electron Microscopy
TEM_{10,01,11} Transverse Mode pattern in a laser
TFM Traction Force Microscopy

TIRFM	Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy
TM	Transverse Magnétique
U	
U-87 MG	Uppsala-87 Malignant Glioma
UAF	Undercritical Angle Fluorescence
V	
va-TIRFM	variable angle Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy
Y	
Y-27632	trans-4-[(1R)-1-Aminoethyl]-N-4-pyridinylcyclohexanecarboxamide dihydrochloride

INTRODUCTION

La microscopie et l'imagerie cellulaires ont beaucoup évolué ces vingt dernières années, offrant désormais à la communauté un nombre varié de techniques qui s'affranchissent de la limite de diffraction. Un grand nombre d'entre elles nécessitent cependant de fixer les cellules. Or, les avantages et les besoins d'une étude dynamique de processus cellulaires sont reconnus depuis longtemps. La capacité d'obtenir des mesures en temps réel et d'examiner les données de systèmes *in vivo* a conduit les utilisateurs à se limiter à un petit nombre de techniques, celles permettant l'imagerie de cellules vivantes. Les organismes et les types cellulaires utilisés, ainsi que les questions soulevées sont très nombreuses. La microscopie optique moderne a évolué et a fourni dorénavant différentes techniques d'imagerie quantitative afin de répondre à ces questions. Ce progrès a été particulièrement utile et appliqué dans l'étude de l'adhérence et de la migration des cellules. Les adhérences focales médiées par les intégrines sont des structures macromoléculaires associées à la membrane plasmique et qui lient la matrice extracellulaire au cytosquelette [1–3]. Elles jouent un rôle important dans différents processus cellulaires. Ces adhérences sont très dynamiques, elles modifient constamment leur forme, leur taille ainsi que leur composition biochimique. Les adhérences focales sont également les principaux intermédiaires pour relayer les informations physiques entre la cellule et son microenvironnement. L'étude de ces adhérences focales est un des éléments clés pour comprendre comment une cellule prolifère, se différencie et migre. Toutes ces caractéristiques font des adhérences focales une problématique de recherche de premier plan à l'interface entre la biologie et les nanotechnologies.

La proximité des adhérences focales du substrat rend ces structures idéales pour des observations en microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRFM). Cette réflexion totale interne se traduit par l'apparition d'un champ électromagnétique, évanescent, ayant une faible profondeur de pénétration dans l'échantillon. Ces caractéristiques permettent d'obtenir des images de fluorescence bien contrastées, avec un très bon rapport signal/bruit. La microscopie TIRF permet de détecter le signal émis par les molécules fluorescentes du côté ventral des cellules, à proximité du substrat. Dans cette perspective, elle constitue un outil pertinent pour observer la membrane plasmique des cellules vivantes. L'équipe "NanoBioPhotonique" dans laquelle j'ai réalisé ma thèse a développé ces dernières années une technique qui permet de reconstruire la topographie de la membrane plasmique à partir d'une série d'images TIRF. On parle alors de microscopie va-TIRFM, pour variable-angle Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. Elle offre la possibilité de quantifier la distance entre la cellule et le substrat avec une résolution axiale de 10 à 20 nm [4,5].

Ce travail de thèse avait pour objectif de développer une nouvelle version du dispositif va-TIRFM à deux longueurs d'onde, afin de mieux comprendre les mécanismes associés à l'adhérence cellulaire. Ce manuscrit s'organise en cinq chapitres. Les deux premiers chapitres constituent une synthèse bibliographique introduisant l'adhérence et la migration cellulaires. Ils seront suivis par un chapitre dédié à l'instrumentation optique et la procédure de calibration

de l'angle d'incidence en TIRFM. Les deux derniers chapitres seront plutôt consacrés à l'étude expérimentale du processus d'adhérence et de migration cellulaires. Dans le premier chapitre, je vais présenter les principaux acteurs (très étudiés), ainsi que d'autres composants intervenants d'une façon directe ou indirecte dans l'adhérence et la migration cellulaires. Je vais détailler d'une part, le rôle des interactions spécifiques médiées par des couples bien définis ligand-récepteur, et d'autre part, les interactions non-spécifiques qui ne font pas intervenir de reconnaissances protéiques. Pour finir, je vais présenter les différentes techniques qui ont été développées pour étudier l'adhérence d'un groupe de cellules, de cellules individuelles et à l'échelle subcellulaire. Dans le deuxième chapitre, je vais présenter le principe de la microscopie de fluorescence, les propriétés des fluorophores et les différents outils de marquage utilisés en biologie cellulaire. Je vais introduire par la suite, le principe de la microscopie de fluorescence par réflexion totale interne d'un point de vue théorique. Dans le troisième chapitre, je vais détailler le dispositif expérimental va-TIRF que j'ai construit, d'un point de vue théorique et instrumental, suivie de la procédure de calibration pour déterminer l'angle d'incidence du faisceau laser sur la surface de l'échantillon. Le chapitre 4 sera consacré à la méthodologie expérimentale et à l'exploitation des données en va-TIRF. Je vais présenter les différents paramètres qu'on peut obtenir en va-TIRF après l'étude de l'adhérence de cellules gliales, sur-exprimant et sous-exprimant les intégrines $\alpha 5 \beta 1$, récepteurs de la fibronectine. Dans le dernier chapitre je présenterai l'effet d'une part, des antagonistes d'intégrines et d'autre part, des perturbateurs du cytosquelette d'actine sur l'adhérence de cellules vivantes, suivie d'une discussion sur les interactions spécifiques et non-spécifiques et les différentes forces mises en jeu. Dans ces deux derniers chapitres, je vais montrer les possibilités offertes par notre technique pour mieux comprendre et caractériser l'adhérence cellulaire.

1. ADHÉRENCE ET MIGRATION CELLULAIRE

1.1 Introduction¹

L'adhérence cellulaire est une caractéristique essentielle de la vie des métazoaires. La nécessité qu'ont les cellules d'adhérer les unes avec les autres et à la matrice extracellulaire (MEC) qui les entoure, est fondamentale à la formation et au maintien des tissus. En effet, elle est associée aux phénomènes de prolifération, de différenciation cellulaire, et joue un rôle important dans la biogenèse et le développement. Les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire sont essentielles pour le maintien de la cohésion tissulaire et des fonctions cellulaires. En cas de perturbation ou de perte de l'adhérence cellulaire à la matrice extracellulaire, la plupart des types cellulaires ne sont même pas capables de survivre, les cellules se détachent et entrent dans un programme de mort cellulaire suicidaire appelé *anoïkose*. L'anoïkose - du grec qui signifie « sans-abris » - est une mort par défaut de contact. Elle est fondamentale étant donné qu'une résistance à l'anoïkose ne conduit pas seulement à une perturbation de l'homéostasie cellulaire, mais est également un marqueur de la transformation cancéreuse. Les cellules peuvent alors acquérir un pouvoir invasif, se disséminant dans le corps sans être ancrées à la MEC. L'adhérence participe également à la transduction du signal, en particulier des signaux de survie, de division et de migration. Au cours de la migration cellulaire les récepteurs cellule-matrice responsables de l'adhérence, guident les forces générées par le cytosquelette. Ces dernières conduisent au déplacement des cellules. Les domaines de l'adhérence cellulaire et de la migration cellulaire sont donc étroitement liés. Et depuis qu'Abercrombie en 1980 a établi le paradigme de la migration cellulaire « protrusion, adhérence et contraction » [6], beaucoup de travaux ont permis de mieux comprendre les principes moléculaires et mécaniques du processus d'adhérence et de migration cellulaire. Bien que les contacts d'adhérence puissent déterminer où une cellule peut se

¹ Ce chapitre est basé en majorité sur les informations contenues dans l'ouvrage « *Molecular Biology of the cell* » de B. Alberts et al [7].

déplacer, il existe un ensemble de facteurs qui régulent le trafic cellulaire - un sujet qui reste relativement mal compris, notamment en biophysique.

1.2 Principaux acteurs de l'adhérence cellulaire

1.2.1 Matrice extracellulaire

Les cellules doivent être cohérentes pour former une structure multicellulaire, organisée et capable de résister aux diverses forces externes. Elles peuvent être liées les unes aux autres par des interactions directes ou peuvent être maintenues ensemble au sein de la matrice extracellulaire. La MEC est un réseau complexe composé de cellules, de protéines et de chaînes de polysaccharidiques sécrétées par les cellules elles-mêmes (Figure 1.1). La variation de la composition biochimique et la structure de la MEC, détermine la manière dont les cellules se déplacent dans l'organisme et contrôle l'orientation ainsi que le comportement du cytosquelette des cellules, leur permettant de détecter les modifications apportées aux caractéristiques mécaniques de leur environnement, et de réagir à ces modifications.

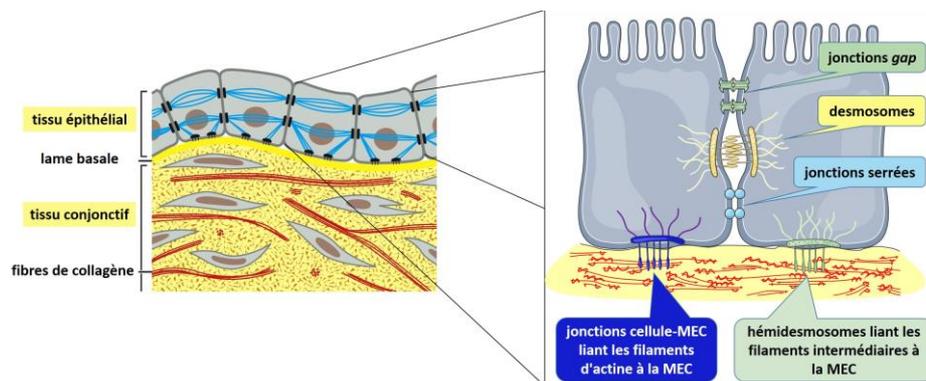


Figure 1.1 : Adhérence cellulaire. Dans un tissu épithélial on trouve les jonctions cellule-cellule, alors que dans un tissu conjonctif c'est principalement les interactions cellule-matrice qui prédominent (adaptée de la référence [7]).

Les protéines et les différents polysaccharides qui composent la matrice extracellulaire forment un réseau organisé. Ces constituants sont identiques dans tous les tissus animaux. Cependant leur composition et leur organisation varient d'un tissu à l'autre créant ainsi une diversité étonnante. La matrice extracellulaire est construite à partir de quatre grandes classes de macromolécules : (1) les glycosaminoglycanes (GAGs), ce sont de volumineux polysaccharides fortement chargés qui fournissent une résistance aux tissus, et qui sont liés très souvent de manière covalente à une protéine sous forme de protéoglycanes ; (2) les protéines fibreuses qui appartiennent principalement à la famille du collagène et sont responsables de l'élasticité des tissus ; (3) une large classe de glycoprotéines « non collagènes » parmi lesquelles on trouve la fibronectine qui est la plus étudiée ; (4) et enfin d'autres protéines associées comme les facteurs de croissance, les chimiokines et les enzymes [8].

Les glycosaminoglycanes sont des chaînes polysaccharidiques non ramifiées composées d'un enchaînement d'unités disaccharidiques. Elles sont rigides et fortement hydrophiles, en

conséquence elles ont tendance à adopter des conformations étendues qui occupent la majeure partie de l'espace extracellulaire. L'un des deux sucres du disaccharide récurrent est un glucide aminé (N-acétylglucosamine ou N-acétylgalactosamine) qui est régulièrement sulfaté, alors que l'autre sucre est souvent un acide uronique, ce qui donne aux GAGs une forte électronégativité. Leur forte densité de charges négatives attire un nuage de cations, entraînant l'aspiration de grandes quantités d'eau dans la MEC. Cela crée une pression de turgescence, qui permet à la matrice de résister aux forces de compression. Les GAGs se répartissent en quatre types principaux : l'acide hyaluronique, la chondroïtine sulfate, l'héparane sulfate et la kératane sulfate. Elles sont liées de façon covalente à une protéine pour former des protéoglycanes (à l'exception de l'acide hyaluronique). Elles jouent un rôle important dans l'adhérence cellule-matrice. Elles modulent l'activité de l'intégrine en interagissant avec la fibronectine, avec les protéines du cytosquelette et celles de la signalisation intracellulaire [9].

Les collagènes sont des protéines fibreuses secrétées en grande quantité dans le tissu conjonctif. En tant que composant majeur de la peau et des os, les collagènes sont les protéines les plus abondantes chez les mammifères, où elles constituent 30% de la masse protéique totale. La principale caractéristique d'une molécule de collagène est sa longue structure rigide, en forme d'hélice à trois brins, dans laquelle trois chaînes α polypeptidiques de collagène sont enroulées les unes sur les autres dans une superhélice en forme de corde. Ces superhélices s'auto-assemblent et forment des structures stables qui contribuent à l'architecture et aux propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire [10].

La fibronectine est une glycoprotéine d'environ 500 kDa qu'on trouve chez tous les vertébrés. C'est un dimère composé de deux sous-unités reliées par deux ponts disulfures à leur extrémité C-terminale. Chaque sous-unité a une longueur d'environ 2500 acides aminés et contient une série de petits domaines répétitifs de type I, II et III qui sont repliés en modules globulaires. Le principal domaine de répétition de la fibronectine est de type III (FN III), il a une longueur d'environ 90 acides aminés et apparaît au moins 15 fois dans chaque sous-unité. Ce module contient la séquence RGD (Arginine-Glycine-Aspartate) qui reconnaît les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ (Figure 1.2) [11].

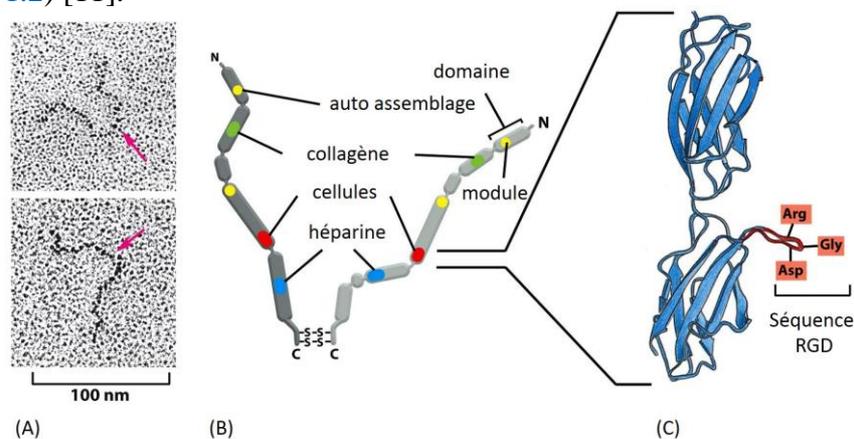


Figure 1.2 : Structure du dimère de fibronectine. (A) Images obtenues en microscopie électronique des sous-unités individuelles de la fibronectine. (B) Les deux chaînes polypeptidiques sont similaires mais non identiques (épissage alternatif des ARNm), et ont des domaines de liaison à des molécules particulières. (C) Structure 3D du module répétitif FN III, déterminé par diffraction des rayons X (extrait de la référence [7]).

Cette séquence observée dans plusieurs protéines matricielles, peut être synthétisée pour mimer la reconnaissance cellule-MEC [12]. La fibronectine est largement utilisée pour l'étude de l'adhérence pour deux raisons essentielles. D'une part, elle pousse les cellules à adhérer quand elle est présente sur une surface. D'autre part, lorsqu'elle est diluée en solution, elle joue le rôle d'un agoniste c'est-à-dire qu'elle rentre en compétition avec les protéines matricielles et peut inhiber l'adhérence.

Les protéines associées à la matrice sont des enzymes et des facteurs de croissance. Ils jouent un rôle indirect dans l'organisation de la matrice. D'un côté, les enzymes ont un rôle structurant car elles dégradent la MEC, permettant ainsi aux cellules de se déplacer librement au sein de la matrice. Cette dégradation permet également la libération des facteurs de croissance séquestrés dans la matrice. Les enzymes peuvent aussi cliver les protéines, les activer et ainsi participer à la réorganisation du réseau matriciel. D'autre part, les facteurs de croissance ont un rôle plutôt fonctionnel et stimulent la prolifération et la différenciation cellulaire [13]. Ils sont sécrétés à l'extérieure des cellules et se lient aux collagènes, aux glycoprotéines et à d'autres composants de la MEC. L'ensemble de ces protéines participe à la formation du réseau matriciel et donc maintiennent une homéostasie structurale et fonctionnelle des tissus.

1.2.2 Intégrines

Les cellules secrètent leur propre matrice, la réorganisent et peuvent même la dégrader par le biais des enzymes. Mais la MEC peut également modifier l'état des cellules, principalement par le biais de protéines transmembranaires qui agissent en tant que récepteurs matriciels tels que les protéines d'adhérence cellulaire (Cell Adhesion Molecules, CAM). Ces protéines relient la MEC au cytosquelette en recrutant au niveau intracellulaire des complexes multiprotéiques qui assurent les jonctions cellule-matrice et cellule-cellule. Mais leur rôle va bien au-delà du simple ancrage mécanique. Elles jouent également un rôle fonctionnel et peuvent affecter presque tous les aspects du comportement cellulaire. Les CAM sont divisées en 5 grandes familles : la superfamille des immunoglobulines, les cadhérines, les sélectines, les intégrines et les mucines. Les principaux récepteurs de la liaison cellule-MEC sont les intégrines. Elles ont une capacité remarquable de transmettre des signaux dans les deux sens à travers la membrane plasmique : de l'extérieur de la cellule à l'intérieur pour enclencher une voie de signalisation, et de l'intérieur vers l'extérieur pour moduler la liaison à la MEC [14]. En plus, les intégrines peuvent non seulement servir à transmettre des signaux mécaniques et moléculaires, mais également à convertir un type de signal en un autre.

1.2.2.1 Classification et structure des intégrines

Les intégrines sont composées de deux sous-unités glycoprotéiques transmembranaires, associées de manière non covalente appelées α et β (Figure 1.3 (A)). Chez les mammifères on retrouve 18 sous-unités α et 8 sous-unités β qui se rassemblent en 24 hétéromères différents [1]. Les sous-unités α déterminent la spécificité de reconnaissance du ligand alors que les sous-unités β se lient au cytosquelette et interviennent dans de nombreuses voies de signalisation. Les différentes combinaisons des intégrines sont résumées dans la figure 1.3 (B) [11].

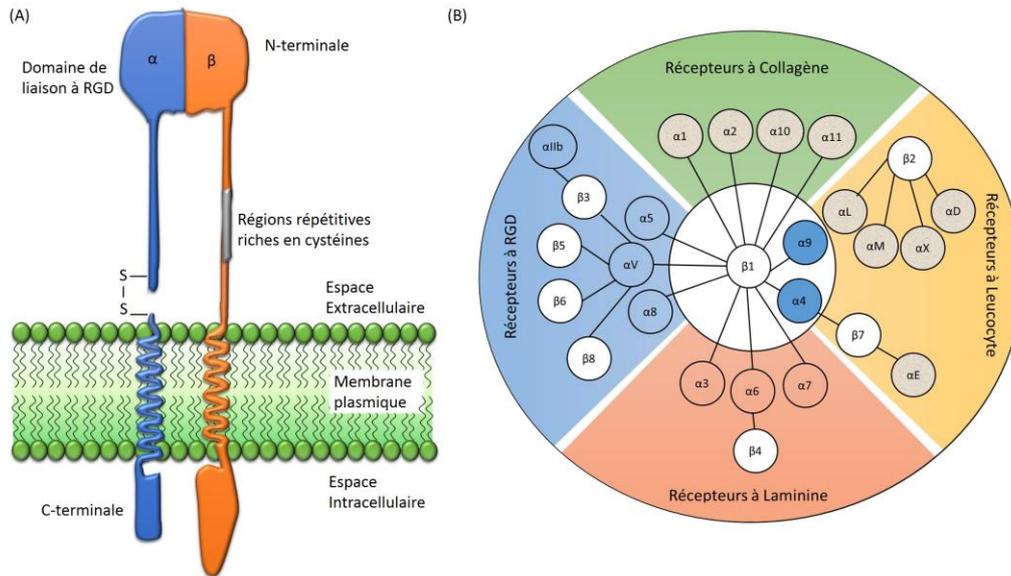


Figure 1.3 : Intégrines. (A) Structure des intégrines. (B) Différents hétérodimères d'intégrines et leurs ligands respectifs. Les 24 combinaisons possibles sont classées en 4 sous-parties : les intégrines récepteurs de la laminine (en rose), du collagène (en vert), reconnaissant les motifs RGD (en bleu) et spécifiques des leucocytes (en jaune). Quelques sous-unités sont restreintes aux Chordés tels que $\alpha 4$, $\alpha 9$, $\beta 2$ et $\beta 8$. Les sous-unités α (en gris) contiennent un domaine I/A (image 3B adaptée de la référence [1]).

1.2.2.2 Expression des intégrines et cellules tumorales

Le rôle des intégrines dans les cellules normales est étroitement lié à leurs taux d'expression ainsi que leurs cinétiques d'endocytose et de recyclage vers la membrane plasmique. Ces deux éléments sont fréquemment altérés dans les cellules cancéreuses, ce qui entraîne une modification du rapport normal des récepteurs entre la surface de la cellule et le pool endosomal. Ce changement d'organisation affecte l'activité des intégrines, qui à son tour va modifier la dynamique d'adhérence et de migration cellulaire et ainsi conférer aux cellules des propriétés oncogéniques invasives. Compte tenu de la complexité des intégrines et de leur rôle crucial dans la progression tumorale, elles représentent une cible intéressante pour le traitement du cancer [3,15].

1.2.2.3 Mode d'activation des intégrines

Les études en microscopie électronique ont montré que les domaines extracellulaires des intégrines peuvent adopter différentes conformations pour s'adapter à leurs ligands. C'est ainsi que la notion d'activation des intégrines a été introduite, afin d'indiquer le passage des intégrines d'une conformation inactive, de « basse affinité », à une conformation active, de « haute affinité » [1,3,11]. Les intégrines, en absence de stimulation, présentent du côté extracellulaire une structure courbée, la tête globulaire repliée vers la membrane. Généralement, dans cette configuration elles ne peuvent pas interagir avec les protéines de la MEC. Du côté intracellulaire, leurs queues cytoplasmiques sont accrochées ensemble, ce qui empêche leur interaction avec le cytosquelette, (Figure 1.4 (A)). Cette interaction n'est pas le résultat d'une liaison protéique mais plutôt des interactions de nature hydrophobe et/ou électrostatique. À l'état actif, les deux sous-unités sont décrochées du côté intracellulaire pour

exposer leurs sites de liaison aux protéines cytoplasmiques. Leurs domaines transmembranaires sont ainsi séparés et leurs domaines externes se déplient et s'étendent pour exposer un site de liaison de haute affinité aux protéines matricielles (Figures 1.4 (B) et (C)) [11]. Ainsi, le passage de l'état inactif à l'état actif est lié à un changement conformationnel qui expose simultanément les sites de liaison aux ligands externes et internes.

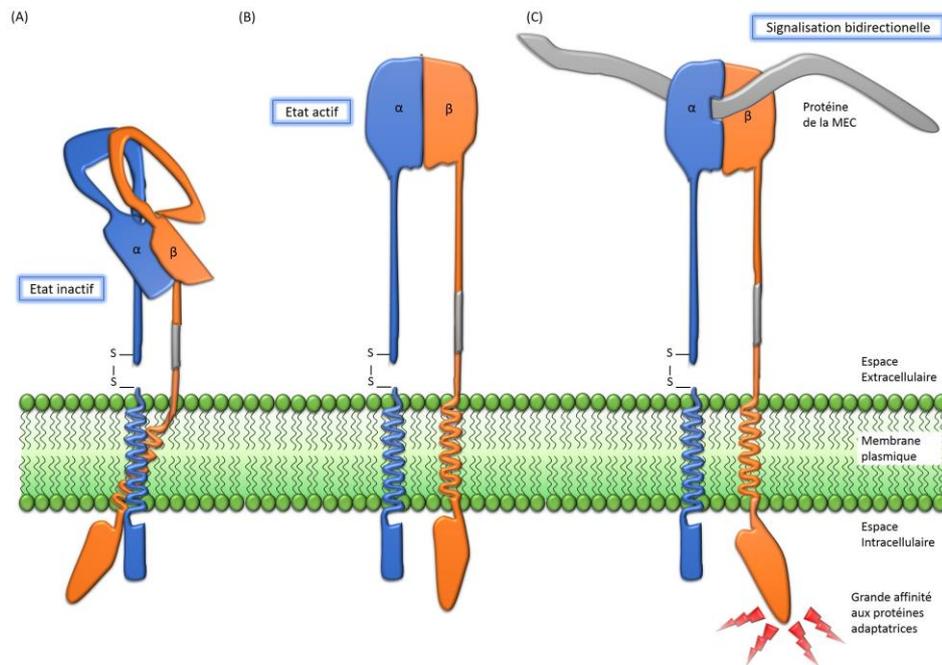


Figure 1.4 : Activation des intégrines. Les intégrines existent sous deux formes majeures : structures inactives (repliées (A)) dans laquelle les domaines transmembranaires et cytoplasmiques sont étroitement associés ; actives (étendues (B)) et actives prête à médier une signalisation extracellulaire ou intracellulaire (C). Ces structures ont été observées par microscopie électronique et par diffraction des rayons X.

L'activation des intégrines est modulée par divers mécanismes. Dans certains cas, l'activation se produit de l'extérieur vers l'intérieur « outside-in », où la liaison d'une protéine de la MEC, telle que la séquence RGD de la fibronectine, peut activer certaines intégrines (Figure 1.5). Par conséquent, des sites de liaison pour la taline et d'autres protéines adaptatrices cytoplasmiques sont exposés sur la queue de la chaîne β . La liaison de ces protéines adaptatrices conduit alors à la fixation de filaments d'actine à l'extrémité intracellulaire de la molécule d'intégrine. Ainsi, lorsque l'intégrine se lie à son ligand du côté extracellulaire, la cellule réagit en ancrant l'intégrine au cytosquelette, de sorte qu'une force puisse être appliquée en ce point-là. Cet enchainement d'événements peut également se produire dans l'autre sens, de l'intérieur vers l'extérieur « inside-out ». Ce dernier dépend souvent de signaux de régulation intracellulaires qui stimulent la capacité de la taline et d'autres protéines à interagir avec la chaîne β de l'intégrine (Figure 1.5). Ainsi, lorsque la taline se lie à la chaîne β , elle bloque la liaison intracellulaire α - β , permettant ainsi l'écartement des deux sous-unités de la molécule d'intégrine [1]. Quelque soit le sens de la signalisation transmise par les intégrines, elle sera toujours médiée par les mêmes interactions intracellulaires et extracellulaires et agira sur les mêmes processus biologiques tels que l'adhérence, la migration et la polarité cellulaires.

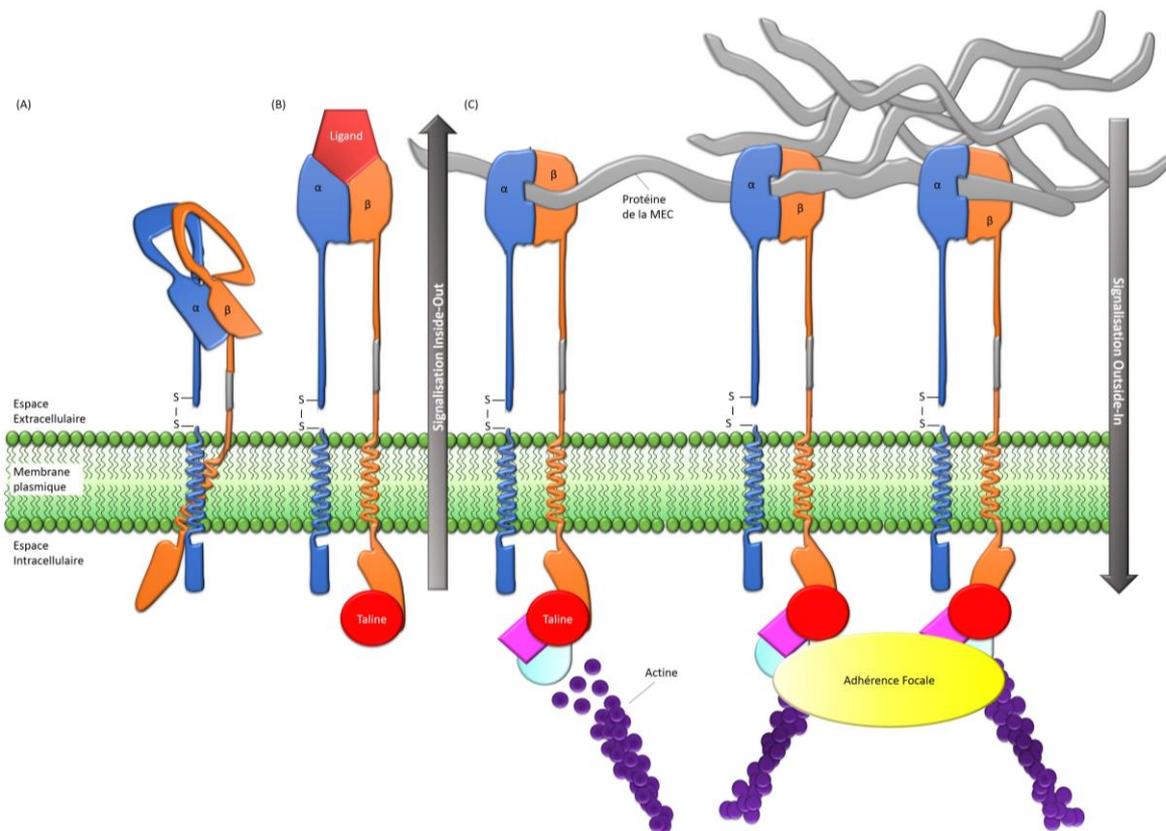


Figure 1.5 : Signalisation des intégrines. (A) Etat inactif des intégrines. (B) Des signaux intracellulaires vont conduire à la liaison taline/sous-unité β , entraînent une activation « inside-out » des intégrines, et permettant ainsi d’avoir une conformation prête à accepter un ligand. (C) La liaison d’une protéine matricielle et de la taline va conduire à la formation des contacts focaux et activer ainsi la signalisation « outside-in ». Les forces exercées par le cytosquelette d’actine d’une part, et par la MEC d’autre part, vont renforcer la liaison ligand-récepteur et permettre la formation d’adhérences focales stables et induire une cascade de signalisation intracellulaire.

La force d’adhérence d’une simple liaison intégrine-ligand a été mesurée à l’aide de la microscopie à force atomique (Atomic Force Microscopy, AFM). Elle est comprise entre 30 et 100 pN [16], avec une affinité de liaison relativement faible de l’ordre de la μM [17]. En comparaison, les récepteurs typiques membranaires se lient avec une affinité de l’ordre de la nM [18]. Ainsi, la signalisation médiée par les intégrines ne peut être établie qu’en présence d’un processus d’auto-organisation, qui passe par un phénomène d’agrégation « clustering » de nombreuses molécules d’intégrines. Ce processus conduit à la formation de structures d’adhérence.

1.2.2.4 Structure d’une plaque d’adhérence

Lorsque les intégrines se lient à des protéines matricielles, elles sont souvent rassemblées en une plaque dense, dans laquelle de nombreuses molécules d’intégrine sont ancrées aux filaments cytosquelettiques. La structure protéique résultante peut être remarquablement complexe, et initie une cascade de signalisations intracellulaires responsables, entre autres, de la prolifération et de la migration. Ces signalisations dépendent du recrutement de dizaines de protéines et requièrent une régulation dynamique de ces complexes multiprotéiques, qui se forment du côté cytoplasmique de l’intégrine, dans des sites spécifiques appelés contacts focaux

d'adhérence (Focal Adhesion, FA). Ces structures d'adhérence sont recrutées en fonction des propriétés moléculaires, structurales et mécaniques de l'environnement [14]. Ces points focaux d'adhérence (PFA) ont une architecture complexe (Figure 1.6). Les protéines structurales telles que la taline servent d'intermédiaire entre la partie cytoplasmique des intégrines et l'actine du cytosquelette. Des protéines adaptatrices comme la vinculine, l' α -actinine et la paxilline lient à la fois les protéines structurales et l'actine pour renforcer le point d'ancrage. Enfin les protéines de signalisation telles que la FAK ou les Rho GTPases possèdent des activités catalytiques permettant la polymérisation de l'actine et l'enclenchement des voies de signalisation. Comme nous allons le voir plus loin, les propriétés contractiles des microfilaments d'actine sont très importantes dans la régulation des contacts focaux.

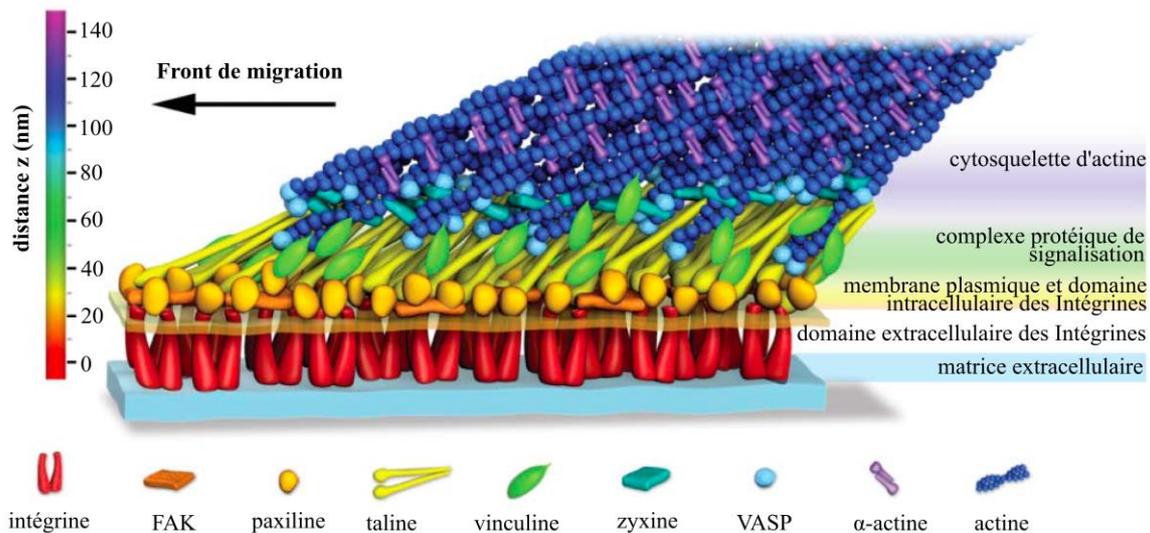


Figure 1.6 : Structure moléculaire d'un contact focal médié par les intégrines. *L'intégrine se lie directement à la fibronectine de son côté N-terminal alors que la queue intracellulaire C-terminale de la sous-unité β se lie aux protéines adaptatrices, comme la taline qui contient plusieurs domaines pour interagir avec l'actine et lier d'autres protéines, telles que la vinculine, qui aident à renforcer et à réguler le lien avec les filaments d'actine. (extrait de la référence [19]).*

La présence des différentes protéines au sein du contact dépend du type d'intégrines et de la maturation du contact focal. L'adhérence au bord des protrusions cellulaires est initiée par un ensemble de petites adhérences naissantes, de taille très proche de la limite de diffraction dans le visible (200-300 nm) [20]. Ce qui suggère que leur taille réelle peut être inférieure à la taille observée. Ces adhérences naissantes s'assemblent et sont stables au niveau d'un lamellipode à l'échelle de la minute. Au fur et à mesure que le front de migration avance, une sous-population d'adhérences naissantes se désassemble en quelques minutes et le reste croît et mûrit en complexes focaux ($\sim 0,5 \mu\text{m}$). Ces complexes vont ensuite s'allonger et se transformer en contacts focaux d'adhérence (FA) (1–5 μm) [21]. Après 10-20 minutes, ces FA se désassemblent dans le corps cellulaire, ou bien évoluent vers des adhérences fibrillaires stables, qui sont plutôt impliquées dans le remodelage de la MEC [22]. Cette dernière étape de maturation est due aux forces appliquées par le cytosquelette d'acto-myosine [23,24]. Ainsi, la maturation et le recyclage des plaques d'adhérence correspondent à une boucle morphologique dynamique. Elle implique le recrutement des protéines et l'élongation du contact focal, suivi de la dissociation des protéines et de la rétraction du contact. Les FA peuvent être détectés par

microscopie électronique ou optique, par exemple en RICM (Reflection Interference Contrast Microscopy), ou à l'aide d'un marquage fluorescent des protéines d'adhérences telles que la paxilline (Figure 1.7).

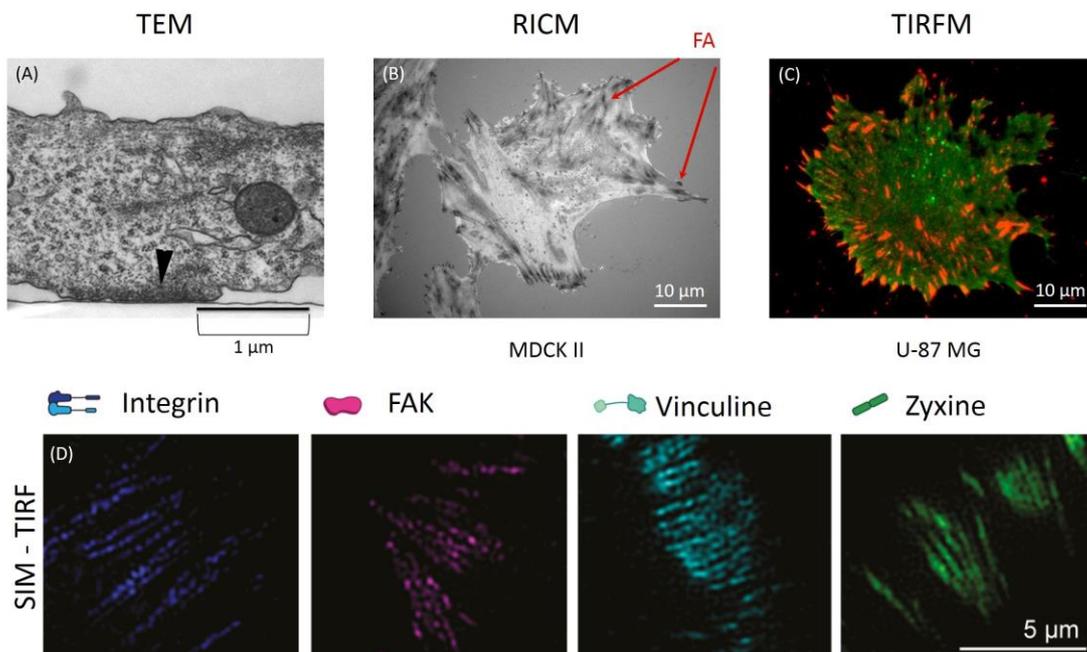


Figure 1.7 : Visualisation des adhérences focales médiées par les intégrines. (A) Images extraites de la référence [25], obtenues en microscopie électronique (Transmission Electron Microscopy, TEM) des cellules du cristallin du poulet, la flèche noire indique une adhérence cellule-MEC. (B) Images RICM de cellules MDCK II étalées sur une fine couche de fibronectine à 37°C et 5% de CO₂, illumination avec une LED à $\lambda \approx 630$ nm. En RICM plus la membrane est proche du substrat et/ou plus l'indice est élevé, plus le contraste sera sombre, ainsi les FA sont les régions les plus sombres. (C) Image d'immunofluorescence TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) : il s'agit d'une cellule U-87 MG fixée sur une surface recouverte de fibronectine. Le marquage de la membrane plasmique a été réalisé par la molécule lipophile fluorescente qui pénètre la membrane phospholipidique DiO (en vert). La visualisation des adhérences a été obtenue à l'aide d'un anticorps dirigé contre la paxilline (en rouge). (D) Images de l'intégrine $\beta 1$ -eGFP, FAK-GFP, vinculine-mCherry et zyxine-GFP obtenues par microscopie à illumination structurée couplée à la réflexion totale interne (SIM-TIRF). Les cellules REF52 transfectées pour exprimer les différentes protéines fluorescentes, sont incubées sur des micropatterns ronds de fibronectine de 50 μm de diamètre. Ces images révèlent que les protéines d'adhérence focale forment un ensemble de sous-unités linéaires et parallèles (extrait de la référence [26]).

1.2.3 Cytosquelette d'actine et migration cellulaire

Au cours de la migration, la cellule se polarise. Ce phénomène est dû à la présence de facteurs physiques et biochimiques tels qu'un gradient de chimiokines ou de facteurs de croissance, ou encore de rigidité de la MEC. Ainsi, l'avant et l'arrière de la cellule ont des rôles distincts et font intervenir des composants différents.

1.2.3.1 Étapes de la migration cellulaire

La migration cellulaire commence très généralement par la formation d'une *protrusion* initiale qui se caractérise par l'apparition d'une extension de la membrane plasmique à l'avant de la cellule (on parle de front de migration). Les cellules génèrent différents types de structures

protrusives, notamment des filopodes et des lamellipodes. Ces structures diffèrent principalement par la manière dont l'actine est organisée [27]. Les filopodes sont des structures fines, contenant de longs faisceaux parallèles non ramifiés de filaments d'actine. Ils sont observés au bord des lamellipodes dans des cellules en migration telles que les fibroblastes. Quant aux lamellipodes, ils forment de larges protrusions plates et enrichies d'un réseau ramifié de filaments d'actine [28].

Les lamellipodes sont responsables de la migration dirigée des cellules. Il a été montré par Euteneuer et Schliwa en 1984, que des fragments lamellaires des kératocytes (cellules à migration rapide), dépourvus de noyaux, de centrosomes, de microtubules et de la plupart des organites, conservent leur motilité directionnelle [29]. Au cours de cette étape de *protrusion*, (Figures 1.8 (A) et (B)), le noyau et la majorité du cytoplasme se trouvent à l'arrière de la cellule [30]. Ces protrusions sont créées par la polymérisation d'un réseau de filaments d'actine et sont stabilisées par la formation de complexes adhésifs. Ces complexes adhésifs sont des régions de la membrane plasmique où les récepteurs de l'intégrine, les filaments d'actine et les protéines associées se regroupent. À mesure que la cellule se déplace, les adhérences naissantes situées à l'avant de la cellule se développent et se renforcent pour former des complexes adhésifs plus grands et mieux organisés (contacts focaux d'adhérence). Ces contacts vont servir de point de traction sur lequel le corps de la cellule va se déplacer [21,22]. Ensuite, une force contractile produite par le biais de l'interaction entre les filaments d'actine ancrés aux sites d'adhérence et la myosine II, va permettre la contraction du corps cellulaire. Cette force va pousser l'intérieur de la cellule et le noyau en particulier, à se déplacer vers l'avant on parle alors de *contraction* et de *translocation* (Figures 1.8 (C) et (D)). Par suite les points d'ancrage devenus inutiles à l'arrière de la cellule se détachent, entraînant ainsi le corps cellulaire qui se rétracte de l'arrière vers l'avant.

Deux modèles ont été proposés pour expliquer le mouvement cellulaire. Le premier accorde un rôle prépondérant au cytosquelette : la polymérisation d'actine est nécessaire pour pousser le front de migration [31,32]. Les filaments d'actine situés au front de migration subissent un flux rétrograde « turn over » sur une échelle de temps de quelques dizaines de secondes, recyclant les sous-unités pour une polymérisation ultérieure [32,33]. Le second modèle met en avant le rôle de l'exocytose et l'endocytose. En effet une exocytose régulée pourrait apporter les composants membranaires nécessaires à l'extension des bords cellulaires. Elle pourrait aussi apporter des récepteurs indispensables au chimiotactisme et à l'attachement des cellules au substrat. En parallèle l'endocytose pourrait réguler localement les réponses de ces récepteurs en les internalisant [34,35].

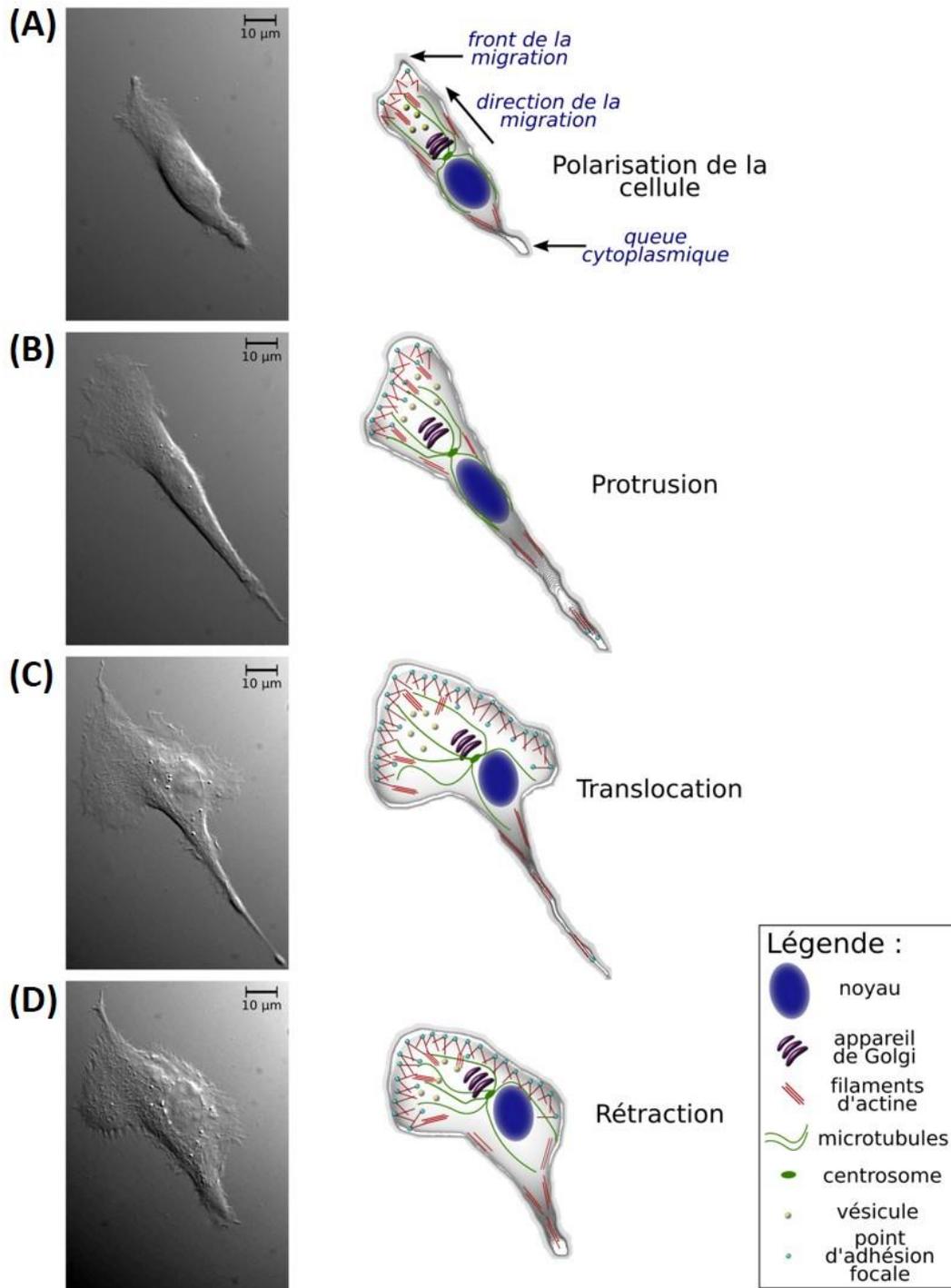


Figure 1.8 : Différentes étapes de la migration cellulaire orchestrées par le cytosquelette d'actine. La migration d'une cellule HT1080 a été enregistrée à 37°C, à l'aide d'un objectif de grandissement 60×, d'ouverture numérique 1.45, en microscopie à contraste interférentiel (Differential Interference Contrast Microscopy, DIC) (extrait de la référence [36]). Les images montrent l'évolution de la morphologie de la cellule au cours du temps : à t_0 et t_0+20mn , on trouve les différentes formes organisationnelles des filaments d'actine : un maillage de filaments d'actine diagonal dans le lamellipode, des faisceaux contractiles d'actine (fibre de stress) dans le corps cellulaire et un réseau d'actine en vrac dans toute la cellule. Dans les lamellipodes et les filopodes, les filaments d'actine sont tous polarisés dans une direction, leurs extrémités se polymérisant rapidement vers l'avant (pour pousser) (A, B). A t_0+50mn et t_0+60mn la contraction du corps cellulaire et la translocation du noyau sont guidées par les réseaux contractiles du cytosquelette d'acto-myosine (C, D).

1.2.3.2 Dynamique de la polymérisation d'actine

La migration cellulaire est guidée par la réorganisation et le renouvellement continu du cytosquelette d'actine. Deux propriétés des filaments d'actine sont exploitées par la cellule pour pouvoir se déplacer : la capacité de pousser par polymérisation et de se contracter en interagissant avec la myosine. L'actine peut prendre deux conformations dans le cytosquelette, une forme monomérique *globulaire* (*G-actine*) ou une forme *filamenteuse* (*F-actine*). La forme globulaire se présente comme un polypeptide de 375 acides aminés, étroitement associé à l'ATP ou l'ADP. Ces monomères peuvent s'associer pour former une double hélice serrée typique des filaments d'actine [37]. Au fur et à mesure que le filament se forme, la concentration en monomères libres diminue jusqu'à atteindre une concentration critique à partir de laquelle les monomères et les filaments sont à l'équilibre. Vu que les sous-unités d'un filament d'actine sont orientées, l'actine filamenteuse est polaire avec deux extrémités structurellement différentes : une extrémité négative, à croissance lente appelée *extrémité pointue* et une extrémité positive à croissance rapide nommée *extrémité barbue* (Figure 1.9 (A)). Cette nomenclature résulte des premières images observées par microscopie électronique [38]. Lorsque les têtes de myosine se lient le long du filament, ce dernier ressemble à une tête de flèche. Les monomères d'actine se lient à l'ATP avec une affinité supérieure à celle de l'ADP. Sachant que la concentration est plus élevée en ATP dans les cellules, l'actine non polymérisée est saturée en ATP. Ainsi, l'assemblage de l'actine G couplée à l'ATP est initié par *nucléation* et forme un noyau stable de trois monomères, qui servira de site de nucléation par ajout de monomères supplémentaires en présence de Mg^{2+} . Par suite l'ATP est hydrolysée en ADP, et induit une modification de la conformation du filament, donnant une forme moins stable à l'extrémité pointue qui pourra par la suite se dépolymériser (Figure 1.9 (B)). En conséquence le filament d'actine polymérise préférentiellement à son *extrémité barbue* et dépolymérise de l'*extrémité pointue*. Ce flux de sous-unités d'actine à travers le filament par assemblage et désassemblage est décrit comme un mécanisme de tapis roulant « *treadmiling* », et conduit à l'*élongation* du filament d'actine [28].

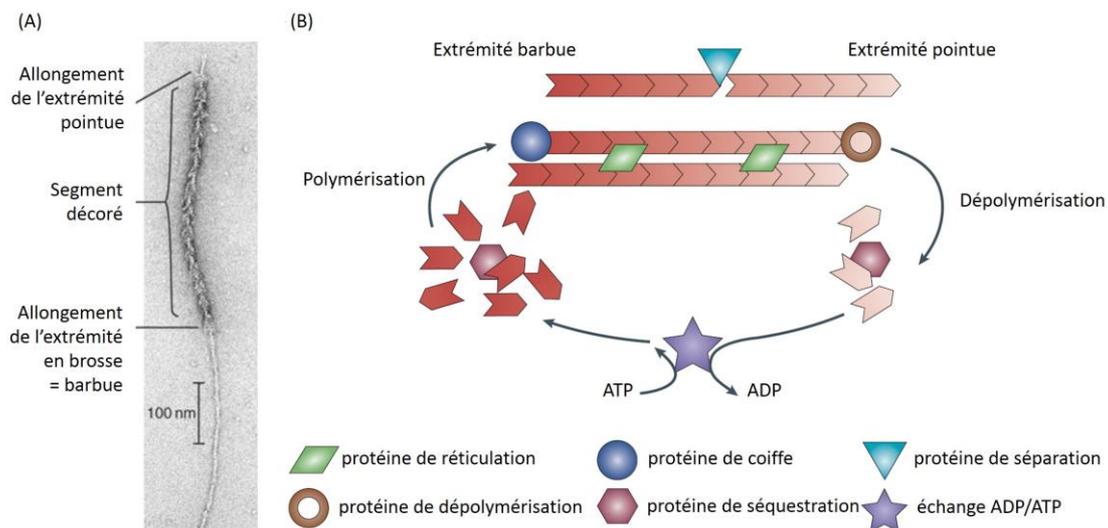


Figure 1.9 : Structure des filaments d'actine. (A) Images extraites de la référence [39], obtenues en microscopie électronique d'un filament d'actine décoré avec des têtes de myosines. (B) Phénomène cyclique de « *treadmilling* » de l'actine. Les sous-unités d'actine-ATP (en rouge) s'ajoutent aux extrémités barbues des filaments et sont sous contrôle de différentes protéines (extrait de la référence [28]).

1.2.3.3 Régulation de la polymérisation d'actine

De nombreuses protéines se lient à l'actine et influencent de façon dynamique son architecture. Ces protéines sont connues en tant que protéines interagissant avec l'actine (Actin Binding Protein, ABP). Ces protéines ont chacune des propriétés bien spécifiques. Certaines participent à l'initialisation de la polymérisation, tels que le complexe Arp2/3 qui favorise la formation du trimère d'actine en présence des NPFs (Nucleation Promoting Factors) pour ainsi former des filaments ramifiés d'actine [37]. D'autres se fixent aux monomères et régulent la polymérisation de l'actine G. Par exemple la profiline stimule la polymérisation au niveau de l'extrémité barbue en favorisant l'échange ADP/ATP, alors que la thymosine se fixe au complexe d'actine G-ATP, le séquestre, et ensuite inhibe la polymérisation [39]. D'autres protéines sont impliquées dans la stabilisation des microfilaments d'actine et la formation de faisceaux parallèles, comme l' α -actinine ou bien des réseaux tels que la filamine. Ces deux protéines jouent un rôle dans l'augmentation de la contractilité et de la viscosité du cytoplasme. On peut aussi trouver des protéines de coiffe « capping protein » qui bloquent les filaments en empêchant la polymérisation de l'actine-ATP tels que CapZ ou bien en évitant la dépolymérisation de l'actine-ADP tels que la tropomoduline. Enfin, il y a des protéines qui fragmentent les polymères d'actine, parmi elles on trouve la gelsoline, Ca^{2+} dépendante, qui se lie à l'actine, provoque un changement de conformation et crée une coupure du microfilament [28,39]. En résumé, les activités des différents facteurs d'assemblage d'actine sont contrôlées par une certaine compétition entre eux pour les monomères d'actine.

A part les ABPs, il existe une autre famille de protéines régulatrice de l'actine, c'est la famille Rho, membre de la superfamille des GTPases. Ces membres les mieux caractérisés sont Cdc42, Rac et Rho [40]. En injectant à une cellule différents mutants de l'un de ces composants, il a été montré que l'activation de Cdc42 déclenche la polymérisation de l'actine et la formation de filopodes (Figure 1.10 (B)) ; Rac favorise la polymérisation de l'actine à la périphérie de la cellule, conduisant à la formation des lamellipodes (Figure 1.10 (C)) ; alors que l'activation de Rho stimule à la fois la formation des filaments contractiles (dont les fibres de stress) et le regroupement d'intégrines et de protéines associées pour former des adhérences focales (Figure 1.10 (D)).

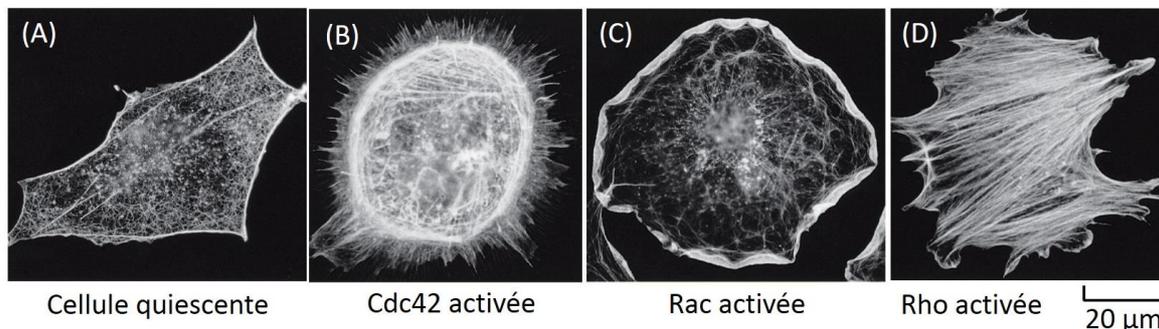


Figure 1.10 : Effets drastiques des Cdc42, Rac et Rho sur l'organisation de l'actine dans les fibroblastes fixés. Les filaments d'actine ont été marqués à la phalloïdine fluorescente. Les fibroblastes cultivés dans un milieu appauvri en sérum, possèdent de l'actine corticale et quelques fibres de stress (A). La microinjection d'une forme activée de Cdc42 provoque l'apparition de nombreux filopodes à la périphérie de la cellule (B). Rac provoque la formation de lamellipodia qui s'étendent sur toute la circonférence de la cellule (C). Rho provoque l'assemblage rapide de nombreuses fibres de stress (D). (extrait de la référence [40]).

Ces protéines ont un rôle bivalent important puisqu'elles n'affectent pas juste le remodelage du cytosquelette de l'actine, mais aussi activent en aval les voies de signalisation des MAP Kinases, induisant ainsi une variété de réponses cellulaires.

1.2.4 Autres facteurs qui influencent l'adhérence

Il existe d'autres composants intervenants d'une façon directe ou indirecte dans l'adhérence et la migration cellulaires. Par exemple, les ions Ca^{2+} vont activer certains récepteurs (tels que les CAM), afin de retarder leurs dégradations et ainsi favoriser l'adhérence et la cohésion tissulaire. La présence de certains récepteurs membranaires, tels que le CD44 qui interagit avec l'acide hyaluronique, favorise la migration et augmente le pouvoir invasif des cellules métastatiques [41]. D'autres facteurs peuvent aussi influencer l'adhérence comme la rigidité de la MEC, la présence de forces extérieures (étirement, compression et cisaillement), le confinement géométrique, le changement de densité, de conformation et d'affinité des récepteurs membranaires, etc. Un grand nombre de mécanismes peut ainsi réguler le comportement adhésif des cellules. Je vais en présenter quelques-uns dans ce paragraphe.

1.2.4.1 Membrane plasmique

La membrane plasmique est une bicouche phospholipidique d'environ 5-10 nm d'épaisseur. Les phospholipides contenus dans la membrane forment deux feuillets, leurs queues hydrophobes dirigées vers l'intérieur et leurs têtes hydrophiles vers l'extérieur. En plus de ces phospholipides, la membrane contient des glycolipides, du cholestérol et des protéines de surface et transmembranaires. La membrane est décrite comme une *mosaïque fluide* [42]. Ce modèle du début des années 70 suppose que les lipides forment une phase fluide, alors que les protéines ont tendance à s'agréger donnant lieu à un agencement semblable à une mosaïque. Les protéines et les lipides sont plus ou moins libres de diffuser le long de la bicouche. Cette diffusion dans le plan de la membrane est possible grâce à l'agitation thermique (mouvement brownien des constituants). De plus, l'intérieur hydrophobe se comporte essentiellement comme un fluide hydrocarboné permettant aux deux feuillets de glisser l'un par rapport à l'autre. Le modèle de la mosaïque fluide a été complété à la fin des années 90 à la suite d'observations selon lesquelles les composants de la membrane plasmique peuvent être séparés en fractions plus ou moins solubles dans des détergents. L'idée de sous-compartiments membranaires distincts connus sous le terme de radeaux lipidiques « lipid rafts » a été proposée par K. Simons [43].

La découverte des « rafts » a été suivie d'un grand nombre d'observations suggérant que les membranes cellulaires sont latéralement très hétérogènes à l'échelle sub-micrométrique. Les modèles récents proposent que les interactions entre les lipides (tels que le cholestérol, les lipides relativement saturés et les lipides glycosylés) dans le plan de la membrane, entraînent la formation de régions membranaires organisées et fonctionnelles. Ces dernières vont recruter d'autres lipides et protéines. Le concept de « raft » est soutenu par de nombreuses études sur des systèmes biomimétiques. Elles montrent clairement que certains lipides interagissent préférentiellement entre eux, adoptant un comportement collectif qui génère des nano-domaines membranaires. Ces nano-domaines illustrés dans la [figure 1.11](#), ont une taille qui

varie de 10 à 200 nm et sont susceptibles de former des domaines microscopiques (> 500 nm) induits par des interactions protéine-protéine, protéine-lipide et protéine-cytosquelette [44]. La membrane plasmique constitue ainsi une barrière sélective entre l'intérieur de la cellule et le milieu extracellulaire. De ce fait n'importe quelle interaction entre la cellule et son environnement se produit à travers la membrane plasmique. Ainsi les propriétés viscoélastiques de la membrane influencent l'adhérence et la migration des cellules [45], en régulant par exemple la dynamique des protrusions cellulaires et les processus d'endocytose et d'exocytose [46,47].

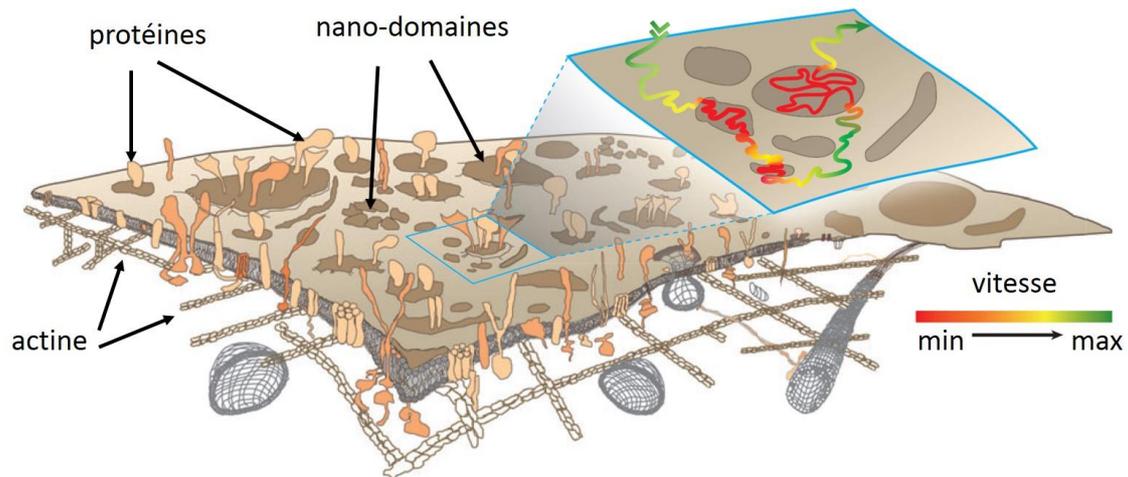


Figure 1.11 : Aperçu général de l'hétérogénéité latérale de la membrane plasmique. Schéma montrant l'organisation des constituants lipidiques et protéiques de la membrane plasmique en nano-domaines visqueux. Ces entités sont réparties aléatoirement dans la membrane et piègent localement la diffusion des composants membranaires. Dans la zone agrandie, la diffusion d'un composant de la membrane est contrainte par les nano-domaines (extrait de la référence [44]).

1.2.4.2 Glycocalyx : interactions non-spécifiques

Les interactions cellule-MEC présentées dans les paragraphes précédents, sont souvent médiées par des couples bien définis ligand-récepteur. Ces interactions sont dites spécifiques et impliquent généralement une surface de contact de quelques centaines de nanomètres carrés. La membrane plasmique est très proche du support au niveau de ces contacts focaux, typiquement à une hauteur de 20 à 50 nm [48,49]. Toutefois, il est difficile de penser que quelques molécules seulement soient responsables de l'adhérence à l'échelle globale de la cellule. Ainsi il existe des interactions dites non-spécifiques qui ne font pas intervenir de reconnaissances protéiques. Ces interactions peuvent être attractives ou répulsives, à courte ou moyenne distances, et affectent le comportement migratoire cellulaire. Elles ont été largement étudiées ces dernières années par microscopie RICM sur des systèmes biomimétiques, comme des vésicules géantes ou des bicouches lipidiques. Erich Sackmann et son groupe de recherche en Allemagne ont grandement contribué à ces études, et ont montré que ces interactions peuvent être quantifiées précisément en mesurant la distance qui sépare la membrane du substrat [50]. Parmi toutes ces interactions, les plus communes sont les interactions de van der Waals, les interactions électrostatiques, les répulsions stériques et les ondulations d'Helfrich.

Les *interactions de van der Waals* ont des contributions électrostatiques et électrodynamiques. Elles sont de nature attractive et résultent des interactions de types moléculaires et dipolaires. Elles tendent à dominer parmi les mécanismes non-spécifiques à très courtes distances, en dessous de 20-25 nm. Si ces interactions étaient les seules à exister, on devrait trouver toutes les cellules fortement adhérentes les unes aux autres et à la MEC, sans aucune sélectivité. Or ce n'est pas le cas, puisque les cellules disposent de mécanismes répulsifs. Les *interactions électrostatiques* peuvent être par exemple répulsives, en fonction du signe des charges de surface. Dans le cas des cellules qui vont adhérer sur une lamelle de verre propre, la présence de groupements ionisés négatifs sur l'interface verre/eau et sur la membrane plasmique vont induire une répulsion électrostatique non négligeable à courte portée. Les *interactions stériques* peuvent également produire une forte répulsion à courte distance. Elles résultent de l'exclusion stérique de deux molécules lorsqu'elles sont rapprochées. Les *ondulations d' Helfrich* ont une origine entropique et produisent un phénomène d'ondulation des membranes lipidiques lorsque ces dernières se rapprochent d'une surface. Le rapprochement de la surface va diminuer l'entropie des fluctuations de la membrane, ce qui engendre une pression entropique effective qui tend à repousser les parois afin que les membranes puissent fluctuer librement. Ces ondulations créent une force de répulsion à longue portée, qui dépend fortement de la composition de la membrane. Pour finir, toutes ces interactions dites non-spécifiques sont dépendantes de la distance entre la cellule et la surface ou bien entre deux cellules et sont liées à la nature des composants présents à la surface des cellules.

Parmi tous les composants de la membrane le glycocalyx joue un rôle de premier plan dans l'adhérence non-spécifique. Ce dernier est constitué de chaîne plus ou moins ramifiée de polysaccharides, chargés négativement, reparti à la surface des cellules [51]. Les charges négatives du glycocalyx sont dues à la présence de groupements carboxylates (COO^-) et sulfonâtes (SO_3^-). Le glycocalyx présente une structure dynamique et peut atteindre une couche d'épaisseur variable, de quelques nm à ≈ 100 nm sur la plupart des cellules (Figure 1.12), voire $0.5 \mu\text{m}$ à la surface des cellules endothéliales.

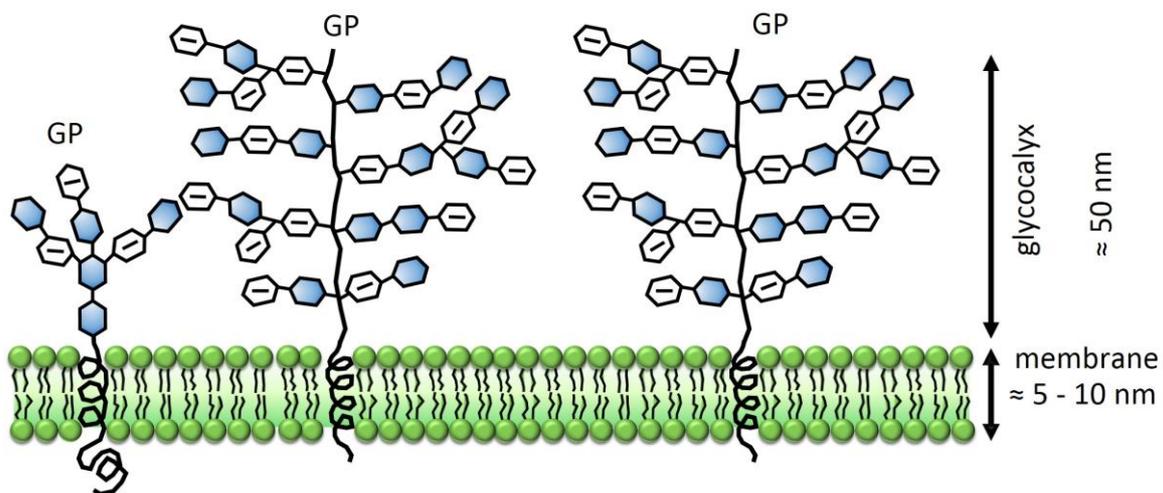


Figure 1.12 : Représentation du glycocalyx à la surface des cellules.

Le glycocalyx diminue l'adhérence cellulaire par la génération de forces répulsives empêchant l'approche de la surface cellulaire. L'adhérence peut être améliorée en éliminant les charges négatives du glycocalyx, tandis que l'induction de l'expression de grosses molécules d'hydrates de carbone par les cellules peut diminuer les propriétés adhésives [52]. Récemment, il a été montré qu'un glycocalyx épais facilite le clustering des intégrines actives et peut même les activer en appliquant une force différente de celle médiée par le cortex d'acto-myosine [53,54]. Ainsi, un glycocalyx volumineux est une caractéristique des cellules tumorales qui pourrait favoriser les métastases en influençant l'organisation spatiale et également la fonction des récepteurs membranaires. Le rôle important joué par le glycocalyx dans l'adhérence et la migration, illustre parfaitement l'enjeu qu'il y a, à l'heure actuelle, d'étudier les interactions non-spécifiques. Lorsqu'une cellule s'approche par sédimentation d'un substrat en verre, elle se trouve fortement attirée par le substrat par l'intermédiaire des forces de van der Waals. Même dans les milieux de culture cellulaire qui contiennent un très grand nombre d'ions, la contribution électrodynamique de cette force reste importante et les cellules se trouvent toujours attirées vers la surface. Mais le glycocalyx présent à la surface des cellules va contrôler l'adhérence par le biais de deux types d'interactions répulsives : d'une part, la répulsion électrostatique due à la densité élevée de charge négative du glycocalyx, d'autre part, la répulsion stérique générée par la chaîne de polysaccharides. Les surfaces en verre présentent des charges négatives même si elle est recouverte de molécules de fibronectine. Pour estimer le potentiel électrostatique d'une surface recouverte de fibronectine, j'ai réalisé plusieurs mesures du potentiel zêta (V_ζ) à l'aide d'un Zetasizer (Nano ZS, Malvern) sur des microbilles de borosilicate ayant une composition très proche des lamelles de verre (Figure 1.13). J'ai ajouté différentes concentrations de fibronectine - de 10 $\mu\text{g/mL}$ (concentration déposée sur la surface de la lamelle de verre) jusqu'à 100 $\mu\text{g/mL}$ - à la solution contenant les microbilles. J'ai laissé incuber pendant 1 heure puis j'ai centrifugé plusieurs fois pour éliminer la fibronectine non adsorbée. Le potentiel des microbilles seules est négatif ($V_\zeta = -67 \pm 4 \text{ mV}$). Le potentiel des microbilles recouvertes de fibronectine varie en fonction de la concentration de fibronectine mais reste toujours négatif.

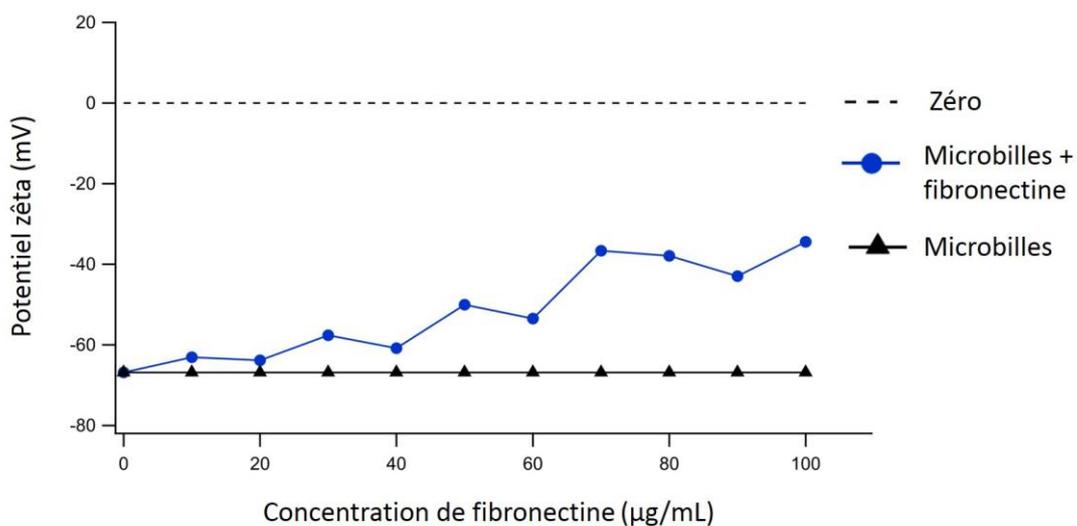


Figure 1.13 : Evolution de V_ζ des microbilles avec la concentration de fibronectine. Le potentiel des microbilles seules (courbe noire) et des microbilles recouvertes de fibronectine (courbe bleue).

Cette double force répulsive, électrostatique à très courte distance et stérique à plus grande distance, empêche localement la cellule d'adhérer. Mais elle ne repousse pas complètement la cellule de la surface puisque le glycocalyx ne forme pas une couche d'épaisseur homogène sur la surface des cellules. Les travaux de Paszek [54] ont montré que le glycocalyx participe à la formation des contacts focaux. Son épaisseur est très faible au sein des contacts mais beaucoup plus importante autour de ces derniers. En conclusion, l'adhérence d'une cellule sur un substrat quelconque va dépendre de différentes forces non-spécifiques. La hauteur de la membrane plasmique s'équilibre à environ une centaine de nm du substrat, et varie typiquement entre 50 et 200 nm [55–57].

1.2.5 Spécificité et non-spécificité²

Les interactions dites spécifiques entre la cellule et la matrice extracellulaire sont les plus étudiées et les mieux connues. En effet, ce sont des interactions de type ligand-récepteur (LR), où on a une reconnaissance moléculaire spécifique pour une seule molécule comme dans le cas des intégrines $\alpha 5\beta 1$ et la fibronectine. Cette complémentarité structurale est décrite par le modèle *clé-serrure*. Ces liaisons se produisent lorsqu'une combinaison unique d'interactions physiques (non covalentes et réversibles) entre deux macromolécules agissent collectivement pour créer une liaison globale forte. Ce lien spécifique ne doit pas nécessairement être fort, ou bien de longue durée. Il suffit qu'il soit sélectif pour déclencher une voie de signalisation. Ces interactions sont décrites en termes de spécificité (mesure de taux de liaison pour des molécules de structures relativement proches) et d'affinité chimique (évaluation des constantes thermodynamiques et cinétiques d'association et de dissociation). La liaison entre la biotine et l'avidine est l'une des liaisons spécifiques les plus fortes qu'on rencontre en biologie. Son énergie de liaison est de $\approx 35 \text{ k}_B\text{T}$. Elle est considérée comme une véritable colle biologique et peut durer plusieurs mois. Son énergie est plus forte qu'une liaison hydrogène ($\approx 10 \text{ k}_B\text{T}$) et plus faible qu'une liaison covalente ($\approx 120 \text{ k}_B\text{T}$). Le [tableau 1.1](#) révèle les caractéristiques quelque peu surprenantes de la faiblesse des liens LR et de leur courte durée de vie [58]. Ces deux paramètres révèlent l'importance du regroupement des récepteurs membranaires. Par conséquent, même si une seule liaison entre ligand et récepteur est énergétiquement faible, une combinaison de plusieurs liaisons pourra efficacement déclencher une signalisation.

Tableau 1.1 : Énergie de liaison et durée de vie des différents couples ligand-récepteur.

Récepteur	Ligand	Energie (k_BT)	Temps de vie
Avidine	Biotine	35	mois-année
Anticorps	Antigène	16-25	secondes-heures
Enzyme	Substrat	7-21	μs - secondes
Lectine	Glycoconjugué	7-12	μs - ms

² Cette partie est basée en majorité sur les informations contenues dans l'ouvrage « *Intermolecular and surface forces* » de J. Israelachvili [58].

De plus, les interactions non-spécifiques peuvent consolider les liaisons spécifiques et d'une certaine manière aider à la formation d'un contact focal stable. Par exemple, l'épaisseur du glycocalyx à la surface des cellules crée des domaines restreints qui favorisent le regroupement des intégrines, affectant ainsi la signalisation et la survie cellulaires [54]. Dans certains cas les différences entre les interactions spécifiques et non-spécifiques sont ténues. La protéine Leukosialine (CD43) est une glycoprotéine se trouvant à la surface des leucocytes. Cette protéine peut d'une part, inhiber l'adhérence cellulaire par répulsion électrostatique et d'autre part, stimuler une voie de signalisation intracellulaire qui conduira à l'activation d'intégrines leucocytaires (tels que LFA-1) [59]. En conclusion, les interactions cellule-substrat sont susceptibles de faire intervenir un grand nombre d'interaction différentes qui rend l'adhérence cellulaire complexe et multiparamétrique.

1.3 Méthodes d'étude et de mesure de l'adhérence cellulaire³

L'adhérence cellulaire est un processus très dynamique qui fait intervenir un grand nombre de composants cellulaires et extracellulaires. Plusieurs techniques ont été développées pour étudier l'adhérence cellulaire. Elles proposent d'examiner le comportement d'une population de cellules (test de blessure, (Figure 1.14 (A)) ou de cellules individuelles (va-TIRFM, RICM, Figures 1.14 (B) et (C)). Elles peuvent être également basée sur une analyse à l'échelle subcellulaire, en analysant par exemple des interactions protéine-protéine par microscopie AFM (Figure 1.14 (D)) [60].

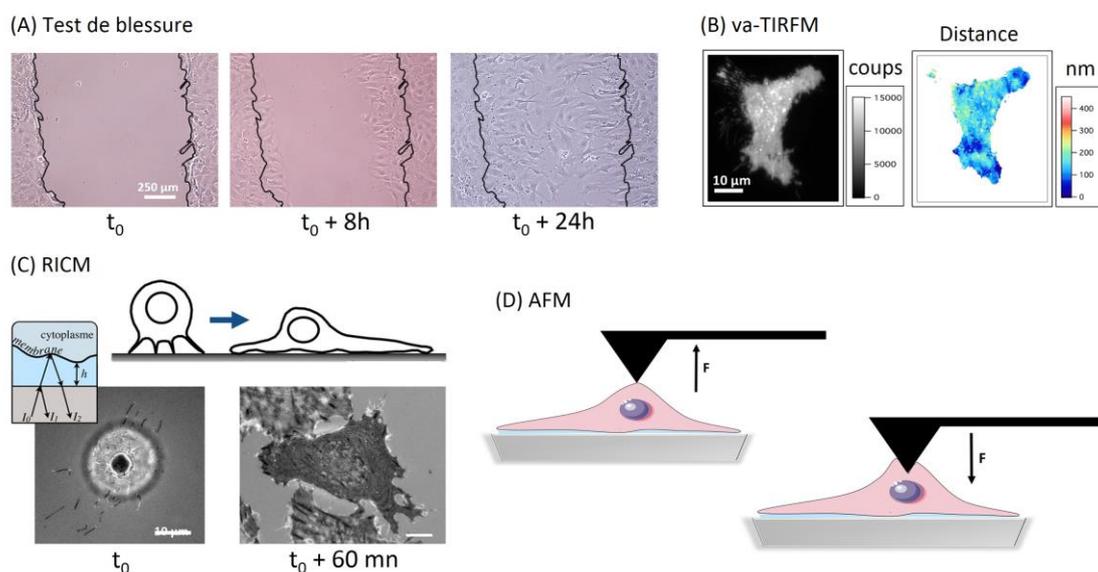


Figure 1.14 : Méthodes d'étude et de mesure de l'adhérence cellulaire. Différentes techniques permettent de mesurer l'adhérence cellulaire et d'extraire différents paramètres. Par exemple en quantifiant le pourcentage de fermeture de la blessure par des cellules MEF attachées sur un substrat après une force appliquée dans le cas du test de blessure (A) ; en analysant la morphologie cellulaire et la surface de contact des cellules U-87 MG par RICM (B) ; en mesurant les distances séparant la membrane des cellules U-87 MG du substrat par va-TIRFM (variable-angle Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) (C) ; ou bien en évaluant la force pour rompre une liaison de type ligand-récepteur à l'aide d'un AFM (D).

³ Cette partie est basée en majorité sur les informations contenues dans la revue de Amelia Ahmad Khalili et Mohd Ridzuan Ahmad [60].

1.3.1 Mesure d'ensemble

Une grande variété de techniques sont utilisées pour étudier l'adhérence ou la migration des cellules vivantes. La méthode la plus utilisée est le test de rinçage. Les cellules sont généralement cultivées dans des plaques 96 puits, suivies par un ou plusieurs lavages. Ce test détermine la fraction de cellules qui restent adhérentes dans les puits. Cette étude est utile pour mesurer les effets du microenvironnement cellulaire, tels que l'effet de la concentration de protéines de la MEC sur la force d'adhérence cellulaire. De façon analogue au test de rinçage, on peut étudier le détachement des cellules par application d'un flux de fluide à pression contrôlée, dans des chambres à flux [61]. Un autre exemple de techniques utilisées est d'évaluer les forces d'adhérence par centrifugation. Cette technique est fréquemment utilisée en raison de sa simplicité d'utilisation. Les cellules sont ensemencées dans une plaque 96 puits, placée dans une centrifugeuse pour microplaque [62]. Le nombre de cellules avant et après centrifugation est quantifié (Figure 1.15). Un autre test très répandu est le test de blessure. Il permet d'observer la migration dirigée des cellules. Ce test permet de quantifier la vitesse moyenne de déplacement d'un groupe de cellules. Pour finir, on peut également utiliser une chambre de Boyden. On crée une différence de concentration de molécules chimio-attractantes entre deux compartiments séparés par une membrane poreuse, à travers laquelle les cellules peuvent migrer. Après un certain temps donné, la membrane est récupérée pour compter le nombre de cellules ayant pu passer au travers.

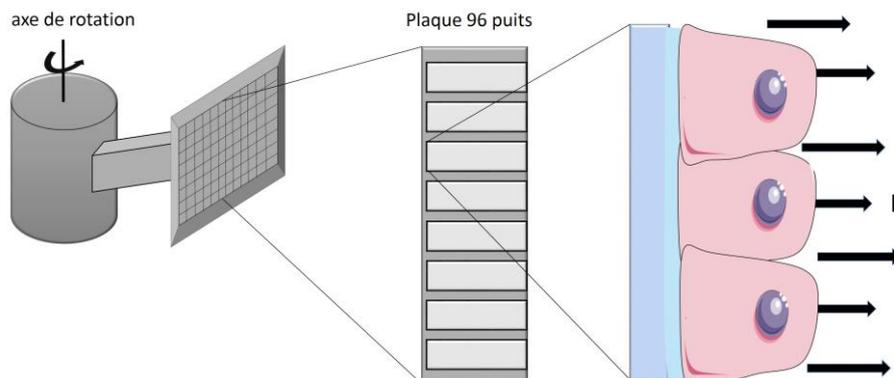


Figure 1.15 : Etude de l'adhérence par centrifugation. Une plaque 96 puits est fixée avec les puits tournés vers l'extérieur. Une force radiale, proportionnelle au carré de la vitesse de rotation, est appliquée sur les cellules et provoque leur détachement.

Les différentes techniques citées ci-dessus sont utiles pour déterminer le comportement général d'une lignée cellulaire (migration, cinétique) et pour étudier des voies de signalisation cellulaire en déterminant la manière dont les facteurs physiologiques (température, pH, flux de fluide), les traitements (produits chimiques, drogues pharmacologiques, substrats) affectent l'adhérence cellulaire. A la suite d'une telle mesure on obtient une seule valeur, comme une fraction de cellules adhérentes, pour laquelle il est souvent difficile d'évaluer une erreur de mesure.

1.3.2 Mesure à l'échelle de la cellule unique

Les études à l'échelle de la cellule unique, impliquent de répéter les mesures sur un grand nombre de cellules. Elles permettent de s'affranchir des effets de moyenne qu'on rencontre dans une mesure d'ensemble. Ces méthodes permettent de mesurer et de corréler des caractéristiques de cellules individuelles, telles que la surface de contact entre une cellule et la surface, la distance membrane-substrat, la distribution des adhérences focales, et de corréler tous ces paramètres avec la force d'adhérence. Ces techniques incluent la microscopie de fluorescence traditionnelle (épi-fluorescence, confocal), l'imagerie d'anisotropie de fluorescence [63], ou à haute résolution tels que l'iPALM (interferometric Photoactivated Localization Microscopy), le STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) et le polar-dSTORM [64] (polarization-resolved direct STORM). Ces méthodes permettent d'étudier les changements morphologiques des cellules et l'organisation des contacts focaux. Elles consistent à marquer spécifiquement une ou plusieurs protéines du contact focal par immunomarquage ou transfection. L'observation des contacts focaux par iPALM a ainsi révélé que suivant (x, y) les PFA ont des formes allongées, avec une largeur typique de 100-200 nm et une longueur variable, allant de quelques centaines de nm à quelques μm (Figure 1.16). Suivant z, l'épaisseur des PFA est plutôt de l'ordre de 50 nm [19]. Plus récemment, la microscopie de fluorescence par illumination structurée a permis d'observer très précisément la croissance des contacts spécifiques (vitesse d'élongation de l'ordre de 0.5 $\mu\text{m}/\text{mn}$) et de déterminer leur durée de vie (quelques mn à 1 h) [65].

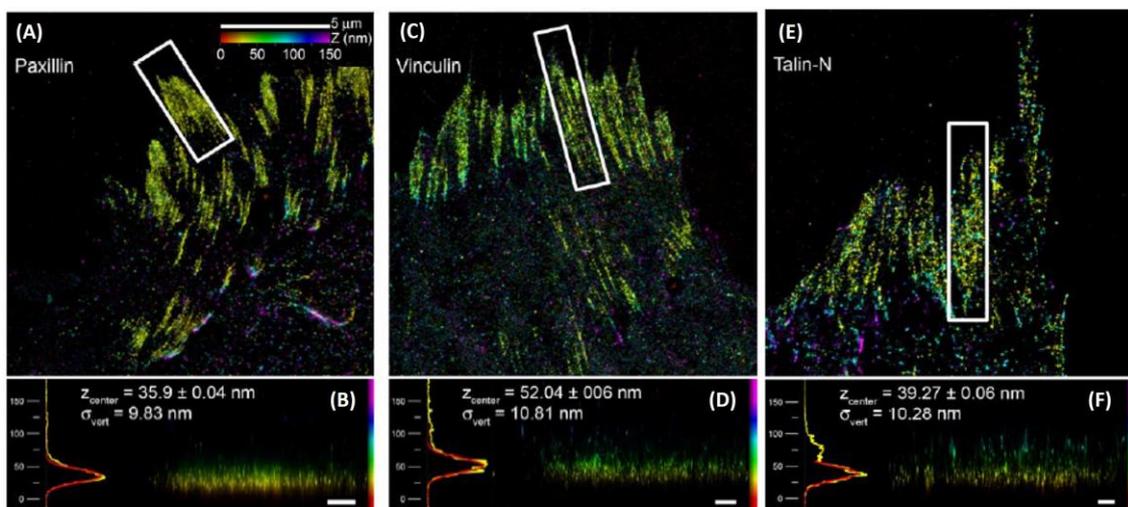


Figure 1.16 : Visualisation des protéines d'adhérence focales dans les fibroblastes embryonnaires de souris. Images iPALM des cellules exprimant les protéines fluorescentes (vue de dessus de la Paxilline (A), la Vinculine (C) et la Taline (E)). Projections latérales des protéines correspondantes avec leurs histogrammes de distributions verticales (Paxilline (B), Vinculine (D) et Taline (F), extrait de la référence [19]).

Une autre technique bien répandue est la microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRFM). Elle est basée sur l'utilisation des ondes évanescentes. Elle permet de détecter le signal émis par les molécules fluorescentes du côté ventral des cellules, à proximité du substrat. L'équipe "NanoBioPhotonique" dans laquelle j'ai réalisé ma thèse a développé ces dernières années une technique qui permet de reconstruire la topographie de la membrane

plasmique à partir d'une série d'images TIRF (Figure 1.14 (B)). On parle alors de microscopie va-TIRFM. Elle offre la possibilité de quantifier la distance entre la cellule et le substrat avec une résolution axiale de 10 à 20 nm [4,5].

Parmi les techniques optiques qui ne nécessitent pas de marquage fluorescent, la microscopie interférentielle RICM permet une analyse semi-quantitative de l'évolution de la surface de contact au cours de la migration [57,66,67]. Le contraste des images RICM est lié, d'une part, à la distance qui sépare la membrane cellulaire de la surface et d'autre part, à l'indice de réfraction du cytoplasme au voisinage de la membrane (Figure 1.14 (C)). La forte hétérogénéité de l'indice (liée principalement à la présence de fibres de stress) rend impossible la détermination précise de la distance membrane-substrat en RICM standard. D'autres techniques ont été développées pour mesurer les forces d'interaction cellule-substrat. Par exemple, l'utilisation de la microfluidique et de la chambre à flux de P. Bongrand [61] pour générer une force de cisaillement. Ainsi, on observe l'effet d'une force extérieure sur l'adhérence. On peut aussi mesurer les forces générées par le cytosquelette d'actine par la microscopie de force de traction (Traction Force Microscopy, TFM). Cette méthode est très répandue, elle repose sur la mesure du déplacement de nanobilles fluorescentes (Figure 1.17 (A)) présentes dans un polymère élastique [68] ou bien de micropiliers en PDMS (Figure 1.17 (B)) [69]. Ces déplacements permettent de calculer les forces d'adhérence en différents points de la cellule.

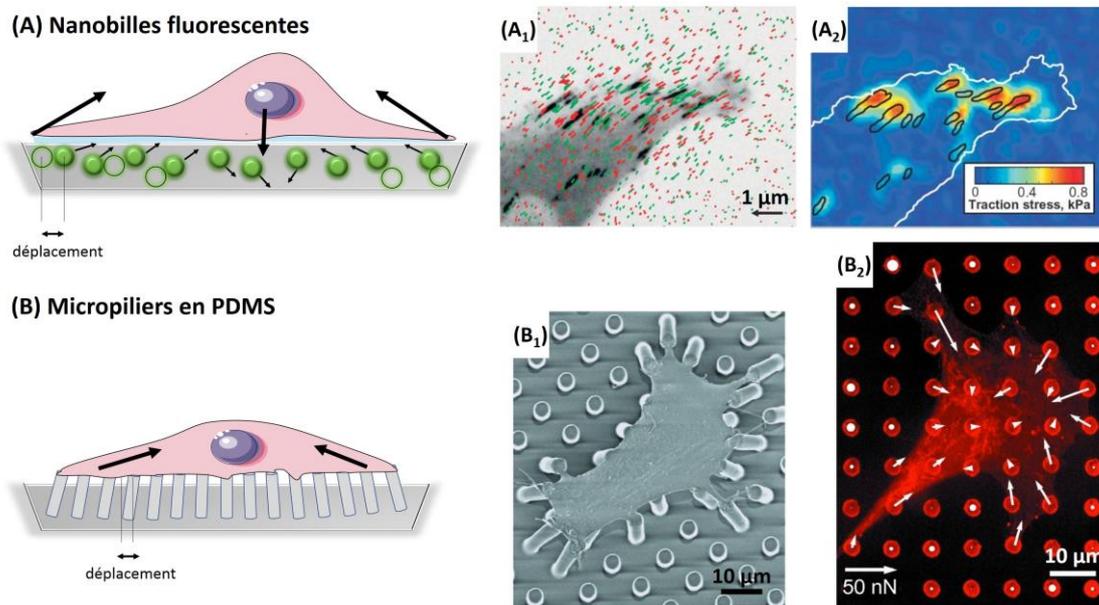


Figure 1.17 : Mesure de force d'adhérence d'une cellule individuelle sur un substrat déformable. Schéma représentant une cellule sur un polymère dopé de nanobilles fluorescentes (A) (images extraites de la référence [68]) et sur des micropiliers (B) (images extraites de la référence [69]). (A₁) Image couleur (rouge et vert) représentant le déplacement de nanobilles superposée avec une image en niveau de gris et contraste inversé d'une cellule transfectée paxilline-eGFP. Les vecteurs rouges et verts indiquent le déplacement latéral des nanobilles fluorescentes. (A₂) Image des forces de traction avec les adhérences focales localisées en noir et le bord de la cellule souligné en blanc. (B₁) Image MEB d'une cellule adhérente sur des micropiliers recouverts de fibronectine. (B₂) Image confocale d'une cellule adhérente sur des micropiliers. La position de la fibronectine en haut des micropiliers (disque rouge) a été utilisée pour calculer la force exercée par la cellule (flèche blanche). La longueur de flèches indique l'amplitude de la force.

L'aspiration par une micropipette est largement utilisée pour mesurer les propriétés mécaniques des cellules individuelles, telles que la rigidité membranaire et la tension corticale des cellules. Cette technique permet de détacher une cellule adhérente en appliquant une force d'aspiration au niveau d'une partie de la surface de la cellule. La cellule va se détacher si la force d'aspiration est augmentée ou bien si la micropipette est éloignée du substrat. La force d'adhérence est définie comme la force minimale nécessaire pour détacher une seule cellule de son substrat. Elle était utilisée pour identifier des différences d'adhérence entre les cellules normales et tumorales. Palmer et al. ont mis au point un appareil de mesure de détachement cellulaire utilisant l'aspiration par micropipette (SCAMA) [70]. Ils ont mesuré et comparé la force d'adhérence entre les cellules normales, cancéreuses et métastatiques. Ils ont trouvé que les lignées cellulaires au potentiel métastatique le plus élevé se détachent facilement, tandis que celles normales adhèrent plus fortement.

1.3.3 Mesure de force à l'échelle subcellulaire

Des mesures de force peuvent être réalisées localement à la surface des cellules. Ces techniques sont identifiées par l'acronyme SCFS pour Single Cell Force Spectroscopy. Ces méthodes utilisent généralement un microscope pour observer la cellule tandis que la force est appliquée à l'aide d'un nano/micromanipulateur ou d'une micropipette. L'imagerie optique est utilisée pour étudier les structures et la mécanique des composants cellulaires, tandis qu'une force est appliquée pour déterminer les propriétés mécaniques locales des cellules. Les techniques utilisées sont la microscopie à force atomique (AFM), les pinces optiques et magnétiques, ainsi que les micropipettes.

L'AFM est généralement utilisée pour étudier la force d'adhérence de n'importe quelle CAM. Taubenberger et al. ont caractérisé les étapes initiales de l'adhérence des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) induites par les intégrines $\alpha2\beta1$ au collagène de type I [71].

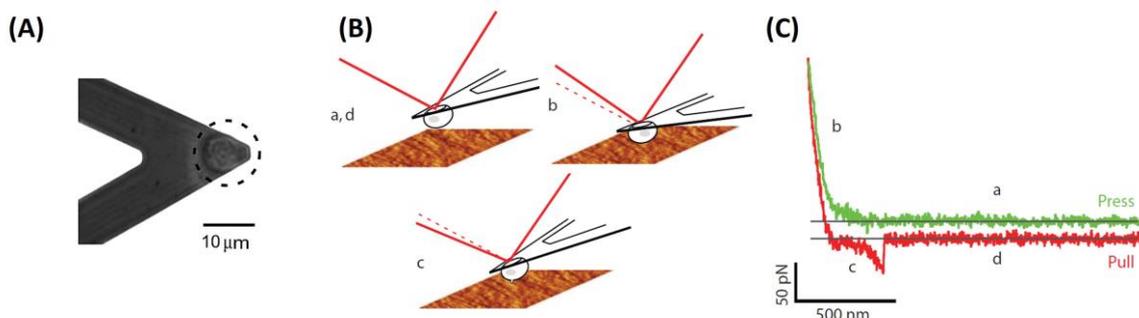


Figure 1.18 : Mesure de force d'adhérence d'une cellule individuelle AFM. (A) Image par contraste de phase d'une cellule CHO vivante liée au bout d'un levier d'AFM fonctionnalisé. (B) Mesure de force : cellule liée au levier maintenue à plusieurs micromètres au-dessus de la surface du collagène (a et d). La cellule est rapprochée vers la surface de collagène jusqu'à ce qu'une force de contact de 200 pN soit atteinte, puis la position du levier est maintenue à cette hauteur pendant 200 ms (b). Ensuite, la cellule est retirée de la surface à une vitesse de 2.5 $\mu\text{m/s}$ (c). Les liaisons entre la cellule et la surface se rompent de manière consécutive jusqu'à ce que la cellule et la surface soient complètement séparées (d). (C) Courbe de force approche/retrait représentant les différentes étapes du schéma B. La courbe de retrait (en rouge) contient un événement de rupture discret correspondant à la rupture d'une simple liaison intégrine-collagène. (extrait de la référence [72]).

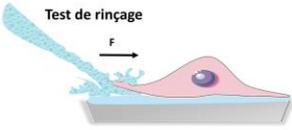
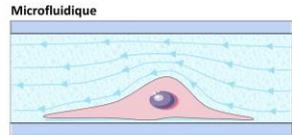
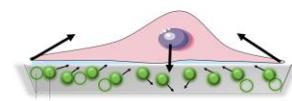
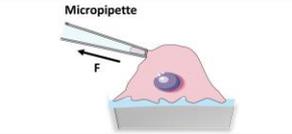
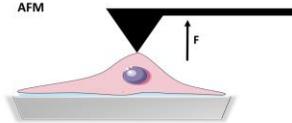
Ils ont attaché une cellule à un levier d'AFM fonctionnalisé, puis l'ont rapproché de la matrice du collagène avec une force prédéfinie pendant des durées variables. Ensuite le levier a été rétracté jusqu'à ce que la cellule soit détachée de la matrice. Un cycle complet de mesure de force est représenté schématiquement sur la [Figure 1.18](#). Les auteurs ont découvert que l'adhérence médiée par $\alpha 2\beta 1$ se fait en deux étapes. Une première étape de liaison faible médiée par une seule intégrine, est remplacée par de fortes interactions impliquant une agrégation de plusieurs molécules d'intégrine et une participation du cytosquelette de l'acto-myosine.

Les pinces optiques utilisent un faisceau laser très focalisé pour piéger et manipuler des billes diélectriques microscopiques, voire des cellules ou des organites. Elles utilisent la force résultante de la réfraction du faisceau laser pour déplacer des composants. Cette technique est capable de mesurer des forces allant d'une fraction de pN à plusieurs centaines de pN avec une grande précision (<1 pN). Elle est ainsi applicable à l'étude des liaisons non covalentes de type LR. Thoumine et al. ont pu obtenir des informations sur la cinétique d'adhérence de fibroblastes sur de la fibronectine en couplant leurs résultats expérimentaux à un modèle qui décrit l'interaction ligand-récepteur [73]. Ils ont ainsi été en mesure de déterminer le nombre, la force et le taux de liaison LR.

1.3.4 Conclusion

Les approches à l'échelle de la cellule unique ou bien subcellulaire permettent des mesures précises de l'adhérence cellulaire. Elles permettent d'imager des biomolécules avec une résolution nanométrique, d'appliquer une grande variété de forces et de traiter les cellules dans leur milieu physiologique. L'étude à l'échelle d'un groupe cellulaire fournit des données moyennées. Même si cette approche ne peut pas fournir de données précises sur les caractéristiques des cellules individuelles, elle est encore largement utilisée pour étudier l'adhérence. Elle apporte des informations essentielles dans le domaine médical pour le traitement des maladies, l'ingénierie tissulaire et la compatibilité des biomatériaux. Le [tableau 1.2](#) résume les avantages et les inconvénients des différentes techniques. En conclusion, de nombreuses techniques et analyses ont été développées ces 20 dernières années. Chaque méthode est unique et a été développée pour des objectifs spécifiques, ce qui rend souvent difficile la comparaison des résultats entre eux. Le choix d'une technique appropriée dépend fortement du but ciblé et des informations qu'on souhaite obtenir.

Tableau 1.2 : Récapitulatif des différentes techniques d'étude de l'adhérence cellulaire.

Type de mesure	Méthode de mesure	Avantages	Limites
Ensemble de cellules	 <p>Test de rinçage</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Simple à réaliser - Rapide - Faible coût 	<ul style="list-style-type: none"> - Reproductibilité difficile - Donne une seule valeur - Incertitudes importantes - Flux non contrôlé
	 <p>Microfluidique</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Observation simple - Non invasive - Adaptable à la taille des cellules - Large gamme de force applicable - Flux contrôlé 	<ul style="list-style-type: none"> - Mise en place longue - Injection de cellules
Cellule individuelle	 <p>Nanobilles fluorescentes</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Mesure en temps réel - Flexible pour des ajustements mécaniques et chimiques - Pas d'application de force externe 	<ul style="list-style-type: none"> - Incertitudes de déplacement des billes - Analyse des données complexes
	 <p>Micropipette</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Mesure en temps réel - >1nN (force élevée) 	<ul style="list-style-type: none"> - Endommage la cellule - Modification de la forme de la cellule - Alignement de la cellule et la sonde
Mesure locale	 <p>AFM</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Observation en temps réel - Précision élevée 	<ul style="list-style-type: none"> - Endommage la cellule - Alignement de la cellule et la sonde - Reproductibilité des pointes AFM

complexité de la mise en œuvre

2. FLUORESCENCE ET RÉFLEXION TOTALE INTERNE

L'œil humain a besoin de contraste pour distinguer les détails des objets microscopiques. Plusieurs méthodes visant à améliorer le contraste des images de microscopie ont été conçues. La technique la plus efficace est la microscopie de fluorescence. Elle nécessite l'utilisation de molécules fluorescentes (fluorophores). Aujourd'hui, un très grand nombre de fluorophores est disponible, offrant une absorption allant de l'ultraviolet à l'infrarouge proche. Les principaux avantages de la fluorescence sont le contraste, la sensibilité, la spécificité et la sélectivité très élevés. Cependant, elle présente certaines limitations comme le photoblanchiment, ou l'apparition d'une toxicité sans irradiation.

2.1 Principe de la fluorescence ⁴

2.1.1 Diagramme de Jablonski

Les fluorophores sont des molécules organiques dotées d'une propriété particulière : ils absorbent des photons d'une certaine énergie et émettent des photons d'une énergie légèrement inférieure. Spectralement, cela signifie que la couleur de la lumière émise est décalée vers le rouge par rapport à la lumière absorbée. On parle de déplacement de Stokes ([Figure 2.1 \(B\)](#)). Quand un fluorophore absorbe de l'énergie il passe dans un état excité. Son retour à l'état fondamental peut engendrer l'émission d'un photon. Ces propriétés d'absorption et d'émission dépendent des transitions entre différents états électroniques. Le diagramme d'énergie dit de Jablonski [74] résume en trois étapes les transitions énergétiques d'une molécule fluorescente ([Figure 2.1 \(A\)](#)). Dans ce modèle simplifié les niveaux d'énergie sont identifiés par leur multiplicité de spin ($M_s = 2s + 1$ avec s la résultante des spins électroniques). La multiplicité de spin de l'état fondamental vaut 1. On parle alors d'état singulet et il est noté S_0 . Pour amener la molécule dans un état excité S_n il faut que l'énergie des photons soit supérieure ou égale à la différence d'énergie des états S_n et S_0 . La fréquence du rayonnement électromagnétique ν et la longueur d'onde λ de cette lumière peuvent être déterminées par :

⁴ Cette partie est basée en majorité sur les informations contenues dans la revue de Christopher P. Toseland [76].

$$E_{S_n} - E_{S_0} = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.1)$$

où h est la constante de Planck (en J.s), c décrit la vitesse de la lumière dans le vide (en m.s^{-1}) et E_{S_n} et E_{S_0} représentent l'énergie des états S_n et S_0 (en J) [75]. La molécule fluorescente initialement dans l'état fondamental S_0 passe de l'état S_0 à S_1 par absorption de photons d'énergie supérieure $E_{S_1}-E_{S_0}$. La molécule ne reste pas longtemps dans cet état excité, typiquement $\approx 1\text{ns}$. Le retour vers l'état fondamental S_0 peut se faire par émission d'un photon. Du fait d'une dissipation d'énergie par relaxation vibrationnelle dans l'état excité, l'énergie du photon réémis est plus faible que celle du photon absorbé. Il existe un état triplet d'énergie inférieure aux états singulets. Cet état triplet T_1 a une durée de vie beaucoup plus longue que celle de l'état S_1 , typiquement $1\mu\text{s}$ et la transition $T_1 \rightarrow S_0$ est généralement non radiative. Le taux de transition entre les différents états électroniques est noté k et exprimé en s^{-1} .

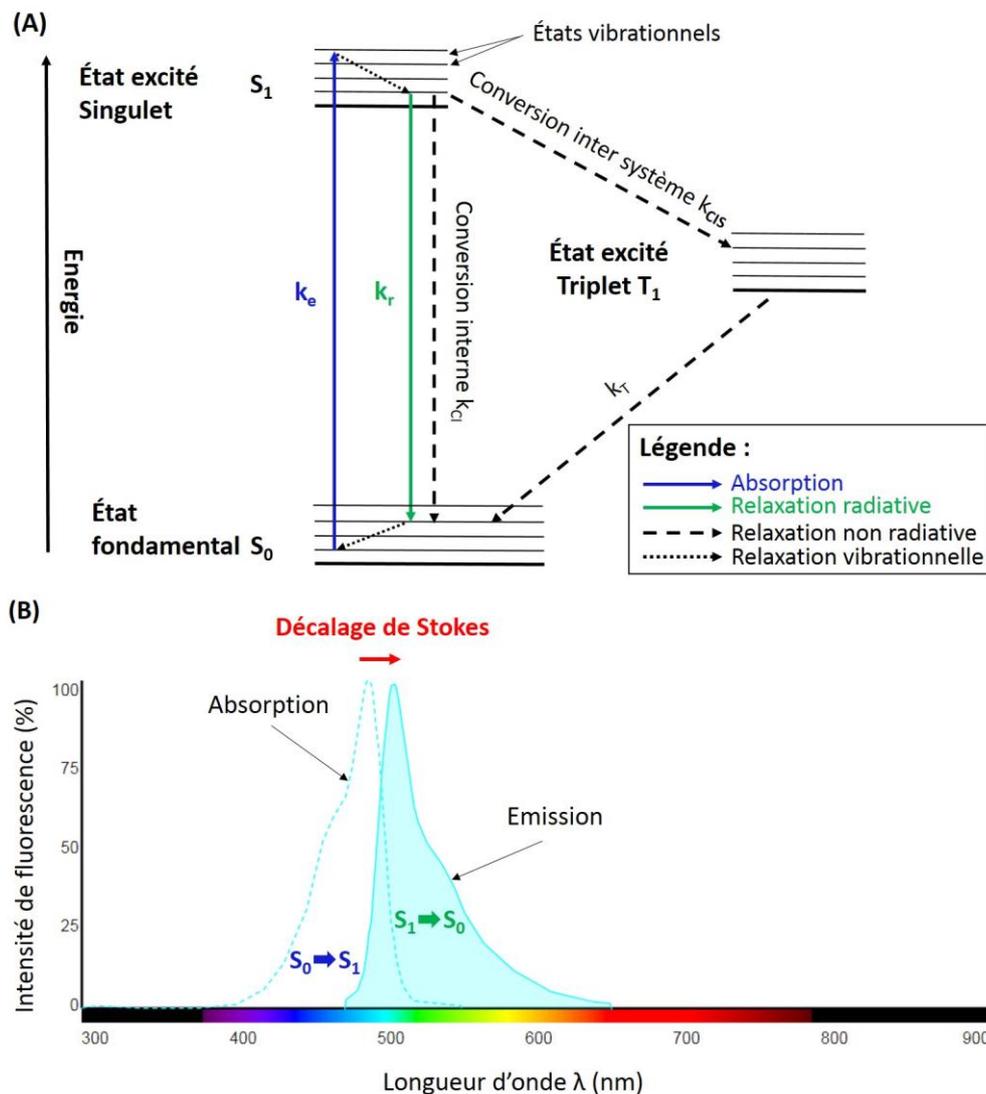


Figure 2.1 : Propriétés d'un fluorophore. (A) Diagramme de Jablonski d'une molécule à deux électrons, lorsque les électrons sont de spins opposés, l'état est singulet ($s_{total} = s_1 + s_2 = 0$, $M_s = 2s + 1 = 1$). Lorsque les spins sont parallèles, on parle d'état triplet ($s_{total} = 1$, $M_s = 3$). (B) Spectre de fluorescence de la molécule de DiO (3,3'-Diocetadecyloxycarbocyanine perchlorate). Le décalage de Stokes entre les maxima d'absorption et d'émission est d'environ 15 nm. L'image B est adaptée du site de Molecular Probes.

2.1.2 Propriétés des fluorophores

L'intensité de fluorescence d'un fluorophore ou bien sa brillance est définie par deux paramètres, son *taux d'excitation* k_e et son *rendement quantique* Φ_F [76]. Ces derniers sont fréquemment affectés par des facteurs environnementaux tels que le pH, les solvants et la viscosité. Le taux d'excitation est décrit par :

$$k_e = \sigma_{abs} \frac{I}{h\nu} \quad (2.2)$$

Où σ_{abs} est la section efficace d'absorption (en cm^2) et I est l'intensité de l'excitation lumineuse (en W/cm^2). La brillance relative d'un fluorophore est obtenue en multipliant la section efficace d'absorption par le rendement quantique. σ_{abs} reflète la probabilité d'absorption d'une molécule à une longueur d'onde donnée. Une section efficace élevée conduira à une plus grande quantité de lumière absorbée. Sa valeur peut constituer un critère pour le choix des fluorophores. Prenons l'exemple de la fluorescéine à 488 nm, son coefficient d'extinction $\varepsilon_{488} = 8.10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et sa section efficace d'absorption $\sigma_{abs} = 3.10^{-16} \text{ cm}^2/\text{molécule}$ calculée par :

$$\varepsilon_{abs} = \frac{N_A \sigma_{abs}}{10^3 \ln 10} \quad (2.3)$$

où N_A est le nombre d'Avogadro (en mole^{-1}). Lorsqu'un photon est absorbé, la probabilité qu'un photon soit émis par fluorescence est liée au rendement quantique Φ_F . Φ_F est compris entre 0 et 1. Plus précisément, il représente la probabilité que la molécule excitée se relaxe par fluorescence plutôt que par des processus non radiatifs. Φ_F est décrit par :

$$\Phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{CI} + k_{CIS}} \quad (2.4)$$

où k_r représente le taux de relaxation radiative alors que k_{CI} et k_{CIS} sont des relaxations non radiatives exprimées en s^{-1} . Par conséquent, une molécule avec un rendement quantique élevé et un grand coefficient d'extinction est très brillante.

La durée de vie de la fluorescence (τ_f) correspond à la durée moyenne pendant laquelle la molécule reste à l'état excité S_1 avant de retourner à l'état fondamental. La durée de vie est très sensible à l'environnement local de la molécule. La plupart des fluorophores organiques ont des durées de vie de l'ordre de la nanoseconde. En général les molécules qui ont un coefficient d'absorption (extinction molaire et section efficace d'absorption) très élevé ont un faible rendement quantique et une durée de vie extrêmement courte. Par exemple l'Alexa 647 a une section efficace d'absorption de $159208 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, un rendement quantique de 33% et une durée de vie d'à peine 1 ns [77]. Un autre exemple l'Alexa 488 a une section efficace d'absorption de $52414 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, un rendement quantique de 92% et une durée de vie d'environ 4 ns.

La photostabilité correspond au nombre de cycles d'excitation et d'émission que peut subir une molécule fluorescente avant d'être désactivée de manière irréversible (photo-blanchiment). Au cours de ces cycles, environ un millième de ces excitations conduit à une transition de l'état singulet à l'état triplet ($S_1 \rightarrow T_1$). Cet état triplet T_1 a une durée de vie beaucoup plus longue que celle de l'état S_1 . Ainsi le fluorophore ne pourra plus émettre avant de retourner à l'état fondamental S_0 . Ces périodes sombres induisent un clignotement de l'émission des fluorophores, on parle de « blinking ». De plus, le fluorophore peut réagir avec l'oxygène et les radicaux libres et ainsi perdre ses propriétés de fluorescence. Ce phénomène peut être minimiser en ajoutant dans le milieu d'observation des enzymes de nettoyage telles que la glucose-oxydase et la catalase. Le photo-blanchiment se caractérise par un déclin exponentiel [78]:

$$N(t) = N_0 e^{-t/\tau_b} \quad (2.5)$$

où $N(t)$ est le nombre de molécules excitées au temps t , N_0 est la population initiale de fluorophores excités. τ_b représente le temps caractéristique de photo-blanchiment et dépend à la fois de l'intensité de la source d'excitation lumineuse et de la durée de vie du fluorophore.

La section efficace d'absorption étant proportionnelle au produit scalaire entre le champ électrique \vec{E} de la source d'excitation lumineuse et le moment dipolaire de la molécule $\vec{\mu}$. La polarisation de la source d'excitation joue alors un rôle important dans le processus de fluorescence. Les fluorophores absorbent préférentiellement les ondes lumineuses dont \vec{E} est parallèle à leur dipôle d'absorption. Prenons l'exemple de la sonde membranaire la DiO, son moment dipolaire est parallèle à la membrane lipidique (Figure 2.2). L'émission de cette molécule sera alors maximale lorsque la polarisation est parallèle à la membrane [79].

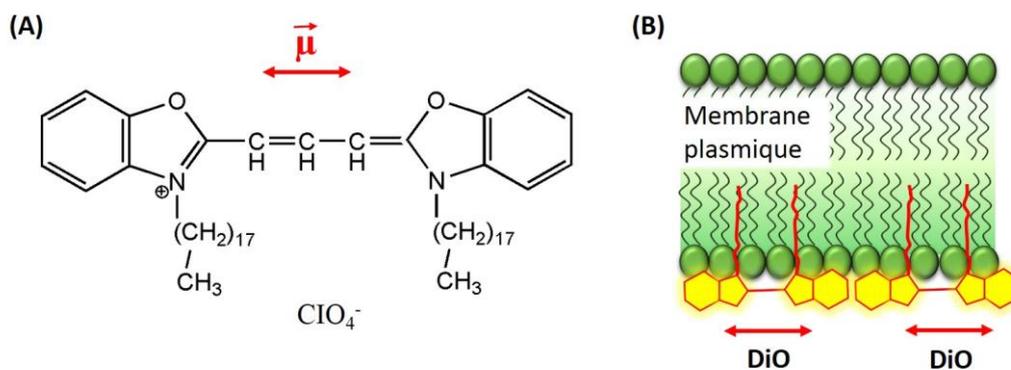


Figure 2.2 : Sonde fluorescente membranaire DiO. (A) Structure chimique de la DiO avec la flèche rouge indiquant le moment dipolaire $\vec{\mu}$ de la molécule. (B) Positionnement de la sonde au sein de la bicouche lipidique membranaire.

2.2 Marquage fluorescent en biologie cellulaire

L'utilisation des fluorophores en biologie cellulaire permet la visualisation, l'identification et la quantification des composantes intracellulaires et membranaires avec une grande précision et une spécificité élevée. Les fluorophores présentent l'avantage de pouvoir

être rendus très sélectifs dans leur capacité de se lier à certains éléments spécifiques de la cellule.

2.2.1 Marquage direct

Le marquage direct révèle un élément distinctif de la cellule en le rendant visible par adjonction d'une molécule fluorescente. Par exemple j'ai utilisé la sonde DiO (D275, Invitrogen) pour marquer la membrane lipidique cellulaire (Figure 2.3 (A)). La DiO est un colorant de la famille des carbocyanines, qui possède deux longues chaînes carbonées le rendant particulièrement amphiphile. Il est utilisé depuis les années 80 *in vitro* et *in vivo* sur des cellules et tissus vivants ou bien fixés. La DiO est faiblement fluorescente dans les solutions aqueuses, mais devient hautement fluorescente et raisonnablement photostable lorsqu'elle est incorporée dans les membranes cellulaires. Elle est facile à mettre en œuvre et ne perturbe pas l'organisation membranaire. Elle possède un rendement quantique élevé et une cytotoxicité réduite par rapport aux autres colorants hydrophiles [80]. La DiO s'insère dans la membrane plasmique de façon homogène, marquant l'ensemble de la surface de la cellule. Un autre exemple de marquage direct est le réactif MitoTracker® Red CMXRos (M7512, Invitrogen), celui-ci diffuse passivement à travers la membrane plasmique et s'accumule spécifiquement dans les mitochondries (Figure 2.3 (B)). Il s'agit d'un réactif chimique dont les groupements réagissent avec les protéines de la mitochondrie par réaction d'oxydo-réduction.

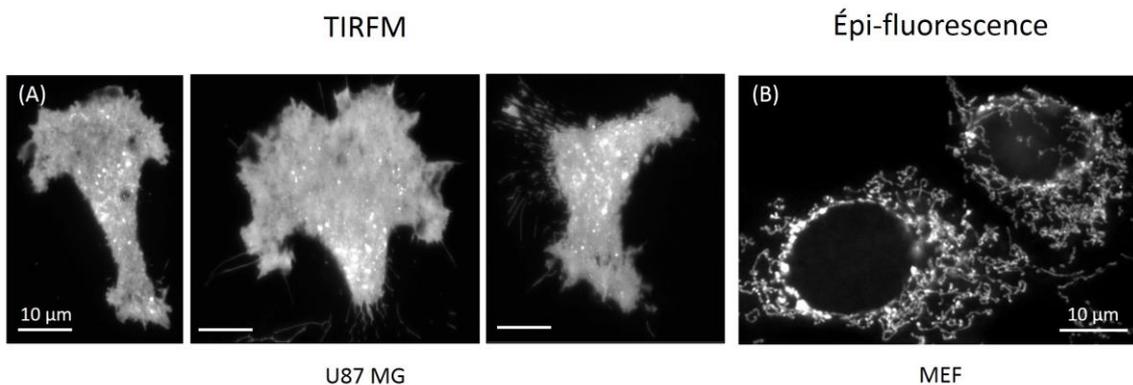


Figure 2.3 : Marquage fluorescent direct. (A) Images TIRFM de cellules U-87 MG étalées sur une fine couche de fibronectine à 37°C, illumination à l'aide d'un laser à 488 nm et d'un objectif de grandissement 60×, d'ouverture numérique 1.45. Le marquage de la membrane plasmique a été réalisé à l'aide de la molécule lipophile fluorescente DiO. La longueur d'onde d'excitation laser est 488 nm, l'irradiance est d'environ 5 W/cm², et les temps d'acquisition des images TIRF de 100 ms. (B) Images obtenues par microscopie de fluorescence de cellules MEF fixées sur une surface recouverte de fibronectine. Le marquage sélectif des mitochondries a été réalisé par le colorant Mitotracker® rouge.

2.2.2 Immunomarquage

Il n'existe pas de marqueurs directs spécifiques pour tous les composants cellulaires. Ainsi des anticorps fluorescents sont utilisés pour visualiser les différents éléments de la cellule. Il existe deux techniques d'immunomarquage. La première consiste à utiliser un anticorps couplé à un fluorophore et dirigé contre une protéine d'intérêt. Cette dernière présente peu de

sites de reconnaissance pour l'anticorps. Par conséquent l'inconvénient de cette technique est la faible intensité de fluorescence. Pour contourner ces problèmes il est préférable d'utiliser deux anticorps afin d'augmenter la spécificité de détection. Le premier est un anticorps monoclonal qui reconnaît spécifiquement la protéine recherchée. Le second un anticorps polyclonal, marqué par un fluorophore et possédant une forte affinité pour l'anticorps primaire. Un exemple est présenté dans la [figure 2.4](#) où les adhérences focales ont été visualisées en à l'aide d'un anticorps dirigé contre la paxilline. Les anticorps primaires présentent plusieurs sites de fixation pour les anticorps secondaires, ce qui augmente l'intensité de fluorescence. Cette technique est très utilisée en biologie cellulaire puisqu'on peut réaliser des marquages multiples simultanément sur une même cellule. Mais il y a quelques inconvénients, par exemple la possibilité des faux positif ou faux négatif qui peuvent fausser les résultats. Tout dépend de la spécificité et de la qualité des anticorps primaires. L'autre inconvénient majeur est qu'on travaille toujours sur des cellules fixées dans le cas d'un marquage de protéines intracellulaires. Il faut fixer et perméabiliser les membranes plasmiques auparavant pour permettre aux anticorps de retrouver leur protéine cible. Avec cette technique il n'est pas possible d'étudier des processus dynamiques.

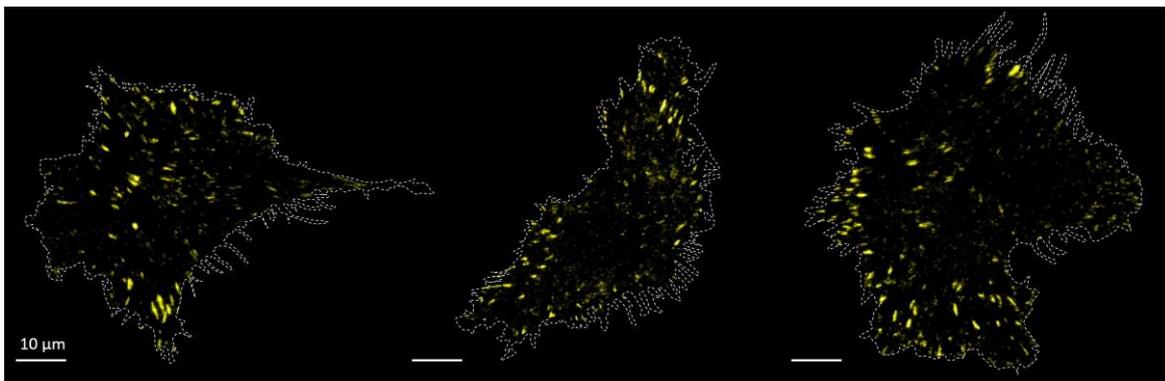


Figure 2.4 : Immunomarkage indirect. Image TIRFM de cellules U-87 MG étalées sur une fine couche de fibronectine à température ambiante, illumination à l'aide d'un laser à 561 nm et d'un objectif de grandissement 54.8×, d'ouverture numérique 1.49. La paxilline a été localisé à l'aide d'un anticorps primaire et visualisé à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à la molécule d'Alexa 568.

2.2.3 Protéines fluorescentes génétiquement modifiées

Cette technique consiste à faire exprimer le marqueur fluorescent directement par la cellule. Le gène du marqueur fluorescent est introduit dans la cellule par transfection et va se fusionner à la séquence d'ADN codant la protéine d'intérêt. Ainsi la cellule va fabriquer le fluorophore *in situ* et seules les cellules vivantes sont capables de transcrire ce gène en protéine fluorescente. La GFP (Green Fluorescent Protein) découverte dans la méduse *Aequorea victoria* [81,82] a été utilisée pour étudier la dynamique des protéines dans des systèmes vivants. Elle a une masse moléculaire de 26.9 kDa et possède deux maxima d'absorption à 395 nm et à 470 nm avec une émission vers 505 nm. Elle est très sensible et émet un signal fluorescent fort et photostable. Des variantes de la GFP ont été créés par ingénierie génétique avec des spectres d'excitation et d'émission différents ([Figure 2.5](#)). De nouvelles protéines fluorescentes

homologues de la GFP ont contribué au développement de l'imagerie multi-couleur [83,84]. Grâce à l'ingénierie génétique, au développement des méthodes d'imagerie de fluorescence et aux logiciels de traitements des images, ces protéines permettent d'explorer un grand nombre de processus biologiques. Mais elles ne sont pas toujours des sondes optimales. Elles ont tendance à oligomériser et forment parfois des protéines non fonctionnelles. La plupart des protéines fluorescentes ont une certaine sensibilité à l'acide. Cela peut fausser l'interprétation quantitative d'images si un stimulus ou une condition donnée entraîne une modification du pH intracellulaire. Pour finir, sous illumination laser continue, elles produisent continuellement un faible niveau d'espèces réactives avec l'oxygène, qui peut entraîner la mort des cellules [85].

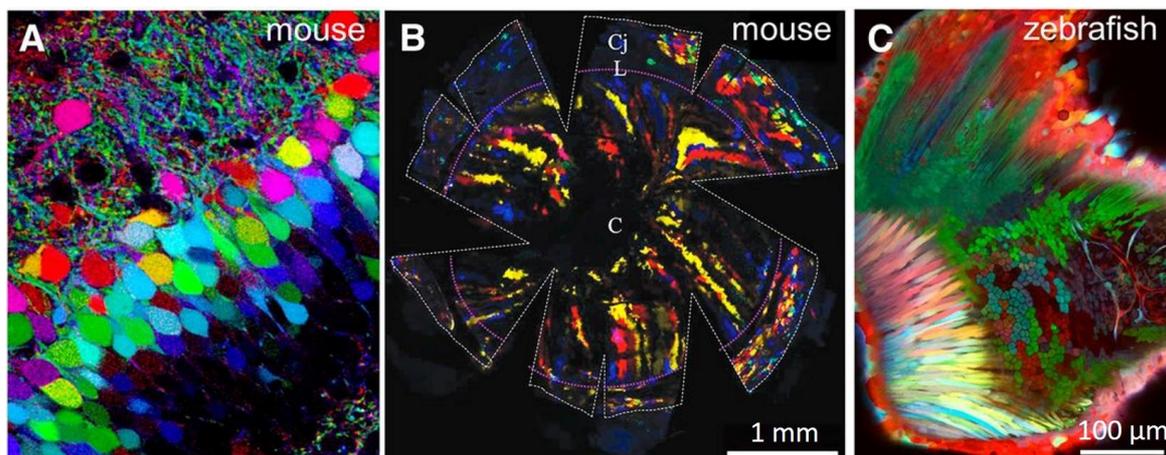


Figure 2.5 : Lignées transgéniques « Brainbow ». Cette technique utilise des combinaisons de 4 molécules fluorescentes de différentes couleurs permettant d'obtenir une palette d'environ 100 étiquettes. (A) Neurones composants le gyrus denté - une sous-structure de l'hippocampe, structure essentielle dans les processus d'apprentissage et de mémoire - d'une souris « mosaïque ». (B) Cellules de la cornée de souris qui forment des clones radiaux. (C) Nageoire pectorale du poisson zèbre. (extrait de la référence [84]).

2.3 Microscopie de fluorescence grand champ (épi-fluorescence)

La microscopie à fluorescence occupe une place importante en biologie cellulaire. Observer les cellules et leurs composants ainsi que leur dynamique, à l'aide de molécules fluorescentes est une méthode essentielle pour comprendre les fonctions cellulaires. La microscopie de fluorescence grand champ est une technique de base, où une grande surface de l'échantillon est observée simultanément.

2.3.1 Principe

La lumière d'excitation, émise par une source polychromatique (source Mercure, LED) ou monochromatique (Laser), passe à travers un filtre d'excitation qui sélectionne la longueur d'onde spécifique qui excite le fluorophore. Cette lumière d'excitation est ensuite réfléchiée par un miroir dichroïque, et focalisée dans le plan focal arrière de l'objectif (à l'aide d'une lentille). L'échantillon est ainsi éclairé par un faisceau collimaté. Les molécules fluorescentes sont alternativement excitées et leur signal de fluorescence est collecté par le même objectif. Ce signal est transmis par le miroir dichroïque et sélectionné à travers un filtre d'émission. Le filtre

d'émission bloque la lumière d'excitation résiduelle et transmet que la lumière d'émission à l'oculaire ou à la caméra (Figure 2.6).

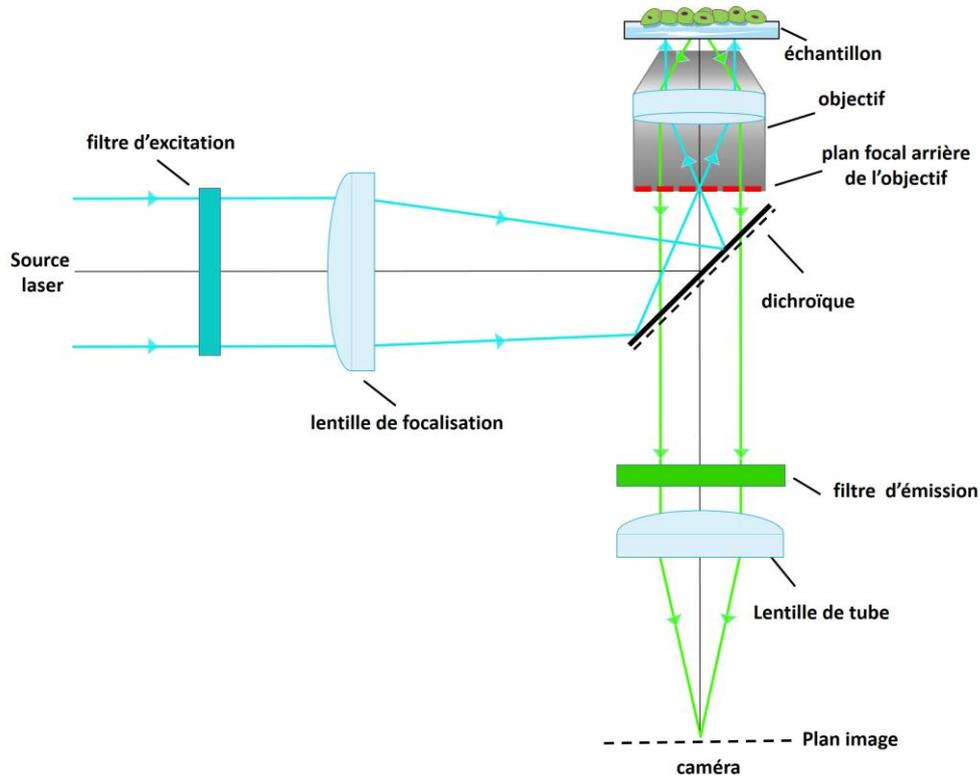


Figure 2.6 : Exemple d'un dispositif en épi-fluorescence dans un microscope inversé. Le chemin d'excitation est indiqué en bleu ; le signal de fluorescence est en vert.

Cette configuration où l'objectif est utilisé à la fois pour l'éclairage de l'échantillon et la détection du signal est reconnue sous le nom d'épi-fluorescence. Elle présente plusieurs avantages. En illumination transmise (diascopie), le condensateur et l'objectif ont deux axes optiques distincts qui doivent être bien alignés, alors qu'en épi-illumination, étant donné qu'il s'agit du même composant, l'objectif et le condensateur sont toujours parfaitement alignés. De plus, en épi-fluorescence on collecte plus de signal car lorsque les molécules sont proches du substrat, elles rayonnent plus d'énergie vers le substrat en verre (de fort indice).

Il existe également en microscopie deux types de configuration qui dépendent de l'emplacement de l'objectif par rapport à l'échantillon. L'échantillon peut être éclairé par le haut, à l'aide d'un microscope droit, ou par le bas, à l'aide d'un microscope inversé. Le microscope droit convient à la visualisation de cellules ou tissus fixés et montés sur une lame de verre. Tandis que le microscope inversé est mieux adapté à la visualisation de cellules vivantes. Ces dernières sont conservées dans des récipients relativement grands avec du milieu de culture à l'intérieur. Ainsi une configuration inversée est optimale puisqu'on a un espace libre plus important et une bonne accessibilité aux cellules. Donc pour nos expériences on a choisi un microscope inversé pour faire notre montage optique.

2.3.2 Résolution en microscopie de fluorescence standard

L'une des caractéristiques principales d'un microscope est son pouvoir de résolution, c'est-à-dire sa capacité à distinguer deux petits objets lorsque la distance qui les sépare est faible. Or un microscope optique classique possède une limite intrinsèque liée au phénomène de diffraction. Autrement dit, l'image d'un point n'est pas un point mais une tache de diffraction appelée tache d'Airy [86]. La distribution en trois dimensions de l'intensité de cette figure de diffraction est la fonction d'étalement du point (PSF pour Point Spread Function). La limite de résolution définie par Abbe en 1873, illustrée sur la [Figure 2.7](#), est basée sur l'analyse de la séparation de deux figures de diffraction identiques : deux PSF.

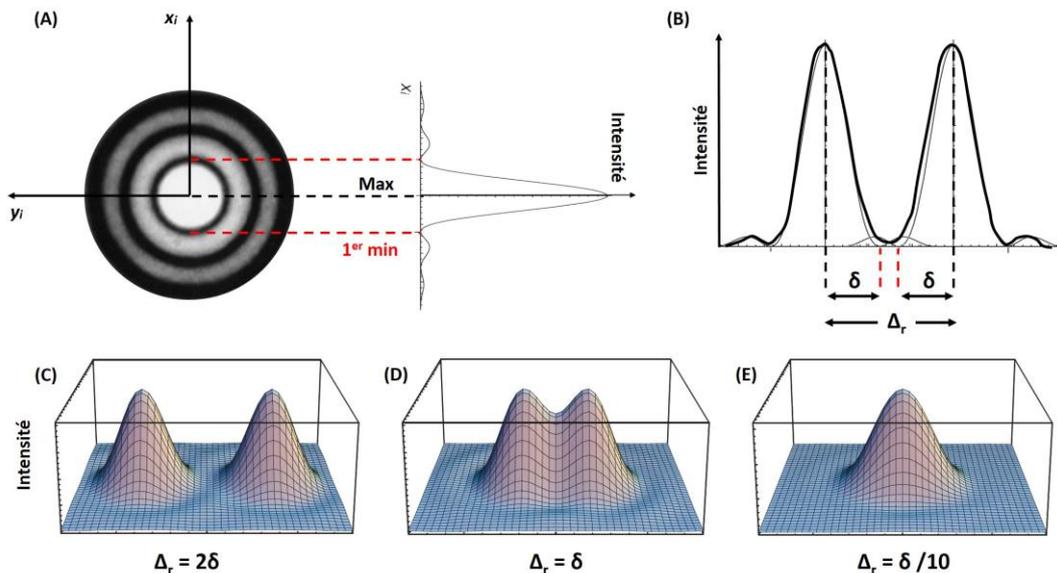


Figure 2.7 : Limite de résolution latérale selon le critère de Abbe. (A) Tache d'Airy : l'image d'un trou parfaitement circulaire donne un disque lumineux entourée d'anneaux concentriques alternativement clairs et sombres ; à droite le profil de l'intensité de la lumière. En rouge le premier minimum de la figure de diffraction. (B) Deux figures de diffraction distantes de Δ_r entre les deux maximums et δ la distance entre le maximum et le premier minimum. (C) Système résolu, (D) Système tout juste résolu et (E) Système double non résolu. L'image de deux trous est résolue lorsque $\Delta_r \geq \delta$, avec $\delta = 1.22\lambda/2ON$, où ON est l'ouverture numérique du système imageur (adapté de la référence [86]).

La résolution latérale du microscope de fluorescence dépend de la PSF. Plus la PSF est étroite, meilleure est la résolution. Elle peut être approchée selon le critère d'Abbe (premier minimum du motif de diffraction) comme suit :

$$\Delta_r = \frac{1.22 \lambda}{2 ON} = 1.22 \frac{\lambda}{2n \sin \theta} \quad (2.6)$$

Où Δ_r distance minimale entre deux objets qu'on peut distinguer, λ est la longueur d'onde moyenne de la lumière émise par l'échantillon, ON est l'ouverture numérique de l'objectif, n est l'indice de réfraction du milieu entre l'objectif et l'échantillon, θ est le demi-angle d'ouverture qui correspond à l'angle entre l'axe optique et le rayon le plus écarté de ce dernier. Ainsi la résolution dépend de l'ouverture numérique de l'objectif et de la longueur d'onde. La résolution peut être optimisée en jouant sur λ ou bien en augmentant n ou θ . On utilise des

objectifs à immersion à grande ouverture numérique ($ON > 1.4$) conçus pour travailler à proximité de la lamelle recouvrant l'échantillon. Ainsi la résolution optimale d'un microscope traditionnel dans le visible est d'environ $0.25 \mu\text{m}$. Un autre aspect important est le pouvoir de résolution axiale d'un objectif. Ce pouvoir dépend aussi de l'ouverture numérique. Il est défini par :

$$\Delta_z = \frac{\lambda}{2n} \frac{1}{\sin^2 \frac{\theta}{2}} = \frac{\lambda}{n(1 - \cos \theta)} \quad (2.7)$$

La diffraction (ainsi que les aberrations) limite la résolution axiale à environ $0.75 \mu\text{m}$ dans le visible.

2.3.3 Super-résolution

Ces 30 dernières années différentes techniques permettant de s'affranchir de la limite de diffraction ont émergé. Ces techniques ont été beaucoup utilisées pour étudier la membrane plasmique, le cytosquelette ainsi que d'autres organelles des cellules à l'échelle nanométrique [87]. La plupart d'entre elles ont fortement gagné en résolution spatiale mais ont perdu en résolution temporelle. Leur utilisation est donc limitée à l'étude d'échantillons fixés.

Citons à titre d'exemple la microscopie STED (Stimulated Emission Depletion) utilisée sur des cellules vivantes. Elle a été proposée théoriquement en 1994 [88] et démontrée expérimentalement en 2000 [89] par Hell et ses collègues. Elle est basée sur l'ingénierie de la PSF pour améliorer la résolution spatiale. Elle consiste à ajouter un faisceau laser en forme d'anneau colinéaire au faisceau d'excitation et à une longueur d'onde correspondant à l'émission stimulée des fluorophores. Ce faisceau est appelé faisceau de déplétion. Si la puissance de ce faisceau est suffisante, les fluorophores se désexcitent via l'émission stimulée et non plus par émission spontanée (fluorescence). Ce faisceau a une intensité nulle uniquement au centre de l'anneau. Ainsi, la fluorescence est inhibée dans une zone périphérique du volume d'excitation confocal et seuls les fluorophores de la petite zone centrale fluorescent. Par conséquent, la résolution spatiale est définie par la puissance du faisceau STED, et non pas par la diffraction. Cette technique permet d'atteindre des résolutions nanométriques, typiquement $10\text{-}20 \text{ nm}$. Sur un échantillon pour lequel les phénomènes de photo-dégradation ne posent pas de problème, des résolutions spatiales latérales inférieures à 5 nm ont été obtenues. Le prix à payer pour cela est d'augmenter considérablement la puissance de la source STED ($\geq 10^7 \text{ J/cm}^2$) [90]. Le problème est que cette dose est bien au-delà de la dose létale d'irradiation mesurée sur des cellules vivantes qui est typiquement de l'ordre de $10^4 - 10^5 \text{ J/cm}^2$ dans le visible [91,92]. Ainsi cette technique, peut endommager les cellules même celles fixées et induire des modifications structurelles et fonctionnelles des protéines cellulaires.

D'autres techniques sont basées sur la nano-localisation de molécules uniques individuellement photoactivées comme la microscopie PALM proposée par Eric Betzig en 2006 [93] et la microscopie STORM proposée par l'équipe de Michael J. Rust et Mark Bates en 2006

[94] et leurs nombreuses déclinaisons. Ces deux méthodes sont identiques dans le principe mais n'utilisent pas le même type de fluorophore. Elles consistent à utiliser des marqueurs fluorescents photo-activables c'est-à-dire qui ont plusieurs états stables et qui changent d'état par excitation à une longueur d'onde donnée. Chaque molécule activée produit une tache de fluorescence dont la taille est donnée par la limite de diffraction. Le barycentre de cette tache peut être localisé avec une précision de l'ordre de quelques nanomètres. Un nombre limité de molécules fluorescentes sont activées et désactivées à un moment donné. Ceci permet de déterminer et de différencier leurs positions par un algorithme de localisation. Ce cycle est répété des milliers de fois pour obtenir les positions de toutes les molécules. Les résultats sont ensuite utilisés pour reconstruire l'image de super-résolution de tout le champ de vision. Le gain en résolution concerne la résolution latérale et axiale. Ces techniques utilisent des doses d'au moins 10^3 à 10^6 J/cm² qui peuvent induire des modifications notables sur la cellule durant le temps d'exposition. Le deuxième inconvénient majeur de ces nouvelles techniques d'observation (à part la photo-toxicité) est la nécessité de fixer les cellules, qui limitent leur utilisation pour des études dynamiques.

Il existe d'autres techniques à haute résolution qui utilisent des substrats plus ou moins opaques pour localiser des molécules fluorescentes le long de l'axe optique avec une précision nanométrique. Par exemple la microscopie interférentielle par balayage de l'angle d'incidence (SIM pour Scanning Angle Interference Microscopy) utilise un substrat de silicium réfléchissant [95]. Dans cette méthode la variation axiale de l'intensité de l'excitation dérive de l'interférence entre la lumière incidente et celle réfléchi par le substrat de silicium. En variant la polarisation et l'angle d'incidence de la lumière d'excitation, les auteurs peuvent déterminer la hauteur d'un fluorophore avec une résolution axiale et temporelle élevées. La limite de cette technique est l'utilisation d'un substrat réfléchissant opaque. Ainsi les techniques classiques d'imagerie en champ clair (contraste de phase ou interférentiel) ne peuvent pas être utilisées pour vérifier le bon état physiologique des cellules. Un autre exemple est la microscopie MIET (Metal-Induced Energy Transfer). Cette technique exploite la modification de la durée de vie de fluorescence à proximité de substrats plasmoniques (couche mince métallique) afin de déterminer la hauteur des molécules [96]. Cette technique repose sur l'effet Purcell lorsqu'un émetteur est couplé avec un film métallique. Cette méthode permet de déterminer la hauteur des membranes cellulaires avec des résolutions nanométriques, mais n'est toujours pas compatible avec des observations en champ clair des cellules. L'utilisation de substrat opaques peut être contournée en réalisant sur la base d'un microscope en épi-fluorescence traditionnel, une détection du signal aux angles supérieurs à l'angle critique avec la microscopie SAF (Supercritical Angle Fluorescence) [97,98] et va-TIRFM [4,5]. Ces deux techniques offrent aussi une résolution axiale nanométrique.

Ainsi, les techniques de super-résolution représentent un progrès considérable, chacune possède des avantages et des inconvénients qui lui sont propres. À l'heure actuelle, il n'existe pas de système idéal qui combine une super-résolution nanométrique en trois dimensions et une imagerie d'échantillons avec des temps d'acquisition et des puissances d'illumination adaptés à l'étude de cellules vivantes.

2.4 Microscopie de fluorescence par réflexion totale interne

2.4.1 Introduction

La microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF) introduite par Axelrod au début des années 80 [99], repose sur une excitation évanescente produite par réflexion totale interne. Le déclin rapide du champ évanescent dans la direction perpendiculaire à la surface réduit la région observée à une couche mince de quelques centaines de nanomètres au-dessus de l'interface. Le principe de la microscopie TIRF, i.e. la réflexion totale interne, était développé et utilisé depuis le début du XX^{ème} siècle (Figure 2.8). Depuis les années 90, la microscopie TIRF s'est progressivement imposée pour imager en temps réel des échantillons biologiques avec un bon rapport signal/bruit. Cette technique est parfaitement adaptée à l'étude d'activités biologiques près de la membrane cellulaire telles que l'endocytose, l'exocytose et l'adhérence cellulaire. Bien qu'une seule image TIRF ne fournisse pas d'informations axiales quantitatives, des acquisitions TIRF à angles variables (va-TIRF) peuvent être utilisées par exemple, pour estimer très précisément la distance qui sépare la membrane plasmique du support.

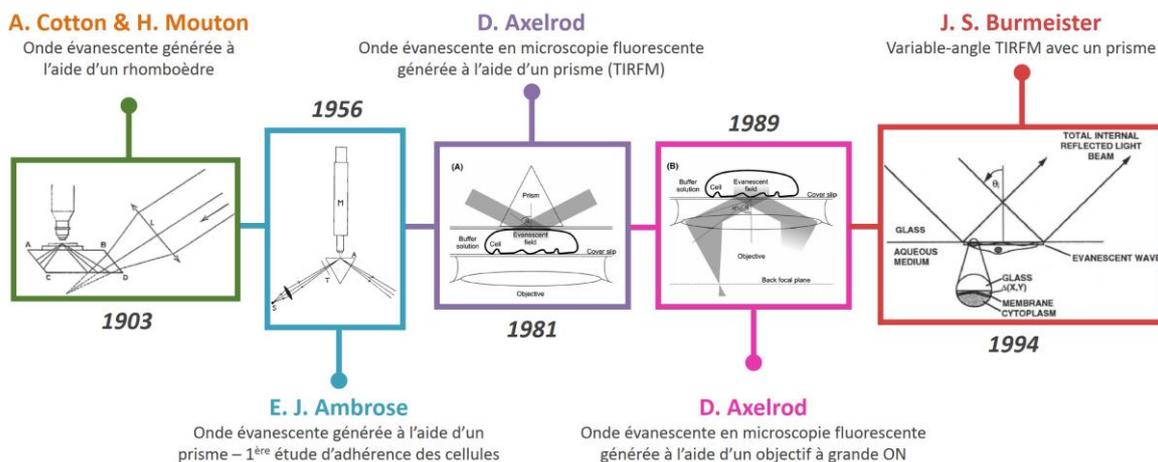


Figure 2.8 : Historique de la microscopie TIRF. Cotton et Mouton [100] ont utilisé pour la première fois la réflexion totale en microscopie à l'aide d'un rhomboïdre pour observer la diffusion de particules colloïdales. Ce premier système n'utilisait pas encore la fluorescence. Par la suite cette approche a été reprise par Ambrose en 1956 [101] pour l'étude de l'adhérence de cellules : il a utilisé un simple prisme à réflexion totale à la place du rhomboïdre. Au début des années 80, Axelrod a contribué fortement à populariser le TIRF pour les applications en biologie [99,102]. Il a proposé d'observer un signal de fluorescence au lieu de regarder la diffusion. Depuis, une grande variété de montages optiques a été proposée pour quantifier la distance entre la cellule et le substrat. En 1992 Burmeister a amélioré cette technique de quantification en développant le TIRF à angle variable(va-TIRF) [103,104].

2.4.2 Principe de la microscopie TIRF

La microscopie TIRF suit les lois de Snell-Descartes. Lorsqu'un faisceau de lumière incident rencontre une interface qui sépare deux milieux différents (tels que l'interface verre/eau), une partie de la lumière est réfléchiée dans le milieu incident alors que l'autre partie est transmise (réfractée) dans le second milieu (Figure 2.9 (A)). Si l'angle incident θ est

supérieur à l'angle critique θ_c , on observe un phénomène de réflexion totale dans le milieu le plus réfringent (Figure 2.9 (D)), défini comme suit :

$$\theta_c = \arcsin \frac{n_2}{n_1} \quad (2.8)$$

où n_1 est l'indice de réfraction le plus élevé (dans notre cas l'indice de verre, par exemple $n_{\text{verre}}=1.5298$ à 488 nm), n_2 est l'indice de réfraction du milieu d'observation (typiquement de l'eau, $n_{\text{eau}}= 1.3368$ à 488 nm). L'angle critique est aux alentours de 60.9° pour l'interface verre/eau. Lorsque $\theta_i > \theta_c$, la lumière incidente étant totalement réfléchi dans le verre, il existe une onde évanescente dans le milieu n_2 . Cette dernière se caractérise par un déclin exponentiel du champ électromagnétique dans l'eau (Figure 2.9 (B)) sur une distance de quelques centaines de nanomètres.

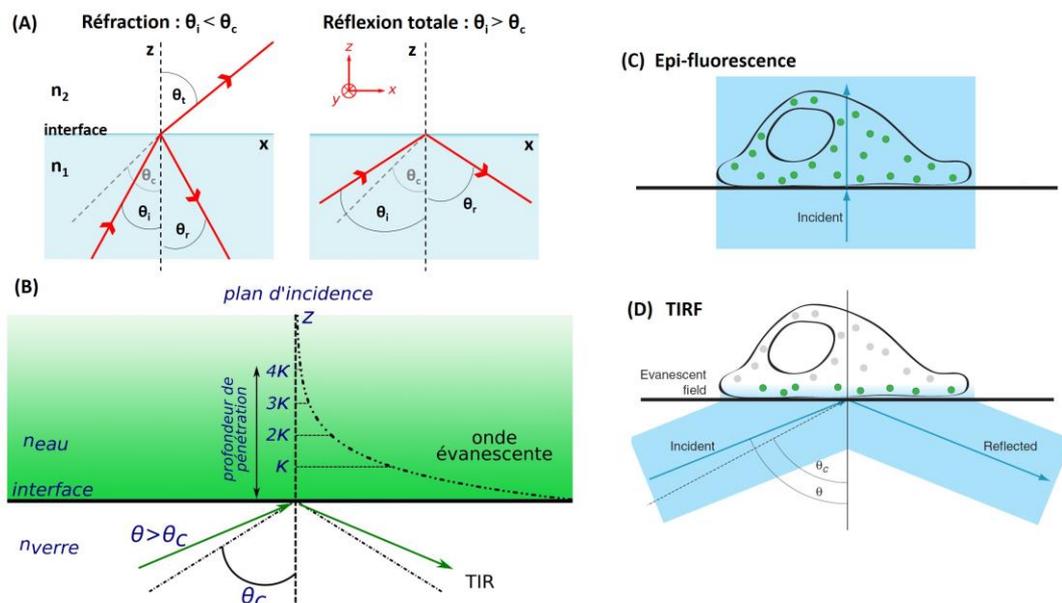


Figure 2.9 : Les bases physiques de l'éclairage TIRF. (A) Illustration des lois de Snell-Descartes : milieu incident représenté en bleu (verre) et faisceau lumineux en rouge où θ_i , θ_r , θ_t , et θ_c définissent respectivement les angles incident, réfléchi, transmis et critique. (B) Une onde évanescente générée quand $\theta > \theta_c$ avec une profondeur de pénétration d'environ 3κ (κ est la longueur d'atténuation). (extrait B adapté de la référence [36]). (C) Epi-fluorescence où le faisceau incident traverse l'interface, ainsi tous les fluorophores de l'échantillon sont excités, ici une cellule marquée avec des fluorophores en vert. (D) Imagerie TIRF où le faisceau incident est réfléchi sur l'interface et un champ évanescent est généré sur le côté opposé dans l'échantillon. Seuls les fluorophores dans le champ évanescent sont excités, comme indiqué par la couleur verte. (C et D adaptés de la référence [105]).

2.4.3 TIRF : Cadre théorique

2.4.3.1 Longueur d'atténuation de l'onde évanescente

De nombreuses applications TIRF nécessitent de connaître la profondeur de la couche illuminée, par exemple pour quantifier le mouvement de molécules ou d'organelles cellulaires à proximité du substrat. Ainsi il faut bien caractériser cette onde évanescente créée à l'interface

diélectrique verre/eau. Cette dernière se caractérise par un déclin exponentiel de l'intensité avec une distance h perpendiculaire à la surface [99] (l'interface est dans le plan (x,y) et l'axe optique correspond à l'axe z) :

$$I(z) = I_0 e^{-h/\kappa} \quad (2.9)$$

Où $I(z)$ est l'intensité de l'onde évanescente (en W/cm^2), I_0 est la valeur de $I(z)$ pour $z = 0$ et κ est la longueur d'atténuation de l'onde évanescente. Elle est typiquement de l'ordre de 100 nm dans le visible. Elle dépend de l'angle incident θ . Elle diminue quand θ augmente, à l'exception pour $\theta = \theta_c$ où κ tend vers l'infini. Ainsi, pour $\theta > \theta_c$, la longueur d'atténuation est donnée par :

$$\kappa(\theta) = \frac{\lambda}{4\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2}} \quad (2.10)$$

L'intensité de l'onde évanescente devient négligeable pour une profondeur de pénétration supérieure ou égale à 4κ (Figure 2.9 (B)). Ainsi la portée maximale de l'onde évanescente est d'environ 300-400 nm au-delà de l'interface. Un autre aspect notable de l'onde évanescente est qu'elle se propage sur une faible distance le long de l'interface, provoquant un petit décalage latéral du faisceau réfléchi par rapport au faisceau incident. On parle du décalage de Goos-Hänchen [106]. Ce décalage n'est pas évident à observer expérimentalement car il est typiquement de l'ordre de la longueur d'onde.

Le champ évanescent créé en TIRF à l'aide d'un objectif de grande ouverture numérique n'est pas purement exponentiel selon l'axe z [107–110]. En effet une composante propagatrice résiduelle apparaît même lorsque $\theta > \theta_c$ [111]. Cette source de lumière parasite est probablement produite par des réflexions multiples dans l'objectif. En sortie de l'objectif, on aura une superposition de lumière propagatrice et évanescente. L'équipe de P. Schwille a développé un échantillon de calibration permettant de caractériser directement le champ d'excitation du TIRF [112]. Leur échantillon comporte dix échelons allant de 25 à 550 nm, fabriqués à partir d'un polymère dont l'indice de réfraction correspond à celui de l'eau (Figure 2.10 (A)). Des fluorophores en solution aqueuse sont déposés en dessus des échelons et ainsi leur profil d'excitation est étudié à différentes hauteurs. Les profils d'excitation obtenus montrent qu'à proximité de l'interface, la majorité du signal (90%) correspond à un déclin exponentiel rapide, dont la longueur de pénétration κ correspond à la profondeur attendue du champ évanescent. Le reste du champ (10%) correspond à un déclin lent, dû à la diffusion de la lumière dans l'objectif (Figure 2.10 (C)). À mesure que la distance h augmente, la contribution évanescente diminue et la lumière diffusée domine le champ d'excitation (Figure 2.10 (B)).

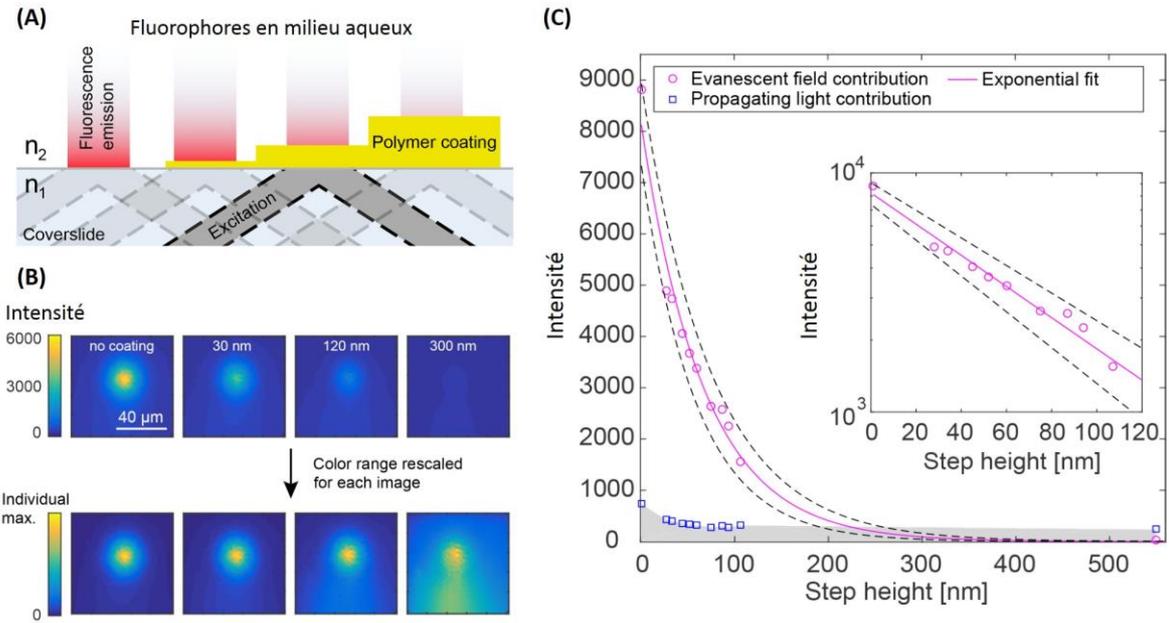


Figure 2.10 : TIRF à l'aide d'un objectif de grande ON. (A) Echantillon de calibration. (B) Images représentatives du fluorophore Alexa 488. En haut : on observe que l'intensité diminue quand on s'éloigne de l'interface verre/milieu aqueux. En bas : images correspondantes à la partie non évanescente des images du haut. À mesure que la hauteur augmente, l'amplitude relative des contributions évanescentes et non-évanescentes se déplace vers la partie non-évanescente. (C) Données de calibration pour un angle d'incidence de 71.71° . Intensité de la partie évanescente (cercles) en déclin rapide et la partie non-évanescente (carrés) plutôt constante. Un ajustement exponentiel (trait continu, avec des lignes en pointillés représentant des intervalles de confiance à 95% des paramètres d'ajustement). (Images adaptées de la référence [112]).

2.4.3.2 Polarisation de l'onde évanescente

L'amplitude de l'onde évanescente dépend de l'état de polarisation de la lumière incidente [113,114]. La polarisation peut être soit s ou TE (transverse électrique), soit p ou TM (transverse magnétique). La lumière incidente polarisée s (pol-s) correspond à un champ électrique orienté parallèlement à l'interface (selon l'axe y), quel que soit l'angle d'incidence (Figure 2.11 (A)). Dans cette configuration, toutes les molécules fluorescentes ayant un dipôle de transition orienté suivant y seront efficacement excités. L'expression de la variation relative d'intensité en $z = 0$ en pol-s, notée γ_s , est donnée par [36] avec $n' = \frac{n_2}{n_1}$:

$$\frac{I_0^s(\theta < \theta_c)}{I_0^s(\theta = 0)} = \gamma_s(\theta < \theta_c) = (1 + n')^2 \frac{\cos^2 \theta}{(\cos \theta + \sqrt{n'^2 - \sin^2 \theta})^2} \quad (2.11)$$

$$\frac{I_0^s(\theta \geq \theta_c)}{I_0^s(\theta = 0)} = \gamma_s(\theta \geq \theta_c) = (1 + n')^2 \frac{\cos^2 \theta}{1 - n'^2} \quad (2.12)$$

Dans le cas de polarisation p (pol-p), le champ électrique possède une composante perpendiculaire à l'interface (selon l'axe z) et une composante parallèle dans la direction x (Figure 2.11 (B)) [113,114]. Ainsi dans cette configuration, les fluorophores ayant un dipôle orienté perpendiculairement à l'interface peuvent être excités. L'expression de la variation relative d'intensité en $z = 0$ en pol-p, notée γ_p , est donnée par [36]:

$$\frac{I_0^p(\theta < \theta_c)}{I_0^p(\theta = 0)} = \gamma_p(\theta < \theta_c) = n'^2(1 + n')^2 \frac{\cos^2 \theta}{(\sqrt{n'^2 - \sin^2 \theta} + n'^2 \cos \theta)^2} \quad (2.13)$$

$$\frac{I_0^p(\theta \geq \theta_c)}{I_0^p(\theta = 0)} = \gamma_p(\theta \geq \theta_c) = (1 + n')^2 \frac{\cos^2 \theta (2 \sin^2 \theta - n'^2)}{n'^4 \cos^2 \theta + \sin^2 \theta - n'^2} \quad (2.14)$$

Ainsi le signal de fluorescence dépend de l'état de polarisation du faisceau incident. Dans mon montage optique j'ai choisi la configuration s puisque j'utilise la DiO pour marquer la membrane des cellules. Comme la DiO a un moment dipolaire de transition parallèle au plan de la membrane. Son émission est optimale lorsque la polarisation de la lumière excitatrice est parallèle au dipôle (pol-s).

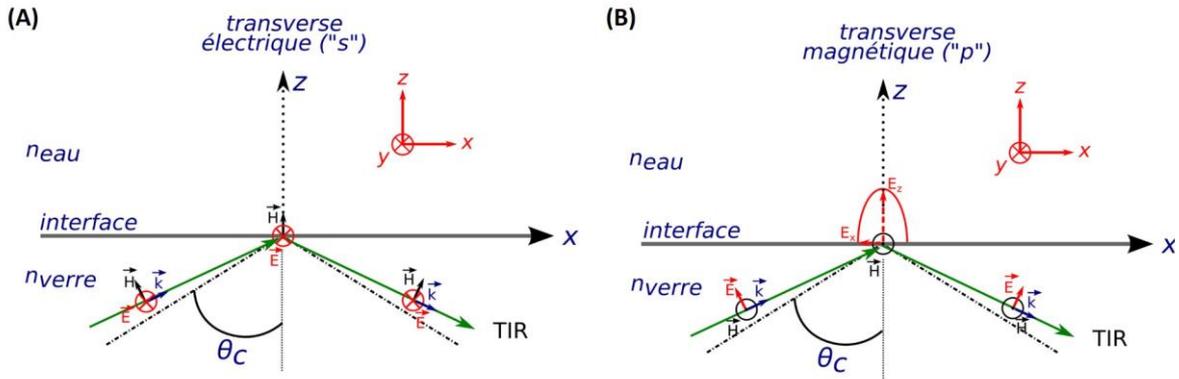


Figure 2.11 : États de polarisation d'une onde évanescente. (A) En pol-s, le champ électrique \vec{E} est toujours parallèle à l'interface (suivant y). (B) En pol-p, le champ électrique a deux composantes, l'une perpendiculaire (suivant z) l'autre parallèle (suivant x) à l'interface. (extrait de la référence [36]).

La figure 2.12 montre l'évolution théorique de l'amplitude I_0 de l'onde évanescente pour les deux polarisations s et p en fonction de l'angle d'incidence θ . Pour pouvoir comparer les deux états de polarisation, I_0 a été normalisée par sa valeur à $\theta = 0^\circ$. L'intensité de l'onde évanescente tend vers zéro quand $\theta \rightarrow 90^\circ$. Pour les angles supercritiques, $\theta > \theta_c$ l'amplitude de l'onde évanescente est égale ou supérieure à l'intensité en $\theta = 0$. On observe une différence

nette entre les deux courbes au niveau de l'angle critique θ_c . L'intensité présente un maximum au niveau de l'angle critique, avec $\gamma_s = 3.49$ et $\gamma_p = 4.62$ respectivement en polarisation s et p pour l'interface verre/eau.

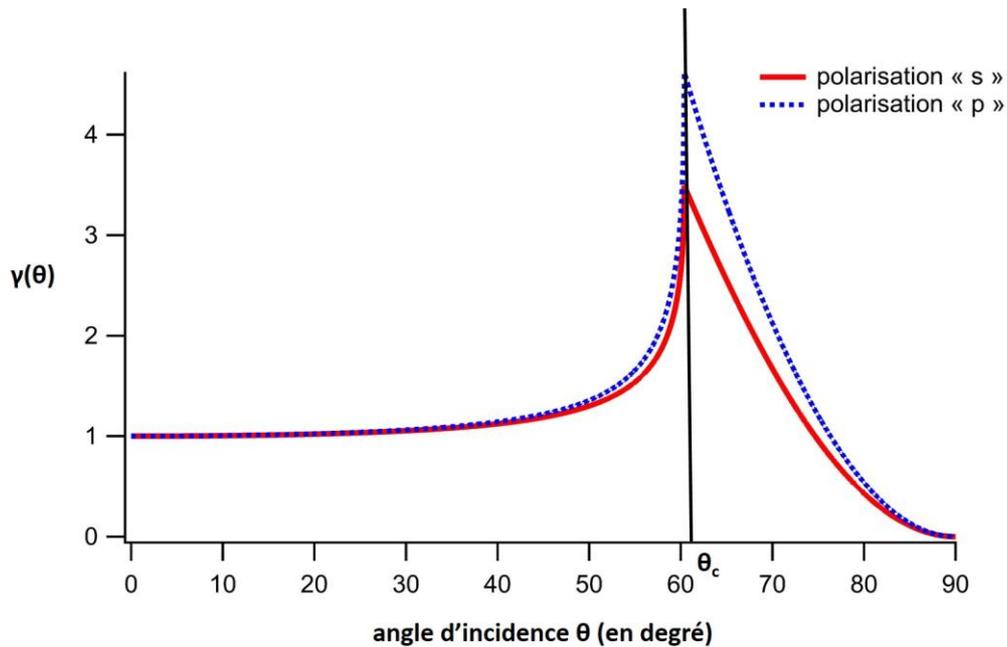


Figure 2.12 : Evolution du facteur γ en fonction de l'angle d'incidence et de l'état de polarisation du faisceau laser pour l'interface verre/eau. En polarisation s la première partie où $\theta < \theta_c$ est modélisée par l'équation (2.11) et la deuxième partie au-dessus de l'angle critique est modélisée par l'équation (2.12) (courbe rouge). Concernant la polarisation p représentée par la courbe bleue, ce sont les équations (2.13) et (2.14) qui la modélisent. Les indices de réfraction n_{verre} et n_{eau} valent respectivement 1.53 et 1.33. L'angle critique pour l'interface verre/eau vaut 60.4° .

2.4.4 Configuration sans prisme vs avec prisme⁵

En microscopie TIRF l'illumination peut se faire suivant deux configurations différentes [109,114]. La première configuration est basée sur l'utilisation d'un prisme pour diriger la lumière vers l'interface, tandis que la deuxième utilise un objectif de grande ouverture numérique ($ON > 1.4$).

2.4.4.1 Montage avec un objectif de grande ouverture numérique

Dans ce premier type de montage, le faisceau d'excitation passe à travers un objectif de grande ouverture numérique avec un angle d'incidence supérieur à l'angle critique. La fluorescence est ensuite collectée par le même objectif. Le faisceau laser utilisé pour l'excitation est focalisé (à l'aide d'une lentille) sur un point situé dans le plan focal arrière de l'objectif (BFP, Back focal Plane). Ainsi le faisceau qui émerge de l'objectif est collimaté. Le régime évanescent est atteint lorsque le spot de focalisation est déplacé à la périphérie du BFP. Le

⁵ Cette partie est basée en majorité sur les informations contenues dans les articles de Daniel Axelrod [109,114].

faisceau émerge dans l'huile à immersion avec un angle maximal θ_{max} (mesuré à partir de l'axe optique) et donné par :

$$ON = n_{huile} \sin \theta_{max} \quad (2.15)$$

Puisque $n \sin \theta$ est conservé (par la loi de Snell-Descartes) lorsque le faisceau traverse les différentes interfaces, alors :

$$ON = n_1 \sin \theta_{1max} \quad (2.16)$$

où n_1 est l'indice de la lamelle et θ_{1max} représente l'angle maximal dans le verre. Pour que la réflexion totale interne se produise à l'interface avec un milieu aqueux d'indice de réfraction n_2 , θ_1 doit être supérieur à l'angle critique donné par :

$$n_2 = n_1 \sin \theta_c \quad (2.17)$$

D'après les équations (2.16) et (2.17), il est clair que l'ouverture numérique ON doit être supérieure à n_2 pour qu'on puisse créer des ondes évanescentes. Ceci n'est pas un problème car on sait fabriquer depuis de nombreuses années des objectifs de grande ouverture numérique, $ON > 1.4$. Durant ma thèse j'ai utilisé les objectifs Olympus 60×, d'ON = 1.45 et 1.49 ainsi que les objectifs Zeiss 100× et 60× d'ON = 1.46. Ces derniers sont adaptés pour le TIRF sur les cellules et utilisent une huile d'immersion et des lamelles en verre standards ($n_{verre} \approx 1.52 - 1.53$). Il existe des objectifs de plus grande ON qui sont aussi bien adaptés pour faire du TIRF sur des cellules vivantes, tels que l'objectif Olympus 100× d'ON = 1.65. Toutefois cet objectif nécessite d'utiliser des lamelles de verre très chères, d'indice de réfraction ≈ 1.78 (telles que LAFN21 (Olympus) ou SF11 (VA Optical Co)). Il requiert également une huile spéciale d'indice 1.78 (Cargille), qui est volatile et laisse un résidu cristallin sur l'objectif.

Un microscope TIRF qui utilise des objectifs à huile peut être configuré de plusieurs manières. L'angle de convergence/divergence du faisceau laser au niveau du BFP est proportionnel au diamètre de la région éclairée dans l'échantillon. Pour produire un grand angle (et par conséquent une grande région d'irradiation), il faut utiliser un élargisseur de faisceau placé juste en amont de la lentille de focalisation (Figure 2.13). L'angle d'incidence peut être facilement ajusté entre un éclairage épi standard ($\theta = 0$) et le TIR ($\theta > \theta_c$). L'angle d'incidence est ajusté en déplaçant par exemple la lentille de focalisation.

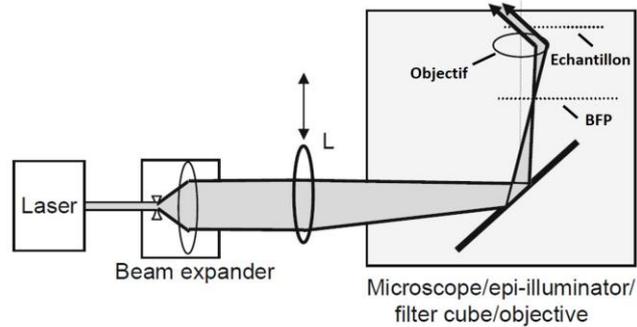


Figure 2.13 : Exemple de configuration de microscopie TIRF basée sur l'utilisation d'un objectif à immersion. Un éclairage laser par la sortie latérale du microscope (nécessite un miroir dichroïque tourné vers cette sortie). Le faisceau est focalisé au niveau du plan focal arrière. Le déplacement de la lentille de focalisation L modifie l'angle d'incidence au niveau de l'échantillon et permet d'échanger entre un éclairage en épi-fluorescence et un éclairage supercritique (TIRF). (extrait de la référence [114]).

2.4.4.2 Montage avec un prisme

Dans ce deuxième type de montage, l'illumination et la détection se font suivant deux voies séparées. Le faisceau d'excitation passe à travers un prisme, excite l'échantillon en réflexion totale interne et ensuite la fluorescence est collectée par un objectif. Même si un prisme peut limiter l'accessibilité à l'échantillon, ce montage produit un champ évanescent plus propre (on n'observe pas de résidu non-évanescent dans l'échantillon (Figure 2.10)). La figure 2.14 montre plusieurs schémas pour la mise en place d'un TIR basé sur un prisme dans des microscopes inversés. Dans cette configuration, un faisceau incident focalisé est introduit dans la lamelle à travers un prisme.

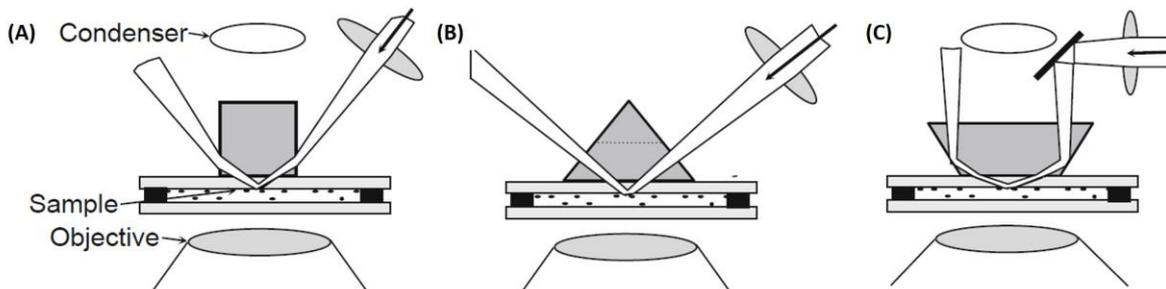


Figure 2.14 : Schémas de microscopie TIRF basée sur l'utilisation de prismes dans un microscope inversé. Le prisme est au-dessus de l'échantillon. Le porte-échantillon se compose de deux lamelles séparées par un anneau en téflon de 60 mm d'épaisseur. Dans ces configurations les cellules sont orientées vers le bas. La lamelle de dessus est séparé du prisme par une couche fine d'huile d'immersion ou de glycérol. La position latérale du prisme est fixée mais l'échantillon peut être translaté tout en maintenant contact avec le prisme. La flèche indique le sens du faisceau incident. (extrait de la référence [114]).

Le principal avantage de cette technique est que l'angle d'incidence peut être très grand ($\theta > 75^\circ$). Par conséquent, le champ évanescent décroît très vite dans l'échantillon et les images sont très contrastées. L'indice de réfraction du prisme peut ne pas correspondre exactement à l'indice de la lamelle de verre dans laquelle se déroule le TIR. Le prisme et la lamelle sont couplés optiquement avec du glycérol ou de l'huile d'immersion. Cette dernière a un indice de réfraction assez élevé (pour éviter une réflexion totale interne à l'interface prisme/huile à des

angles d'incidence faibles), mais elle a une tendance à produire une auto-fluorescence non négligeable (même celles définies comme étant à fluorescence extrêmement faible). Le recours à un prisme pour l'introduction du faisceau d'éclairage présente plusieurs limites, principalement en raison de contraintes géométriques. Il existe différents types de prisme, mais la plupart limitent l'accès à l'échantillon. Ceci rend difficile les manipulations, l'injection de milieu dans l'échantillon ou la réalisation de mesures physiologiques. Deux inconvénients majeurs viennent s'ajouter à ce problème d'accessibilité : l'image de la zone irradiée, produite par l'objectif, se fait à travers le corps cellulaire. La cellule se comporte comme un système diffusant très hétérogène, la qualité de l'image de fluorescence ainsi que la résolution du microscope sont grandement affectées. De plus, l'émission des fluorophores présents au voisinage du substrat se fait préférentiellement vers le substrat. Autrement dit, l'objectif ne collecte qu'une petite partie du signal de fluorescence utile.

3. DISPOSITIF EXPERIMENTAL

VA-TIRFM

L'équipe dans laquelle j'ai réalisé ma thèse a développé ces dernières années une nouvelle version de la microscopie va-TIRFM [4]. Au cours des trois dernières années, j'ai beaucoup travaillé sur l'optimisation du dispositif expérimental et sur la calibration de l'angle d'incidence. Dans ce chapitre je vais vous présenter la version finale de ce dispositif ainsi que la procédure pour calibrer l'angle d'incidence.

3.1 Principe du va-TIRFM

3.1.1 Introduction

Suite aux travaux d'Axelrod dans les années 80, la microscopie TIRF s'est très largement démocratisée en biologie et en biophysique. Elle est utilisée par exemple, pour étudier le trafic vésiculaire lié aux phénomènes d'endocytose et d'exocytose [115], la cinétique des interactions protéiques [116] ou encore les contacts cellule/substrat [99,103,117]. Plusieurs travaux ont montré qu'il est possible d'utiliser les propriétés du champ évanescent pour mesurer des distances axiales séparant la membrane cellulaire du substrat. Les premiers travaux dans ce domaine ont été publiés en 1985. D'une part, Gingell et al. ont cartographié la partie ventrale de la cellule en contact avec le verre [118], en ajoutant du dextran marqué avec de la fluorescéine dans le milieu de culture. Ils ont trouvé que les contacts focaux apparaissaient sous forme de zones sombres liées à une faible absorption du dextran. Ainsi ils ont montré que l'intensité de fluorescence totale en un point donné par TIRF dépend de la distance qui sépare la cellule du verre. D'autre part, Lanni et al. ont étudié la distribution spatiale de différents constituants cellulaires [49]. Ils ont utilisé deux angles d'incidence pour calculer la distance cellule/substrat et ont montré que cette dernière est de ≈ 50 nm dans les contacts focaux et de ≈ 70 nm dans les « contacts proches ». Leur approche était limitée à de petites régions de la cellule. Quelques années plus tard, Truskey et al. [103] ont amélioré la technique de quantification de la distance membrane/substrat en développant le TIRF à angle variable. Cette technique permet de contrôler la profondeur d'atténuation κ de l'onde évanescence en ajustant l'angle d'incidence θ . Les auteurs sont arrivés à des profondeurs d'atténuation de l'ordre de

100 nm. Leur dispositif a permis de cartographier la distance membrane/substrat même si la membrane est éloignée du substrat (≈ 200 nm). Plus récemment, Stock et al. [119] ont montré par une méthode similaire que la majorité de la membrane plasmique se trouve entre 100 et 200 nm du substrat alors que les contacts focaux se trouvent entre 0 et 50 nm du substrat. L'inconvénient majeur de ces premiers dispositifs TIRF à angle variable est qu'ils utilisaient un prisme pour créer les ondes évanescentes (voire la discussion dans la section 2.4.4.2) Récemment notre équipe a mis en place un nouveau dispositif va-TIRFM sans prisme. Il consiste à enregistrer une série d'images TIRF à différents angles d'incidence (Figure 3.1). Cette méthodologie permet ainsi de reconstruire la topographie de toute la partie ventrale de la cellule avec une précision nanométrique.

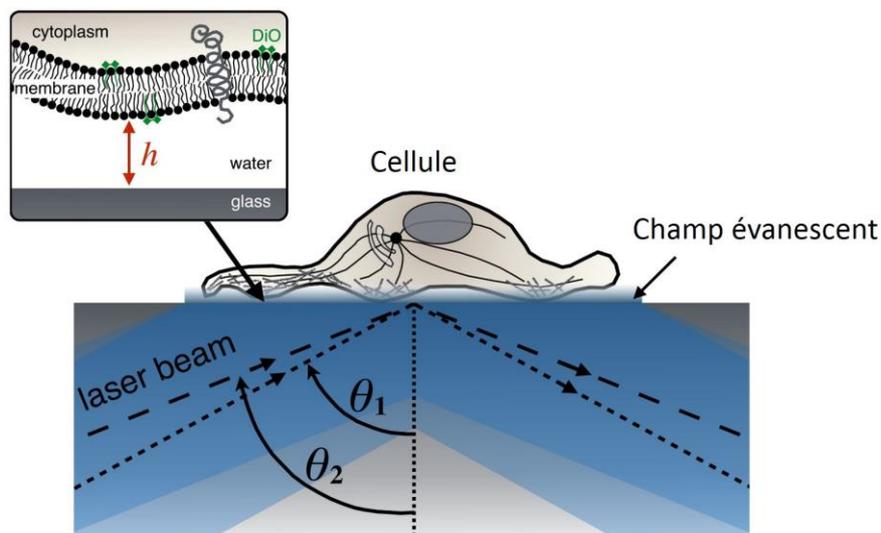


Figure 3.1 : Illustration du principe de fonctionnement du va-TIRFM sur une cellule adhérente. Les ondes évanescentes, créées au voisinage de l'interface verre/eau, permettent d'exciter uniquement la membrane plasmique et le cortex cellulaire en contact avec le substrat. Ainsi, le reste de la cellule est préservé de toute irradiation. La hauteur h qui sépare la membrane du substrat est déterminée par va-TIRF en faisant varier l'angle d'incidence θ du faisceau laser et en marquant la membrane à l'aide de la DiO.

Notre dispositif TIRF sans prisme présente plusieurs avantages par rapport aux systèmes commerciaux. Tout d'abord, on a un grand champ d'observation de $\approx 200 \mu\text{m}$ de large permettant de suivre l'adhérence et la migration de grandes cellules (la très grande majorité des systèmes commerciaux ont un champ d'observation inférieur à $50 \mu\text{m}$). Ensuite, on utilise un miroir rotatif monté sur une platine de rotation dotée d'une grande précision angulaire (10^{-4} degrés). Ce miroir ajuste rapidement et très précisément la position du faisceau laser dans le plan focal arrière (BFP pour Back Focal Plane) de l'objectif. De plus, notre système ne nécessite pas de mettre en place un balayage azimutal du faisceau laser dans le BFP pour corriger les inhomogénéités de l'illumination sur l'échantillon [120]. Ce balayage azimutal (présent dans quasiment tous les systèmes commerciaux) est d'ailleurs connu pour faire apparaître un certain nombre de défauts, comme une composante non évanescente dans l'échantillon [107,108]. Enfin, notre traitement des données permet d'éliminer un certain nombre de paramètres inconnus qui influencent le contraste des images TIRF (telles que la concentration locale des fluorophores, leur orientation...).

3.1.2 Contraste en microscopie TIRF⁶

Le signal TIRF de cellules dont la membrane a été marquée ne dépend pas seulement de la distance qui sépare la membrane du substrat. On observe sur la [figure 3.2](#) des exemples d'images TIRF de la membrane de cellules U-87 MG en adhérence sur une lamelle recouverte d'une fine couche de fibronectine.

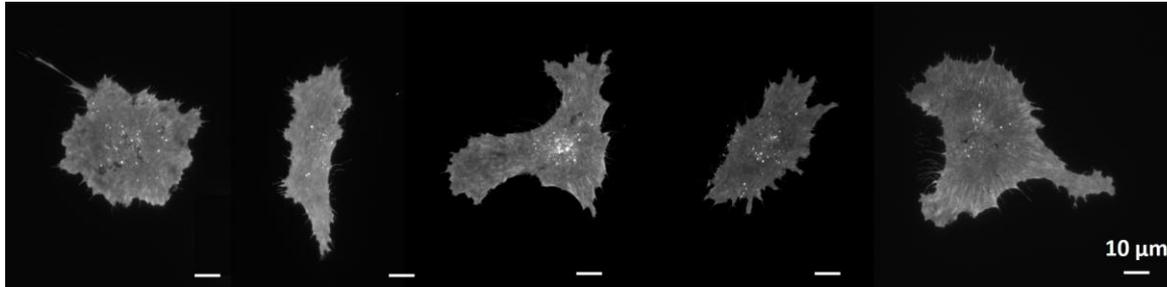


Figure 3.2 : Exemples d'images TIRF (avec un angle d'incidence $\theta = 72^\circ$) de cellules U-87 MG. Les cellules sont étalées sur une fine couche de fibronectine dans un milieu de culture non fluorescent, à 37°C , illumination à l'aide d'un laser à 488 nm et d'un objectif de grandissement $54.8\times$, d'ouverture numérique 1.49. L'irradiance est d'environ 10 W/cm^2 et les temps d'acquisition des images TIRF de 100 ms. La membrane plasmique des cellules a été marquée avec de la DiO.

On aperçoit très clairement sur ces images des petits points très brillants, ainsi que des variations d'intensité plus faibles à des fréquences spatiales plus basses. Ces petits points peuvent être liés à la présence d'agrégats de fluorophores ou bien de vésicules lipidiques très proches de la membrane cellulaire. Pour expliquer ses variations de contraste, une description théorique du signal TIRFM peut être proposée en faisant quelques approximations. Tout d'abord, on suppose que seule la membrane ventrale sera excitée par l'onde évanescente. Cette approximation est vraie tant que la profondeur de pénétration de l'onde évanescente est inférieure à l'épaisseur de la cellule. Ensuite, on approxime la membrane plasmique par un film dense de concentration c_0 de molécules fluorescentes ([Figure 3.3](#)), d'épaisseur infinitésimale, parallèle à l'interface, située à une hauteur h du substrat.

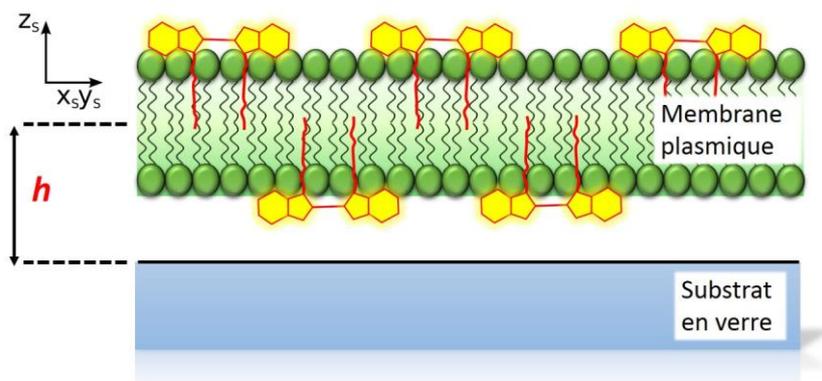


Figure 3.3 : Schéma montrant la membrane plasmique éloignée de l'interface d'une hauteur h .

⁶ Cette partie est basée en majorité sur les informations contenues dans l'article de Marcelina Cardoso Dos Santos [4].

Ainsi, les paramètres qui influencent le contraste des images TIRF sont donnés par l'expression suivante correspondante au signal de fluorescence f_d (en Hz) en chaque pixel de coordonnée (x_d, y_d) de la caméra utilisée pour l'observation grand champ après soustraction du bruit de fond [4,55] :

$$f_d(x_d, y_d, h, \theta, n_{eff}) \approx \eta_d(h) \sigma_{abs}(h) \phi(h) \frac{I_0}{h\nu} c_0 \gamma(\theta) e^{-\frac{h}{\kappa(\theta, n_{eff})}} \iint dx_s dy_s PSF_{det}(x_d - x_s, y_d - y_s, 0) \quad (3.1)$$

avec

$$\kappa(\theta) = \frac{\lambda}{4\pi \sqrt{n_{verre}^2 \sin^2 \theta - n_{eff}^2}} \quad (3.2)$$

η_d , σ_{abs} et ϕ_f représente respectivement l'efficacité de collection, la section efficace d'absorption et le rendement quantique des molécules fluorescentes. Puisqu'en TIRF on observe les molécules présentes à proximité de l'interface, ces trois premiers paramètres dépendent de l'orientation des dipôles des molécules et de la distance h . Notons que ces grandeurs ne dépendent pas de l'angle d'incidence θ en polarisation s. Autrement dit, leur valeur reste constante lorsqu'on change l'angle d'incidence en va-TIRFM. $I_0/h\nu$ correspond au flux de photons à la longueur d'onde d'excitation laser. γ est un terme de correction qui tient compte de la variation de l'irradiance laser sur l'interface avec l'angle d'incidence θ . Le contraste des images TIRF dépend également du champ évanescent dans l'échantillon (terme en exponentiel). Dans le cas d'une cellule vivante adhérente sur une surface, l'expression de ce champ est complexe et la longueur d'atténuation de l'onde évanescente peut varier d'une extrémité à l'autre de la cellule. En effet, κ dépend de la distance qui sépare la membrane de l'interface verre/eau et des indices de réfraction des différents milieux qui composent le système. Ce dernier peut être approximé par un empilement de plusieurs couches : la lamelle de verre, le milieu d'observation, la membrane et surtout le cortex cellulaire (Figure 3.4 (A)). L'influence de la membrane plasmique est négligeable car elle est très fine. L'indice du cortex cellulaire est très hétérogène au niveau de la partie ventrale de la cellule et varie typiquement entre 1.34 et 1.4 [121]. Ces variations sont dues, entre autres, à la présence des fibres de stress d'actine au voisinage de la membrane. Ce système multicouche peut être remplacé par une interface séparant le verre et un milieu d'indice effectif, noté n_{eff} [103,122,123]. Cet indice effectif tient compte de toutes ces couches et de la distance membrane/substrat. Malgré cette diversité et complexité, le champ évanescent peut localement être approximé par un déclin mono-exponentiel (Figure 3.4 (B)). Ce dernier est caractérisé par une longueur d'atténuation κ qui dépend de l'angle d'incidence θ et d'un indice effectif n_{eff} , conditionné principalement par la distance h et l'indice de réfraction du cortex cellulaire [124]. Il est alors possible de déterminer la valeur de n_{eff} , pour une hauteur et une valeur de n_{cyto} données. Par exemple, nous avons obtenu $n_{eff} = 1.3605$ pour une hauteur de 100 nm à partir des données de la figure 3.4 (B). Ainsi, nous avons tracé la variation de n_{eff} par rapport à h et en fonction de différentes valeurs de l'indice cytoplasmique (Figure 3.4 (C)) [4].

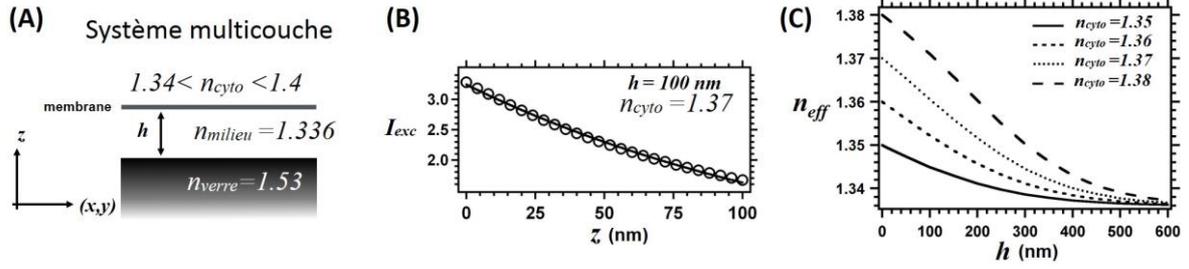


Figure 3.4: Calculs de l'indice effectif n_{eff} dans un système multicouche. (A) Le modèle diélectrique à trois couches utilisé pour calculer l'intensité de l'onde évanescente I_{exc} dans l'espace entre la cellule et la lamelle en verre. (B) Evolution de I_{exc} en fonction de z , pour $h=100$ nm et $n_{cyto} = 1.37$ en polarisation s (cercle noir). Le signal est ajusté par un déclin mono-exponentiel où κ est donné par l'équation (3.2) (tracé noir). (C) Evolution de l'indice effectif en fonction de la distance entre la cellule et la lamelle h , tracée pour différentes valeurs de n_{cyto} . Toutes les simulations ont été réalisées avec $\theta = 65^\circ$, $\lambda = 488$ nm, $n_{verre} = 1.53$ et $n_{milieu} = 1.336$ (extrait de la référence [4]).

Le dernier terme de l'équation (3.1) correspond à l'intégrale de la PSF de l'objectif à immersion utilisé pour détecter le signal. Cette intégrale est égale à une constante, par simple conservation du flux de photons dans le front d'onde. L'équation (3.1) montre que l'intensité de fluorescence émise par une molécule présente dans la membrane plasmique, se trouvant à une distance h de l'interface (Figure 3.4 (A)), ne dépend pas seulement des caractéristiques de l'onde évanescente (facteurs γ et κ). Il est ainsi impossible de déterminer la distance h avec précision à partir d'une unique image TIRF, car le contraste de cette image dépend de plusieurs paramètres inconnus, tels que la concentration locale de molécules fluorescentes dans la membrane, leur orientation, leur profil angulaire d'émission (facteurs c_0 , η_d , σ_{abs} et ϕ). La microscopie TIRF à angle variable permet de s'affranchir de tous ces paramètres inconnus, en enregistrant une série d'images à différents angles d'incidence. Un traitement post-acquisition rapide de l'ensemble des images TIRF permet de construire la distribution des distances qui séparent la membrane plasmique du substrat (après soustraction du bruit de fond). La longueur d'atténuation dépend de l'angle d'incidence, comme montré dans l'équation (3.2). Ainsi, en augmentant progressivement l'angle d'incidence, une série d'images TIRF (par exemple, 10 images) pour différentes longueurs d'atténuation est enregistrée. Pour simplifier l'expression (3.1), on peut regrouper dans une même grandeur, notée χ , tous les paramètres qui ne dépendent pas de θ :

$$\chi(x_d, y_d, h) \approx \eta_d(h) \sigma_{abs}(h) \phi(h) \frac{I_0}{h\nu} c_0 \iint dx_s dy_s PSF_{det}(x_d - x_s, y_d - y_s, 0) \quad (3.3)$$

Ainsi, on peut réécrire le signal de fluorescence pour chaque angle d'incidence $\theta_i > \theta_c$ (θ_c étant l'angle critique) avec $\theta_1 < \theta_2 < \theta_3 \dots < \theta_{10}$:

$$f_d(x_d, y_d, h, \theta_1) \approx \chi(x_d, y_d, h) \gamma(\theta_1) e^{-\frac{h}{\kappa(\theta_1)}} \quad (3.4)$$

$$f_d(x_d, y_d, h, \theta_2) \approx \chi(x_d, y_d, h) \gamma(\theta_2) e^{-\frac{h}{\kappa(\theta_2)}}$$

...

$$f_d(x_d, y_d, h, \theta_{10}) \approx \chi(x_d, y_d, h) \gamma(\theta_{10}) e^{-\frac{h}{\kappa(\theta_{10})}}$$

En prenant le logarithme de ces expressions, on obtient alors la série suivante :

$$\ln \frac{f_d(x_d, y_d, h, \theta_1)}{1} \approx \ln[\chi(x_d, y_d, h) \gamma(\theta_1)] - \frac{h}{\kappa(\theta_1)} \quad (3.5)$$

$$\ln \frac{f_d(x_d, y_d, h, \theta_2)}{\gamma(\theta_2)/\gamma(\theta_1)} \approx \ln[\chi(x_d, y_d, h) \gamma(\theta_1)] - \frac{h}{\kappa(\theta_2)}$$

...

$$\ln \frac{f_d(x_d, y_d, h, \theta_{10})}{\gamma(\theta_{10})/\gamma(\theta_1)} \approx \ln[\chi(x_d, y_d, h) \gamma(\theta_1)] - \frac{h}{\kappa(\theta_{10})}$$

Par conséquent, la distance h correspond à la pente de la droite $\ln \frac{f_d(\theta_i)}{\gamma(\theta_i)/\gamma(\theta_1)}$ tracée en fonction de $-\frac{1}{\kappa(\theta_i)}$. Cependant n_{eff} et donc κ ne sont pas connus. Pour contourner ce problème, il suffit de tracer $\ln \frac{f_d(\theta_i)}{\gamma(\theta_i)/\gamma(\theta_1)}$ en fonction de $\sin \theta_i$ et l'ajuster avec l'équation suivante :

$$\ln \frac{f_d(x_d, y_d, h, \theta_i)}{\gamma(\theta_i)/\gamma(\theta_1)} \approx \ln[\chi(x_d, y_d, h) \gamma(\theta_i)] - h \frac{4\pi}{\lambda} \sqrt{n_{verre}^2 \sin^2 \theta_i - n_{eff}^2} \quad (3.6)$$

De cette manière, on peut estimer en chaque pixel les valeurs de h et n_{eff} . Si on revient à l'équation (2.12), on trouve que $\gamma(\theta_i)/\gamma(\theta_1) = \cos^2(\theta_i)/\cos^2(\theta_1)$ en polarisation s. Ainsi, ce facteur de correction ($\gamma(\theta_i)/\gamma(\theta_1)$) ne va pas dépendre des indices de réfraction n_{verre} et n_{eff} , seulement κ qui va en dépendre (équation (3.2)). Autrement dit, ce facteur de correction ($\gamma(\theta_i)/\gamma(\theta_1)$) peut être obtenu expérimentalement (section 3.3.3).

3.1.3 va-TIRFM : exemple d'images et de traitement de données

Mesurer la distance qui sépare la membrane de la cellule du substrat est une étape cruciale pour analyser l'adhérence cellulaire et distinguer les zones d'interaction spécifique et non-spécifique. La microscopie va-TIRF permet de reconstruire avec une grande précision la topographie de la membrane cellulaire au-dessus d'une lamelle de verre recouverte d'une fine couche (d'épaisseur < 10 nm) de protéines de la MEC telles que la fibronectine (Figure 3.5). La résolution axiale en va-TIRF est typiquement d'environ 20 nm, similaire à d'autres méthodes optiques utilisées pour l'imagerie cellulaire et qui fournissent également une résolution axiale nanométrique, comme la microscopie RICM [67], la microscopie MIET [96] ou d'autres techniques de super-résolution utilisant la localisation de molécule unique telle que le dSTORM combinée à une détection aux angles supercritiques [98]. La résolution latérale de notre dispositif ne dépasse pas la limite de diffraction (≈ 250 nm), ce qui est tout à fait acceptable pour observer des zones d'adhérence spécifique (Figure 3.6). Le temps nécessaire pour acquérir la série d'images TIRF ne dépasse pas 1 sec et les puissances d'excitation laser sont de l'ordre de 5 à 10 W/cm². Ainsi, on n'induit pratiquement pas de photo-dégradation dans l'échantillon et permet l'observation de cellules vivantes pendant plusieurs heures.

L'un des aspects remarquables de notre technique est qu'à partir de la série d'images TIRF il est également possible d'extraire la distribution spatiale de l'indice effectif n_{eff} du cortex cellulaire (Figure 3.5) [4]. Ce dernier augmente lorsque l'indice de réfraction global du cytoplasme au voisinage de la membrane augmente et que la distance membrane/substrat diminue. Ainsi, n_{eff} sera élevé au niveau de points de forte densité protéique, comme les contacts focaux. L'interaction ligand/récepteur affecte aussi la hauteur de la membrane par rapport au substrat. La membrane plasmique sera également très proche du substrat au niveau des PFA [19,95]. Les zones de contact spécifique peuvent donc être localisées là où la membrane est très proche du substrat (sur l'image topographique les zones en bleu foncé) et là où n_{eff} est élevé (les zones en rouge sur l'image d'indice). Il est alors possible de reconstruire une nouvelle image qui fait apparaître les zones d'adhérence spécifique, autrement dit les contacts proches, comme sur l'image de droite des figures 3.5 et 3.6. Sur l'exemple de la figure 3.5, les interactions spécifiques représentent une petite partie des interactions membrane/substrat (8% de la surface de contact). C'est très souvent le cas lorsque la cellule est en train de migrer. Sur l'autre exemple (Figure 3.6) cette fraction augmente jusqu'à atteindre 19% de la surface de contact. Ceci peut s'expliquer par le fait que la cellule a déjà migré et qu'elle est en phase de translocation/rétraction. Cette approche permettant de localiser les zones de contacts proches, en tenant compte de la hauteur cellule/substrat et de l'indice de réfraction cytoplasmique, n'est pas nouvelle. En fait, c'est la base de la microscopie par réflexion d'interférence et de l'analyse des images RICM [48,57,67,125].

De nombreuses informations peuvent être extraites de ce type d'analyse de données, entres autres, la hauteur moyenne de la membrane par rapport au substrat, la distribution des distances membrane/substrat et la surface des contacts spécifiques. Elles servent à étudier et caractériser la dynamique de l'adhérence cellulaire. Ces différents points seront développés dans le chapitre 4.

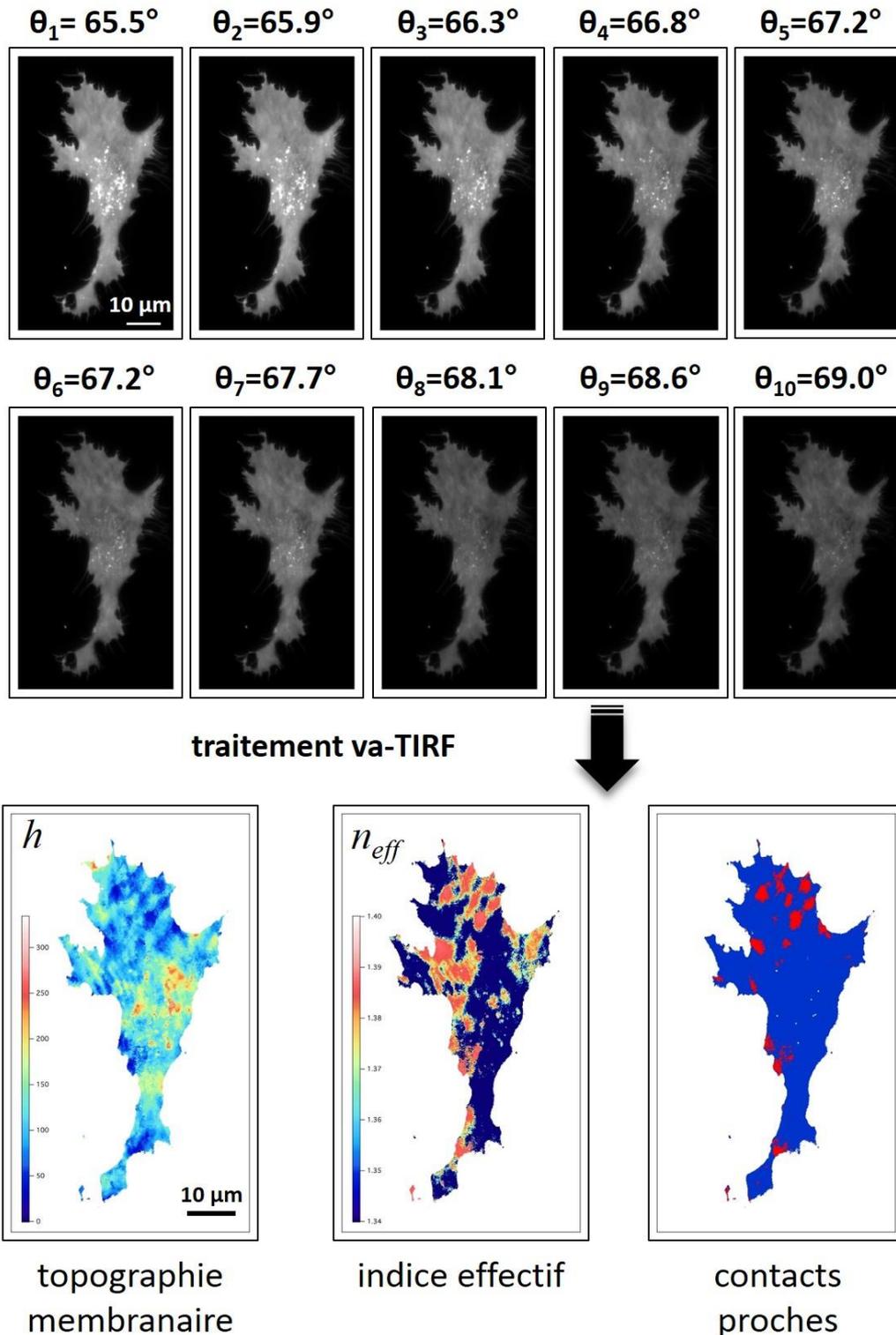


Figure 3.5 : Exemple d'analyse va-TIRF sur une cellule U-87 MG adhérente sur une fine couche de fibronectine à 37°C (marquage de la membrane avec de la DiO). En haut : une série d'images TIRF enregistrées à différents angles d'incidence θ en polarisation s . De gauche à droite : la topographie de la membrane plasmique, la variation spatiale de l'indice effectif n_{eff} , et la localisation des plaques d'adhérence qui apparaissent en rouge sur fond bleu. Dans cet exemple, les zones de contacts spécifiques ne représentent que 6% de la surface totale de contact entre la cellule et le substrat. La fluorescence a été collectée à l'aide d'un objectif à immersion ($ON = 1.45$; 60 \times) pour une excitation laser à 488 nm et un temps d'acquisition de 100 ms par image.

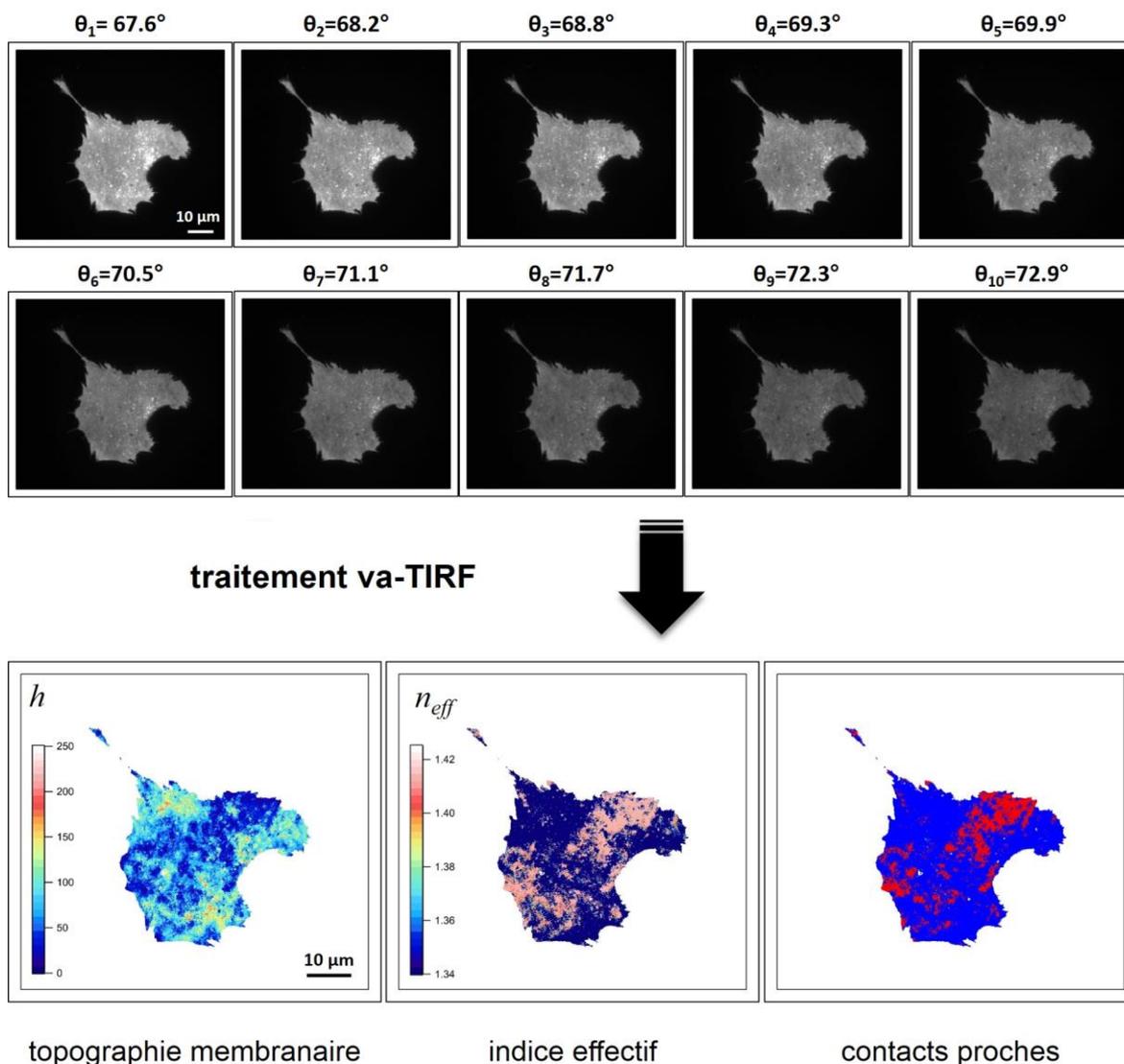


Figure 3.6 : Exemple d'analyse va-TIRF sur une cellule U-87 MG adhérente sur une fine couche de fibronectine à 37°C (marquage de la membrane avec de la DiO). En haut : une série d'images TIRF enregistrées à différents angles d'incidence θ en polarisation s. De gauche à droite : la topographie de la membrane plasmique, la variation spatiale de l'indice effectif de réfraction n_{eff} , et la localisation des plaques d'adhérence qui apparaissent en rouge sur fond bleu. Dans cet exemple, les zones de contacts spécifiques représentent 19% de la surface totale de contact entre la cellule et le substrat. La fluorescence a été collectée à l'aide d'un objectif à immersion ($ON = 1.49 ; 54.8\times$) pour une excitation laser à 488 nm et un temps d'acquisition de 100 ms par image.

3.2 Caractérisation du montage expérimental à 2λ

3.2.1 Description physique du système

Le dispositif TIRF présenté dans ce paragraphe correspond à la version finale qui a été développé sur la base d'un microscope inversé (Zeiss Axio Observer D1). Les figures 3.8 et 3.9 représentent le montage expérimental réalisé. Les composants optiques utilisés pour exciter l'échantillon et faire varier l'angle d'incidence θ se trouvent à l'extérieur du microscope. Ainsi, la structure de base du microscope est conservée. Deux sources laser ont été installés sur ce

montage : un laser émettant à 488 nm d'une puissance maximale de 200 mW (Sapphire 488 LP, Coherent) pour faire du va-TIRF en excitant directement la DiO (marquage direct de la membrane cellulaire), et un laser à 561 nm d'une puissance maximale de 50 mW (OBIS 561 LS, Coherent) pour localiser directement par marquage spécifique les PFA ou les structures d'actine. Les deux faisceaux sont recombinaés à l'aide d'un miroir dichroïque DM₁ (550 DCLP (XF2009), Omega Optical). Ces faisceaux laser sont étendus pour augmenter au maximum le champ d'observation ($\approx 230 \mu\text{m}^2$) à l'aide d'un jeu de lentilles (beam expander). Ceci nous permet d'observer plusieurs cellules en même temps. Le détail de la structuration du « beam expander » est donné dans la section 3.2.2. Au sein du « beam expander », les faisceaux sont filtrés à travers un pinhole de 10 μm afin de produire un éclairage homogène sur l'échantillon. Ces faisceaux sont par la suite focalisés avec une lentille L_{GC} ($f_{GC} = 250 \text{ mm}$) dans le plan focal arrière de l'objectif (BFP). Pour éviter un maximum d'aberrations, le plan pivot du miroir rotatif doit être placé de manière à être parfaitement conjugué avec le plan de l'échantillon (Figure 3.7 (A)).

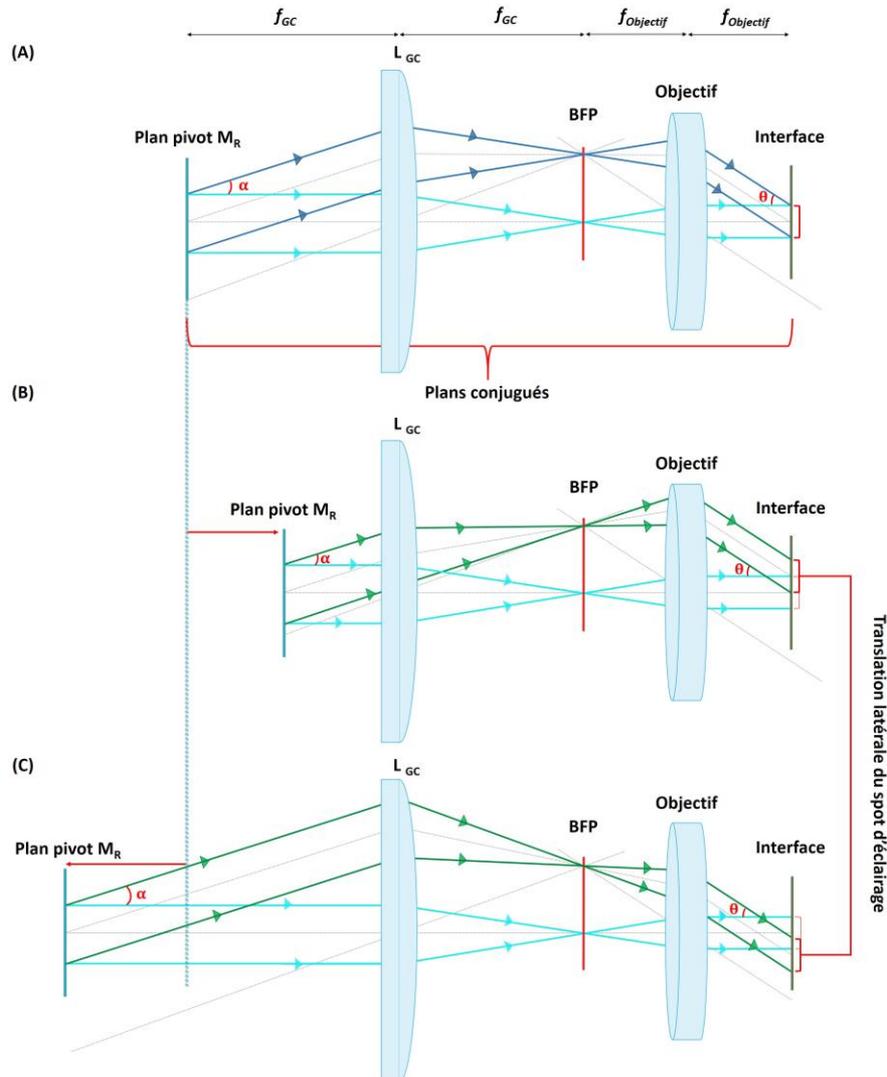


Figure 3.7 : Système afocal composé de la lentille grand champ et de l'objectif. (A) Le miroir M_R est placé à une distance égale à la focale de la lentille L_{GC} . Ainsi, le miroir est positionné au niveau du foyer de L_{GC} . Si on déplace le miroir en le rapprochant de la lentille L_{GC} (B) ou bien en l'éloignant (C), les plans du miroir et de l'échantillon ne seront plus conjugués et on va voir apparaître une translation de la zone d'éclairage sur l'échantillon quand θ varie.

Dans notre dispositif, l'ensemble (L_{GC} et objectif) forme un système afocal. Les figures 3.7 (B) et (C) montrent que si le point pivot du M_R n'est pas placé au foyer objet de la lentille L_{GC} , on va voir apparaître une translation non négligeable de la zone d'illumination sur l'échantillon lorsqu'on augmente l'angle d'incidence. Ainsi, on a équipé tous nos composants optiques de plusieurs systèmes de translation pour ajuster parfaitement leur positionnement. Le déplacement latéral et toute distorsion de la zone d'éclairage lorsque θ est augmenté ont été quasiment supprimés.

La partie la plus importante du dispositif est le miroir M_R monté sur un platine de rotation motorisée (PRS-110, PI miCos) située à l'extérieur du microscope. Elle nous permet de régler l'angle d'incidence θ en inclinant le miroir d'un angle α avec une précision angulaire de 2×10^{-4} degrés. La plage angulaire est comprise entre 0° (épi-fluorescence) et l'angle maximal d'excitation et de collection. Ce dernier est directement lié à l'ON de l'objectif. Pour l'objectif Olympus (PlanApoN 60 \times , ON = 1.49, Olympus) il vaut environ 79° . En réalité au-delà de 72° , le rapport signal/bruit est très faible et les images de fluorescence présentent trop d'aberrations pour être exploitables.

En épi-fluorescence, le faisceau laser collimaté est redirigé sur l'échantillon avec un miroir dichroïque DM_2 (Di03-R488-t1-25x36, Semrock) pour le laser à 488 nm et DM_3 (Di03-R561-t1-25x36, Semrock) pour le laser à 561 nm. Ces miroirs sont orientés à 45° et situés sous l'objectif (Figure 3.8). Leur rôle est de séparer le faisceau d'excitation du signal de fluorescence, qui empruntent tous les deux le même chemin à travers l'objectif. En TIRF, le faisceau laser est focalisé à la périphérie de la pupille d'entrée de l'objectif et se propage ensuite le long du bord de l'objectif. Le signal de fluorescence émis est collecté par le même objectif, transmis par le miroir dichroïque et filtré par un filtre passe-haut à 488 nm (BLP01-488R-25, Semrock) ou bien à 561 nm (BLP01-561R-25, Semrock). Ensuite, la voie de détection est séparée en deux parties. Le signal est soit directement enregistré sur une caméra CMOS (ORCA-Flash 4.0, Hamamatsu) grâce à la lentille de tube L_T du microscope de distance focale de 164.5 mm ; soit à l'aide du miroir amovible M_5 et d'une lentille L_5 ($f_5 = 150$ mm, placée de façon à imager le BFP avec un grandissement 1 (montage 4f)), il est possible d'imager le BFP de l'objectif avec une caméra CCD (ARTEMIS VS92 Monochrome, Atik cameras). Finalement, un système piézoélectrique (PI nano[®] XYZ, PI) permet de déplacer l'échantillon suivant les 3 directions dans l'espace avec une résolution nanométrique. Dans toutes les expériences, la polarisation du faisceau laser incident a été fixée dans la configuration s. Ainsi, les molécules qui ont un moment dipolaire de transition parallèle à l'interface seront efficacement excitées. Une enceinte chauffante a été installée autour du microscope pour réaliser les expériences à 37°C , la température optimale pour observer les cellules vivantes.

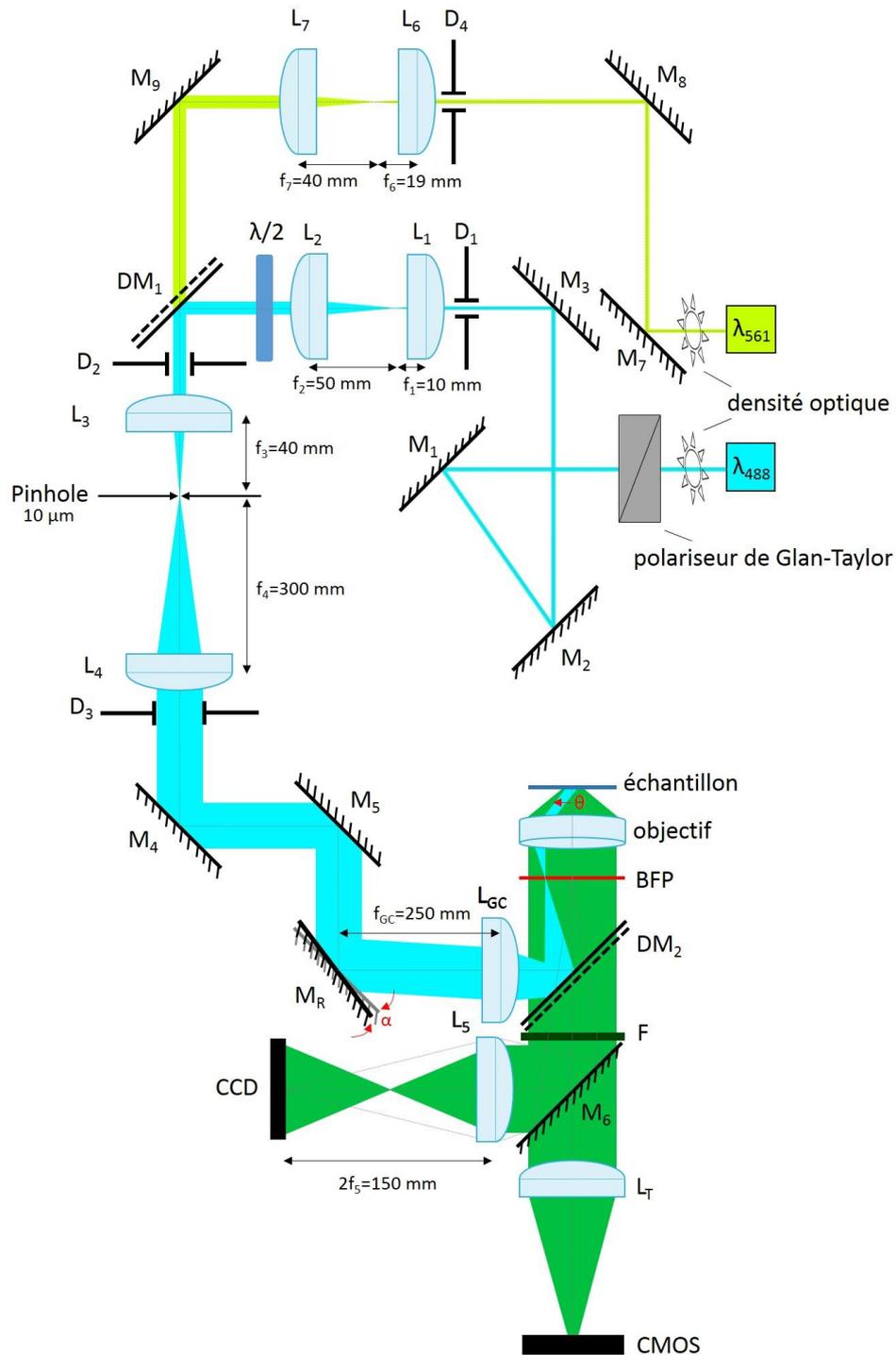


Figure 3.8 : Dispositif expérimental. Le système est monté sur une base d'un microscope inversé Zeiss Axio Observer D1. Les lentilles L_1 et L_2 de focale respective f_1 et f_2 composent le premier « beam expander ». Les lentilles L_3 et L_4 (de focale f_3 et f_4) constituent le deuxième « beam expander ». Les lentilles L_6 et L_7 de focale respective f_6 et f_7 composent le troisième « beam expander ». Les miroirs M_1 , M_2 et M_3 orientent le laser à 488 nm sur le miroir dichroïque DM_1 . Les miroirs M_7 , M_8 et M_9 orientent le laser à 561 nm sur le miroir dichroïque DM_1 . Les miroirs M_4 et M_5 orientent le faisceau incident sur le miroir rotatif M_R . L_{GC} est la lentille qui permet d'avoir un éclairage grand champ sur l'échantillon (de focale f_{GC}). Elle fait converger le faisceau laser sur le plan focal arrière de l'objectif (BFP). La dichroïque DM_2 renvoie le faisceau laser sur l'échantillon en direction de l'objectif. Un filtre passe haut (F) est placé sur la voie de collection et un miroir mobile M_6 permet d'envoyer le signal de l'échantillon sur une caméra CCD via une lentille L_5 (de focale f_5) afin d'imager le BFP. L'échantillon est imagé sur une caméra CMOS à l'aide de la lentille de tube L_T .

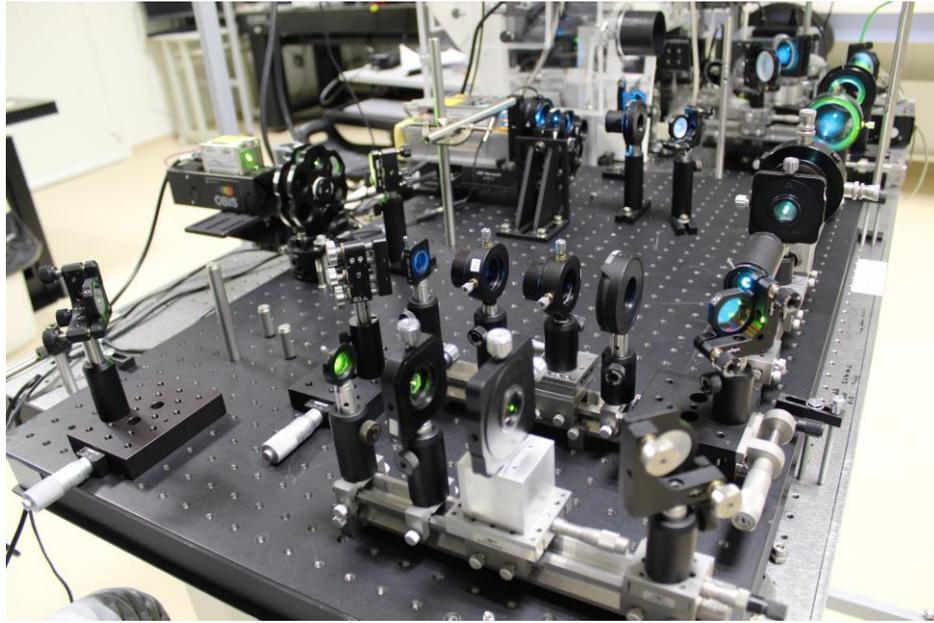


Figure 3.9 : Photographie des éléments constitutifs du dispositif expérimental.

3.2.2 Caractéristiques de la voie d'excitation

Cette partie comporte le matériel mis en place au niveau de la voie d'excitation, à savoir les lentilles et les miroirs utilisés pour mettre en forme et acheminer les faisceaux lasers, ainsi que les autres composants qui contrôlent la puissance, la taille et la polarisation du faisceau laser incident. Toutes les lentilles utilisées sont des doublets achromatiques qui corrigent les aberrations chromatiques et sphériques et elles sont montées de façon que leur face la plus bombée soit du côté des rayons les moins inclinés (à l'exception de L_{GC}). Les miroirs choisis ne changent pas la polarisation du faisceau et ne perdent que 5 à 10% de l'intensité du faisceau incident.

Afin de contrôler la dose d'irradiation sur l'échantillon ($< 10 \text{ J/cm}^2$), nous avons fixé deux roues de densités à la sortie des lasers. Elles comportent différents filtres neutres atténuateurs, permettant de choisir une valeur de densité comprise entre 0.3 et 3.3. Ainsi, nous arrivons à contrôler très finement la puissance d'excitation du laser. De plus pour éviter toutes fluctuations d'intensités nous avons fixé la puissance de sortie laser à sa valeur maximale.

J'ai déjà montré l'importance de la polarisation en microscopie TIRF dans la section 2.4.3.2. Par conséquent, contrôler la polarisation du faisceau incident est un facteur crucial dans notre montage. Ainsi, nous avons placé un prisme de Glan-Taylor à la sortie du laser puisqu'il n'est pas parfaitement polarisé linéairement. Ce dernier est formé de deux prismes collés, dont la base est un triangle rectangle et est utilisé comme un polariseur de grande qualité. Malgré la qualité du prisme de Glan-Taylor, une partie résiduelle du faisceau n'est pas purement en polarisation s. Elle est due aux modes résiduels TEM_{10} , TEM_{01} ou TEM_{11} de la cavité laser. Heureusement, ces modes ont une intensité négligeable ($< 1/1000^{\text{ème}}$ du signal). Nous avons également placé une lame $\lambda/2$ sur le trajet du faisceau laser (elle peut aussi servir à basculer

entre les deux états de polarisation s et p), des diaphragmes ($D_{1,2,3,4}$) et un pinhole pour filtrer spatialement le faisceau.

Pour avoir un grand champ d'éclairage sur l'échantillon il faut agrandir la taille du faisceau laser le plus possible. Pour cela nous avons construit plusieurs « beam expander » (Figure 3.8). Ce dernier comporte deux lentilles convergentes où le foyer image de la première lentille L_1 coïncide avec le foyer objet de la deuxième lentille L_2 (Figure 3.10). Le faisceau laser passe à travers L_1 et converge au foyer de cette lentille. Ensuite le faisceau est collimaté par L_2 puisque le système est afocal. Pour cela, le diamètre de L_1 doit être supérieur à la taille du faisceau incident et celui de L_2 supérieur à la taille du faisceau émergent. Ainsi le diamètre du faisceau émergent est donné par le rapport des focales des deux lentilles :

$$D_E = \frac{f_2}{f_1} D_I \quad (3.7)$$

où D_E et D_I sont les diamètres respectifs du faisceau émergent et incident et f_1 et f_2 correspondent aux distances focales des lentilles L_1 et L_2 . Pour le laser à 488 nm, le premier « beam expander » se constitue des lentilles L_1 ($f_1 = 10$ mm) et L_2 ($f_2 = 50$ mm), le second se constitue des lentilles L_3 ($f_3 = 40$ mm) et L_4 ($f_4 = 300$ mm). Pour le laser à 561 nm, le premier « beam expander » se constitue des lentilles L_6 ($f_6 = 19$ mm) et L_7 ($f_7 = 40$ mm), le second est le même que pour le laser à 488 nm. Ainsi, le diamètre du faisceau laser est d'environ 1 mm à la sortie du laser et devient d'environ 30 mm avant la lentille L_{GC} .

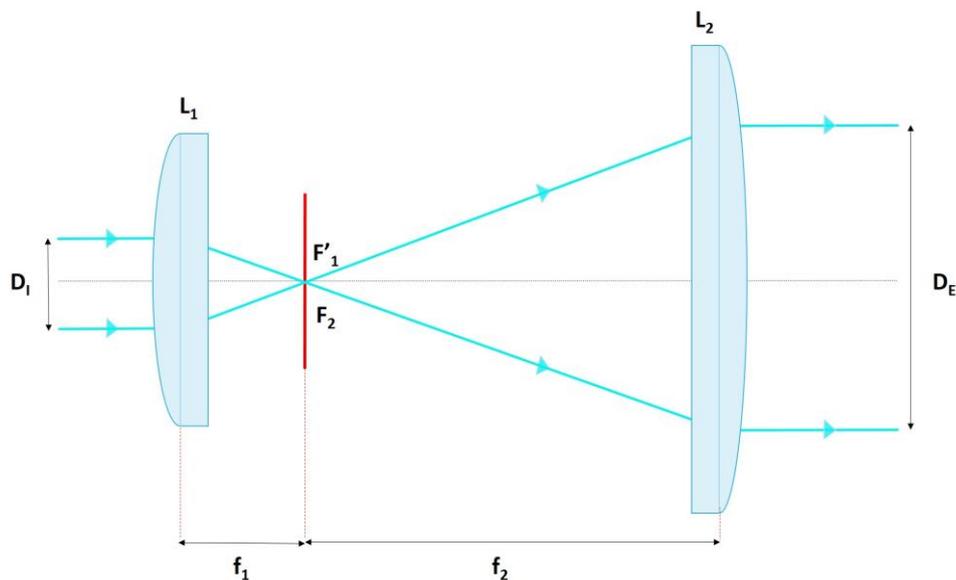


Figure 3.10 : « Beam expander » composé de deux lentilles convergentes.

Pour caractériser l'étendue spatiale d'un faisceau laser, nous avons utilisé la méthode du « couteau ». Cette méthode repose sur l'utilisation d'une lame de rasoir montée sur une platine de translation micrométrique se déplaçant selon un axe perpendiculaire à la direction de propagation du faisceau laser. Elle consiste à déplacer cette lame à travers le faisceau et de

mesurer la puissance transmise à l'aide d'un puissance-mètre (PM100A, Thorlabs), au fur et à mesure que le faisceau est masqué (Figure 3.11). Nous avons placé ce système au niveau du deuxième « beam expander », au foyer image de L_3 , et en enlevant toutes les lentilles pour mesurer le waist du laser à cet endroit-là. Nous pouvons extraire le profil gaussien du faisceau laser en dérivant la distribution de la puissance :

$$I(x) = I_0 e^{-\frac{2(x-x_0)^2}{\omega_z^2}} \quad (3.8)$$

où $I(x)$ correspond au profil latéral du faisceau laser, x_0 est la position du maximum, ω_z est le waist du faisceau. Cette mesure est de nouveau effectuée après avoir mis en place le premier « beam expander ». On en déduit alors le nouveau waist ω_z du faisceau pour le Sapphire 488 : $\omega_z = 2.18 \pm 0.06$ mm. Ainsi, pour bien filtrer spatialement le faisceau incident, nous avons utilisé un pinhole (un petit trou). Le pinhole doit être choisi de telle sorte que son diamètre soit voisin de la taille d'un spot limité par diffraction. L'équation pour déterminer la taille d'un spot limité par diffraction est donnée ci-dessous, et pour cet exemple, $\lambda = 488$ nm, une lentille de focale 40 mm placée juste avant le pinhole et un waist de 2.18 mm :

$$D = 1.22 \frac{\lambda \times f}{\omega_z} \quad (3.9)$$

on trouve $D = 8.97$ μm . Nous avons vérifié qu'un pinhole de 10 μm de diamètre, placé au foyer image de L_3 (de focale 40 mm) permettait un bon filtrage spatial, caractérisé par l'apparition d'une tâche d'Airy bien circulaire. Nous avons ensuite mesuré la puissance laser avant la lentille L_3 et après le pinhole et on a trouvé que 82% du signal est conservé. Ainsi, nous avons obtenu un faisceau d'illumination parfaitement homogène et circulaire vers l'échantillon.

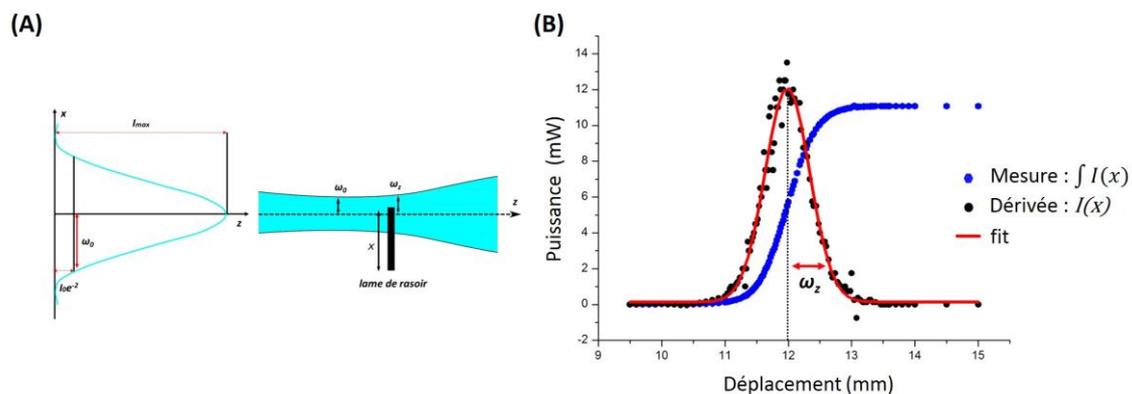


Figure 3.11 : Mesure du waist du faisceau laser. (A) Méthode du couteau. (B) Evolution de la puissance mesurée à 488 nm (en bleu) en fonction du déplacement de la lame du rasoir selon l'axe x . Sa dérivée (en noir) et son fit gaussien (en rouge).

La lentille de focalisation L_{GC} est le dernier élément externe au microscope. Elle permet de focaliser le faisceau incident sur le plan focal arrière de l'objectif, pour ainsi créer un éclairage grand champ sur l'échantillon. Sa distance focale est de 250 mm, elle est fixée dans un support avec des butées de réglage. L'ensemble est monté sur une platine de translation permettant d'ajuster la position de L_{GC} suivant les 3 directions (x , y et z). De plus elle est montée

à l'envers, autrement dit, sa face la plus bombée est du côté des rayons les plus inclinés face au microscope. De cette manière, nous allons créer volontairement des aberrations qui seront compenser par l'objectif TIRF.

Pour estimer la zone d'éclairage nous avons préparé un échantillon de calibration (voire les détails dans la section 3.3.1). Cette zone vaut $232 \times 232 \mu\text{m}^2$. Elle recouvre de façon totale la surface de la caméra CMOS. Ce profil d'éclairage peut être ajusté par une fonction gaussienne :

$$I(x, y) = I_0 e^{-\frac{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2}{\omega_L^2}} \quad (3.10)$$

où ω_L correspond à la dimension latérale du faisceau sur l'interface et vaut $242 \mu\text{m}$. A noter que le waist suivant x ($\omega_x = 255 \mu\text{m}$) est légèrement différent de celui suivant y ($\omega_y = 242 \mu\text{m}$), ceci est dû aux aberrations résiduelles comme l'astigmatisme. Nous pouvons visualiser la zone d'éclairage quand on bascule du mode « épi-fluorescence » en mode « TIRF ». Nous avons remarqué qu'on a un faible décalage de la zone d'illumination entre $\theta = 0^\circ$ et $\theta = 66.6^\circ$ (Figure 3.12). Le déplacement latéral du spot laser se fait dans la direction de l'inclinaison du faisceau incident (Figure 3.7) et vaut environ $12 \mu\text{m}$. Cette valeur représente 6% du diamètre total du faisceau d'éclairage. Malgré tous les efforts d'alignement, il semble impossible de se débarrasser de ce décalage avec les objectifs Olympus. Ce dernier est très faible et ne va pas influencer le traitement des données puisqu'on a un waist très large. Il est important de noter que ce décalage est inexistant avec les objectifs Zeiss. Toutefois, les objectifs Zeiss présentent un autre défaut, une déformation de l'illumination laser lorsqu'on souhaite agrandir le plus possible la zone d'irradiation. Dans notre dispositif, on focalise trop le faisceau laser avec la lentille L_{GC} , ainsi le faisceau semble diffracté dans l'objectif et on voit apparaître des franges de diffraction en bordure de champ (Figure 3.13).

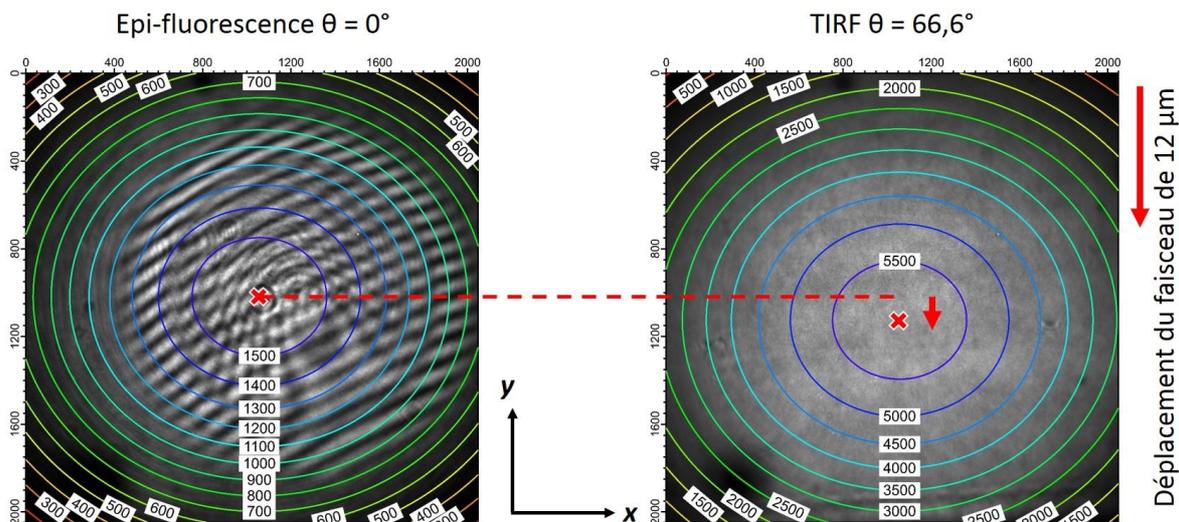


Figure 3.12 : Décalage du faisceau laser quand on augmente θ de 0 à 66.6° . Images de fluorescence d'un film de PMMA dopé de boîtes quantiques, déposé sur une lamelle de verre par centrifugation à l'aide d'une spin-coater, recouvert d'eau. Les boîtes quantiques sont excitées à 488 nm et émettent à une longueur d'onde d'environ 510 nm . Les cercles représentent les lignes de l'ajustement numérique.

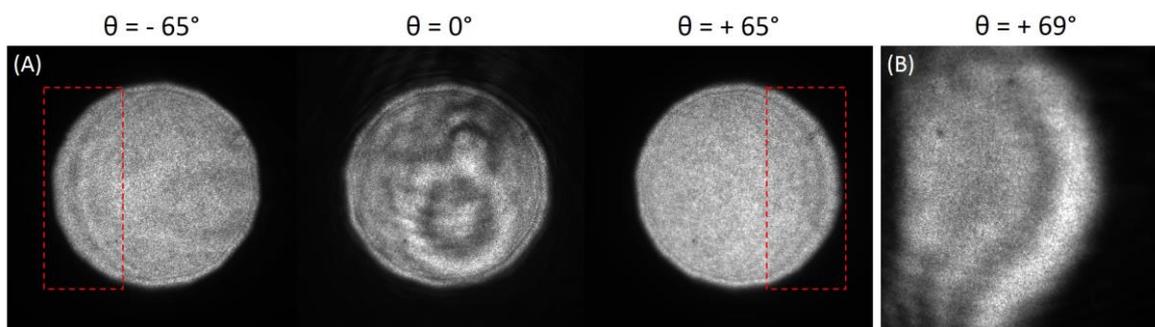


Figure 3.13 : Profil de diffraction observé en TIRF, produit par les bords de monture de l'objectif Zeiss 100× (ON = 1.46). Images de fluorescence d'un film de PMMA dopé de boîtes quantiques, déposé sur une lamelle de verre par centrifugation à l'aide d'une spin-coater, recouvert d'eau. Les boîtes quantiques sont excités à 488 nm et émettent à une longueur d'onde d'environ 510 nm. (A) Diaphragme D_3 partiellement fermé. Le champ d'éclairage est réduit et la partie déformée est encadrée en rouge. (B) Diaphragme D_3 complètement ouvert.

3.2.3 Porte-échantillon

L'objet à étudier est placé dans une chambre d'observation fabriquée au laboratoire. Cette dernière correspond à un système hermétique pour éviter l'évaporation du milieu d'observation ou bien du solvant utilisé. Elle est composée d'un support en aluminium (7.5×2.5 cm), adapté au porte-échantillon de la platine de translation (Figure 3.14 (A)). Les cellules sont placées entre deux lamelles de dimensions 24×24 cm et d'épaisseur $170 \pm 10 \mu\text{m}$ (41014521, Karl Hecht™ Assistent™) séparées par un joint en caoutchouc. Ainsi, la première lamelle est placée sur le support (face fonctionnalisée vers le haut) avec un joint graissé au-dessus (3 mm d'épaisseur). Ensuite, les cellules sont déposées sur cette lamelle. Une deuxième lamelle referme le système. L'ensemble est immobilisé par un anneau en téflon, suivi par une bague de serrage en aluminium vissée par le haut afin de rendre hermétique le système (Figure 3.14 (B)).

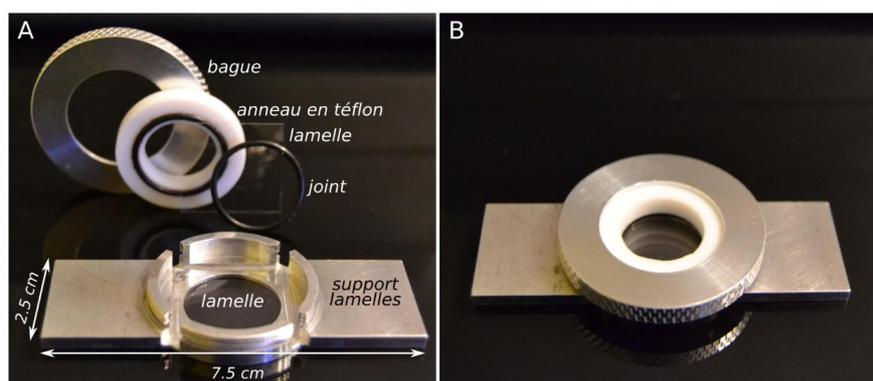


Figure 3.14 : Porte-échantillon pour observer les cellules. (A) Les différents éléments composants la chambre d'observation : le support, les lamelles, le joint, l'anneau en téflon et la bague de serrage. (B) Porte-échantillon assemblé (extrait de la référence [36]).

3.3 Calibration de l'angle d'incidence

En raison des aberrations résiduelles (courbure de champ et aberrations sphériques) dues à l'utilisation d'un objectif à grande ouverture numérique et à l'éclairage TIRF, l'angle

d'incidence θ ne peut pas être calculé à l'aide des lois de l'optique géométrique. Dans la communauté, la calibration est couramment réalisée à l'aide d'un prisme associé à la lamelle de verre recouverte d'huile [126]. Cette technique permet de mesurer la position du spot laser projeté sur un mur et θ est calculé à l'aide des lois de Snell-Descartes. Cette méthode présente plusieurs inconvénients. D'une part, elle nécessite une parfaite connaissance des indices de réfraction du prisme et de l'huile d'immersion, à la longueur d'onde d'excitation utilisée. D'autre part, il faut apporter une importante modification au porte-échantillon pour fixer le prisme, sans compter que la façon dont on positionne le prisme influence notablement la mesure de l'angle. Dans cette partie, je vais vous présenter une procédure de calibration à la fois simple, fiable et adaptée à toutes les configurations TIRF sans prisme. Elle consiste à observer, dans le plan focal arrière de l'objectif la fluorescence d'émetteurs placés sur une interface en verre, afin de mesurer les changements d'angle critique quand on change la solution qui recouvre le substrat (divers milieux d'indices de réfraction sont utilisés). Concernant le dispositif expérimental, j'ai utilisé les mêmes caractéristiques illustrées dans la [figure 3.8](#) mais avec deux objectifs différents : l'objectif Olympus PlanApoN 60 \times , d'ON = 1.45 et l'objectif Zeiss a-plan Achromat 100 \times , d'ON = 1.46).

3.3.1 Echantillon de calibration

L'échantillon de calibration est une monocouche de fluorophores déposés sur une lamelle de verre. Les fluorophores doivent être orientés aléatoirement de façon à produire une émission isotrope. Pour obtenir une émission la plus photostable possible, nous avons choisi d'utiliser des boîtes quantiques (QDs, Quantum Dots) comme émetteurs. Ces nanocristaux ont une très grande photostabilité comparée aux molécules organiques courantes, ce qui permet une longue période d'observation avant le photoblanchiment. De plus, une fois attachées à la surface dans un film mince de polymère, elles vont être chimiquement stables vis-à-vis des divers solvants utilisés.

Pour réaliser notre échantillon, nous avons mélangés les QDs de CdSe/ZnS (Sigma Aldrich) dans du toluène avec du PMMA (Poly(Methyl MethAcrylate), MM = 25kg/mol, 04554-500, Polysciences). Ensuite nous avons déposé une couche mince de cette solution colloïdale sur une lamelle à l'aide d'une tournette « spin coater ». Sachant que le diamètre de ces boîtes quantiques est ≈ 8 nm, nous avons préparé des films de PMMA dopés de QDs, d'une épaisseur ≈ 10 nm. Ceci est facilement obtenue en déposant par centrifugation une solution de PMMA diluée dans du toluène à environ 3 g/L, en appliquant une vitesse de rotation d'environ 4000 tours/min. Au-delà de cette vitesse, l'épaisseur reste constante (≈ 10 nm) ([Figure 3.15](#)). Les QDs choisis pour la calibration émettent à une longueur d'onde d'environ 510 nm très proche de la longueur d'onde d'excitation du laser (488 nm) pour limiter les variations de l'indice de réfraction avec λ .

Une fois la lamelle de verre est couverte d'un film PMMA dopé de QDs, elle est ensuite recouverte d'un milieu d'indice de réfraction n . Le [tableau 3.1](#) résume les différents solvants utilisés pour la calibration. Les indices de réfraction ont été mesurés à température ambiante avec un réfractomètre d'Abbe (Abbe 60/ED, Bellingham and Stanley). Des mélanges d'eau et

de glycérol ont également été utilisés afin de faire varier continument l'indice entre 1.33 et 1.47. L'indice de réfraction de ces mélanges a été calculé selon l'équation suivante :

$$n = 1.3368 W_{eau} + 1.4765 W_{glycérol} \quad (3.11)$$

où W_{eau} et $W_{glycérol}$ sont respectivement les fractions massiques de l'eau et du glycérol (Glycerol, 56-81-5, Fisher Chemical) [127]. Juste avant chaque calibration ces mélanges ont été fraîchement préparés et leur valeur d'indice a été vérifié avec le refractomètre. Cette étape est très importante pour éviter les instabilités d'indice de réfraction dus à l'hygroscopicité du glycérol. Autrement dit, le glycérol mélangé avec l'eau se dilue en absorbant l'humidité de l'air et son indice de réfraction va changer au cours du temps.

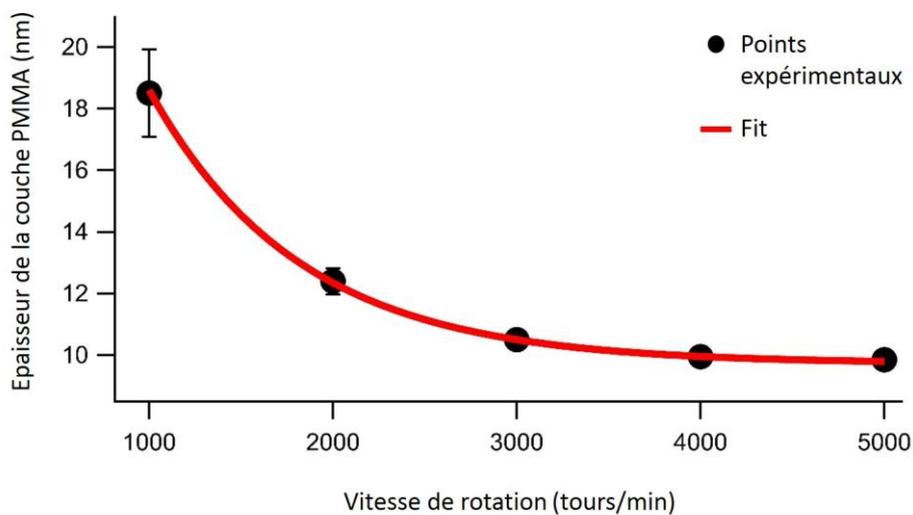


Figure 3.15 : Evolution de l'épaisseur des couches minces de PMMA dopées de QDs en fonction de la vitesse de rotation du spin-coater. L'épaisseur de la couche a été contrôlée par ellipsométrie (à $\lambda = 633$ nm, Jobin Yvon-Horiba). Les points noirs et la courbe rouge représentent respectivement les données expérimentales et leur ajustement numérique. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types expérimentaux.

Tableau 3.1 : Indices de réfraction à température ambiante (22°C) et à $\lambda = 488$ nm.

Milieu	Indice de réfraction	Données de la littérature
Lamelle de verre	$n = 1.5298 \pm 0.0001$	$n = 1.5298$ [128]
Eau distillée	$n = 1.3368 \pm 0.0001$	$n = 1.3374$ [129]
Butanol	$n = 1.4039 \pm 0.0003$	$n = 1.4055$ [130]
Glycérol	$n = 1.4765 \pm 0.0002$	$n = 1.4764$ [131]

Nous avons mesuré à température ambiante et à différentes longueurs d'onde allant de 435.84 nm jusqu'à 633 nm, la variation des indices de réfraction de la lamelle de verre, de l'eau et du glycérol avec le réfractomètre d'Abbe. Les courbes de dispersion d'indice obtenues sont présentées en annexe.

3.3.2 Caractérisation de l'angle d'incidence θ

La calibration de l'angle d'incidence est basée sur des mesures d'angle critique θ_c . Elle correspond à l'analyse du signal de fluorescence provenant du plan focal arrière de l'objectif après l'excitation d'une monocouche de QDs. L'image observée dans le BFP correspond à la projection du diagramme de rayonnement émis par les QDs, autrement dit la distribution angulaire de la lumière émise par les QDs (Figure 3.16). θ_c divise le signal de fluorescence en deux parties distinctes : une région d'émission supercritique (SAF, Supercritical Angle Fluorescence) pour $\theta > \theta_c$ et une autre région d'émission sous-critique (UAF, Undercritical Angle Fluorescence) lorsque $\theta < \theta_c$. Cette répartition va changer en fonction de l'indice de réfraction du milieu ajouté sur le substrat en verre, comme indiqué sur la figure 3.17 pour différents milieux. L'anneau SAF a une épaisseur limitée contenant tous les angles supercritiques, de θ_c à θ_{max} , définis par l'ouverture numérique de l'objectif à immersion ($\theta_{max} \approx 72^\circ$ pour $ON = 1.45$). Ainsi, la région SAF apparaît sous la forme d'un anneau étroit et brillant dans le plan focal arrière de l'objectif, comme illustré sur les figures 3.17 et 3.18. Ce signal SAF dépend fortement de la distance entre les émetteurs et la surface [132], ce qui constitue d'ailleurs un moyen original de déterminer ces distances [98,133].

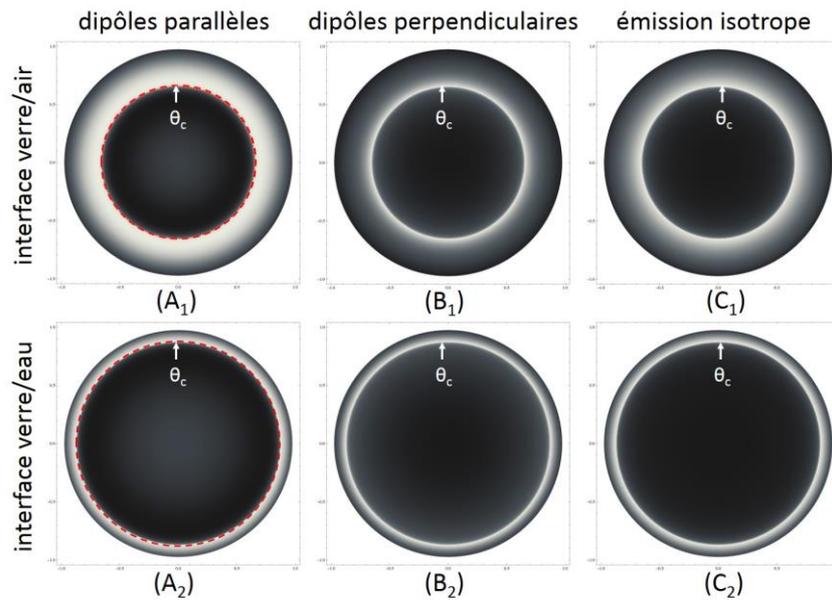


Figure 3.16 : Images théoriques du BFP calculées selon le modèle de Lukosz et Kunz, pour des émetteurs situés à l'interface et pour une $ON = 1.45$. Ces images ne tiennent pas compte des aberrations. Les images (A₁), (B₁) et (C₁) correspondent respectivement au signal émis dans le cas d'un ensemble de dipôles orientés de manière aléatoire parallèlement à l'interface (plan xy), perpendiculairement à l'interface (z) et dans le cas d'une émission isotrope pour une interface verre/air. Les images (A₂), (B₂) et (C₂) correspondent aux mêmes configurations mais pour l'interface verre/eau. Le cercle rouge sur (A₁) et (A₂) sépare les deux régions UAF et SAF.

Il est intéressant de noter que la frontière entre les régions UAF et SAF présente un saut d'intensité abrupt pour $\theta = \theta_c$ (Figure 3.16), qui facilite son identification. Suivant le modèle de Lukosz et Kunz [134–136], il est possible de simuler mathématiquement ce qui se passe dans le plan focal arrière de l'objectif pour un ensemble de dipôles orientés parallèlement à

l'interface (Figures 3.16 (A₁) et (A₂)), perpendiculairement à l'interface (Figures 3.16 (B₁) et (B₂)), ou bien de manière aléatoire suivant x,y et z (Figures 3.16 (C₁) et (C₂)). Ces images présentent un anneau périphérique brillant correspondant au régime évanescent ($\theta \geq \theta_c$). Le rayon intérieur de cet anneau brillant correspond exactement à $\theta = \theta_c$ (cercle rouge sur les figures 3.16 (A₁) et (A₂)). Nos images expérimentales du BFP (Figure 3.17) ressemblent plutôt au profil d'émission calculé dans le cas de dipôles orientés aléatoirement suivant x, y, z et ayant une émission isotrope.

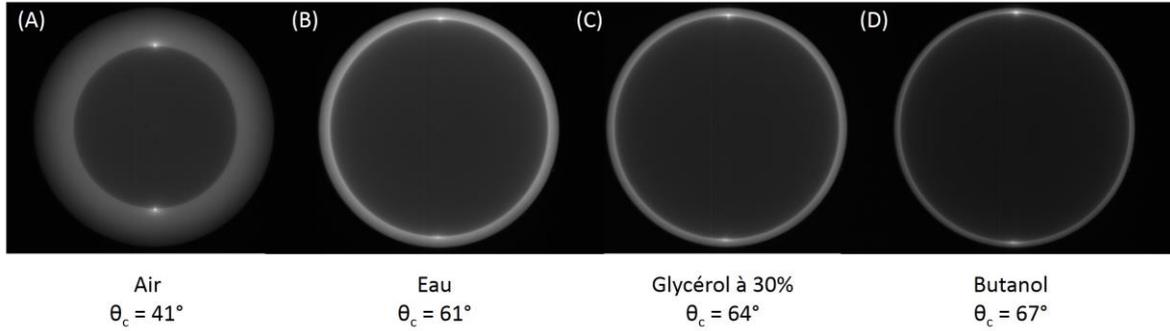


Figure 3.17 : Images expérimentales du plan focal arrière de l'objectif pour quatre milieux d'indice différent enregistrées pour $\theta = \theta_c$. (A) Interface verre/air, (B) interface verre/eau, (C) interface verre/glycérol à 30% et (D) interface verre/butanol. Les images ont été obtenues à partir d'une monocouche de QDs excités à 488 nm et qui émettent de façon isotrope à une longueur d'onde d'environ 510 nm.

En observant le déplacement du spot laser dans le BFP, nous pouvons extraire la position angulaire α de l'angle critique, notée α_c . Le petit point brillant au centre de la figure 3.18 (A) correspond au faisceau laser focalisé. Ce point apparaît lorsque le filtre d'émission F est retiré (Figure 3.8). L'angle incident peut donc être ajusté à n'importe quelle valeur, entre un éclairage épi-standard ($\alpha = \theta = 0^\circ$) et TIR, simplement en déplaçant radialement la position du spot laser dans le BFP, comme indiqué sur les figures 3.18 (A) et (B). Une fois que $\theta \geq \theta_c$, le TIR est atteint et un faisceau réfléchi apparaît dans le BFP (Figure 3.18 (C)). De cette façon, nous pouvons suivre la position du spot laser en même temps que l'angle d'incidence. La position angulaire α_c concorde avec le cas où le spot laser atteint le rayon intérieur de l'anneau SAF. La valeur expérimentale de α_c est ensuite associée à une valeur théorique de θ_c calculée à partir de :

$$\theta_c = \arcsin \frac{n}{n_{\text{verre}}} \quad (3.12)$$

où n_{verre} correspond à l'indice de la lamelle de verre et n à l'indice du milieu d'observation, qui peut être l'air, l'eau ou un autre solvant (Figure 3.17). Sachant que les objectifs TIRF vérifient bien les conditions aplanétiques, il existe un rapport direct entre $\sin \theta$ et la position radiale r du spot laser dans le BFP :

$$r = a \sin \theta \quad (3.13)$$

où a est une constante. Pour $\theta = \theta_c$, $r = r_c = a (n / n_{\text{verre}})$. Le rayon interne de l'anneau SAF correspondant à l'angle critique, noté r_c , augmente donc linéairement avec l'indice de réfraction n du milieu d'observation (Figure 3.17).

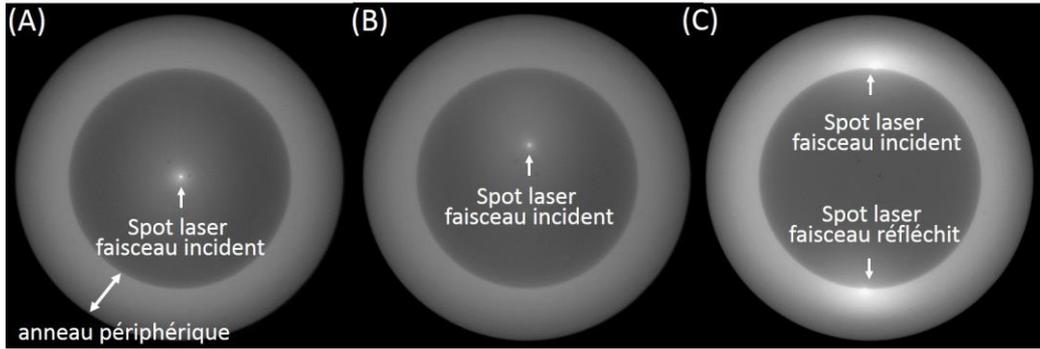


Figure 3.18 : Acquisitions du plan focal arrière de l’objectif pour différents angles d’incidence dans le cas de l’interface verre/air. (A) Pour $\theta = 0^\circ$, (B) pour $\theta < \theta_c$ (C) pour $\theta \geq \theta_c$. Les images ont été obtenues à partir d’une monocouche de QDs excitées à 488 nm et qui émettent à une longueur d’onde d’environ 510 nm.

Pour obtenir une courbe de calibration, il faut établir une relation de grandissement entre θ et α . Ainsi, nous avons mesuré les valeurs de α_c correspondant à différents angles critiques θ_c , en utilisant des milieux d’observation d’indice de réfraction différents (Tableau 3.1). Cette mesure peut se faire de trois manières différentes. La première consiste à superposer le spot laser juste à la frontière entre les régions UAF et SAF, comme illustré sur la figure 3.17. La deuxième vise à mesurer le rayon critique, autrement dit l’intensité maximale à l’intérieur de l’anneau périphérique. Et puis, extraire la valeur α_c correspondante, en ajustant la position radiale du spot laser pour qu’elle soit compatible avec r_c . Il est en effet possible d’extraire un profil radial moyen du BFP (Figure 3.19 (A)) en raison de la symétrie radiale du signal de fluorescence. Toutefois, la quantification de α_c la plus précise a été obtenue en traçant le signal de fluorescence en fonction de α (Figure 3.19 (B)). α est augmenté tous les 0.001 degrés et α_c est facilement déterminé puisque le signal de fluorescence des QDs sera maximal à $\theta = \theta_c$.

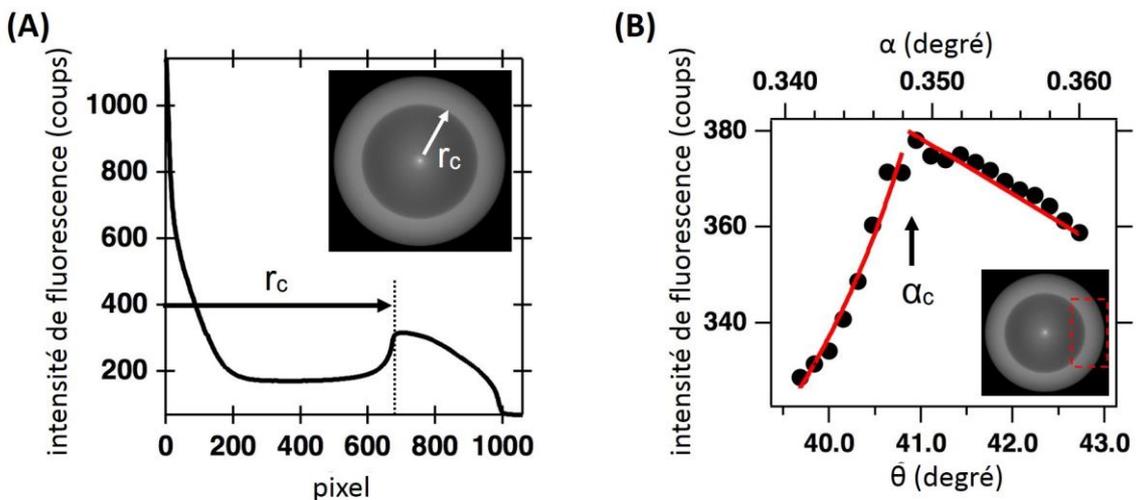


Figure 3.19 : Différentes stratégies pour mesurer α_c . (A) Profil radial moyen pour l’interface verre/air et à $\theta = 0^\circ$. Ce profil est obtenu avec une routine développée sous IGOR Pro. (B) Evolution de l’intensité de fluorescence des QDs en fonction de α et θ pour l’interface verre/air. Le signal est mesuré dans la région périphérique (rectangle en pointillé rouge) pour éliminer le spot laser. Il est ajusté en fonction de l’expression de γ pour une lumière moyenne polarisée s et p (tracés rouges).

Ainsi, en traçant les valeurs (α_c, θ_c) , nous avons obtenu les courbes de calibration représentées sur la [figure 3.20](#), pour les deux objectifs TIRF Olympus et Zeiss. Ensuite, nous avons ajusté numériquement ces valeurs avec l'équation (3.14). Cette fonction polynomiale prend en compte les aberrations résiduelles de l'objectif :

$$\theta(\alpha) = G\alpha + c_2\alpha^2 + c_3\alpha^3 \quad (3.14)$$

Le premier terme G correspond au grandissement angulaire du système optique (objectif + L_{GC}) en l'absence de toute aberration. c_2 et c_3 sont deux facteurs de correction liés aux aberrations. Cette figure montre clairement un grandissement angulaire non linéaire avec les objectifs de grande ON. Ceci est dû à des aberrations résiduelles. Ces dernières se caractérisent par le décalage de la zone d'irradiation ([Figure 3.12](#)), des aberrations sphériques et de courbure de champ. Bien que les objectifs de grande ouverture numérique sont faits pour minimiser toute sorte d'aberrations, elles apparaissent dès qu'on augmente l'angle d'incidence au maximum. De plus, il ne faut pas oublier que la lentille de tube du microscope joue un rôle important dans la correction des aberrations. Et que dans notre cas nous l'avons remplacé par une lentille conventionnelle L_{GC} pour focaliser le faisceau laser sur le BFP. Pour finir nous avons vérifié les conditions d'aplanétisme en traçant r_c en fonction de $\sin \theta_c$ (insert de la [figure 3.20](#)).

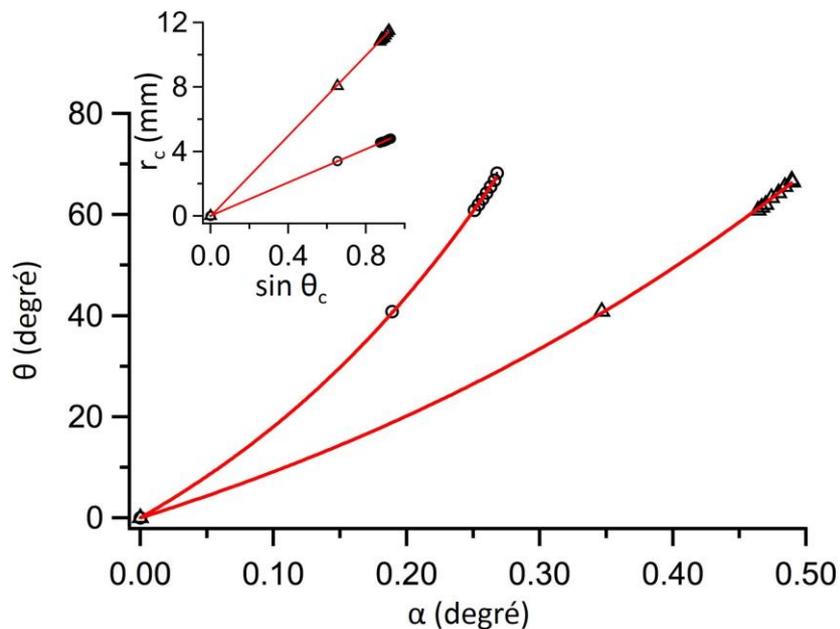


Figure 3.20 : Courbes de calibration de l'angle d'incidence θ en fonction de α . les valeurs expérimentales obtenues avec l'objectif Olympus sont représentées par des triangles et celles de l'objectif Zeiss par des cercles. Ces valeurs correspondent à différentes interfaces verre/air, verre/eau, verre/butanol et verre/mélange : eau/glycérol à différentes proportions. Les courbes rouges correspondent à l'ajustement numérique selon l'équation (3.14). L'insert correspond à la position radiale au niveau du BFP du r_c en fonction de $\sin \theta_c$.

Ainsi, en traçant les courbes de calibration, nous pouvons calculer toutes les valeurs de l'angle d'incidence θ à partir des valeurs de l'angle α . Et par la suite, nous pouvons déterminer la profondeur d'atténuation κ de l'onde évanescente selon l'équation (3.2).

Généralement, plus l'ouverture numérique d'un objectif est grande, plus les aberrations de courbures de champ sont importantes. Nous pouvons les visualiser d'une part, sur les images BFP où il y a une déformation en forme de croissant de lune du spot laser quand α est grand (Figure 3.21 (A)), d'autre part, l'image de l'échantillon présente un centre net avec les coins flous dus aux courbures du champ (Figure 3.21 (B)). Ceci est surtout visible sur l'image obtenue avec l'objectif Olympus d'ouverture numérique 1.49.

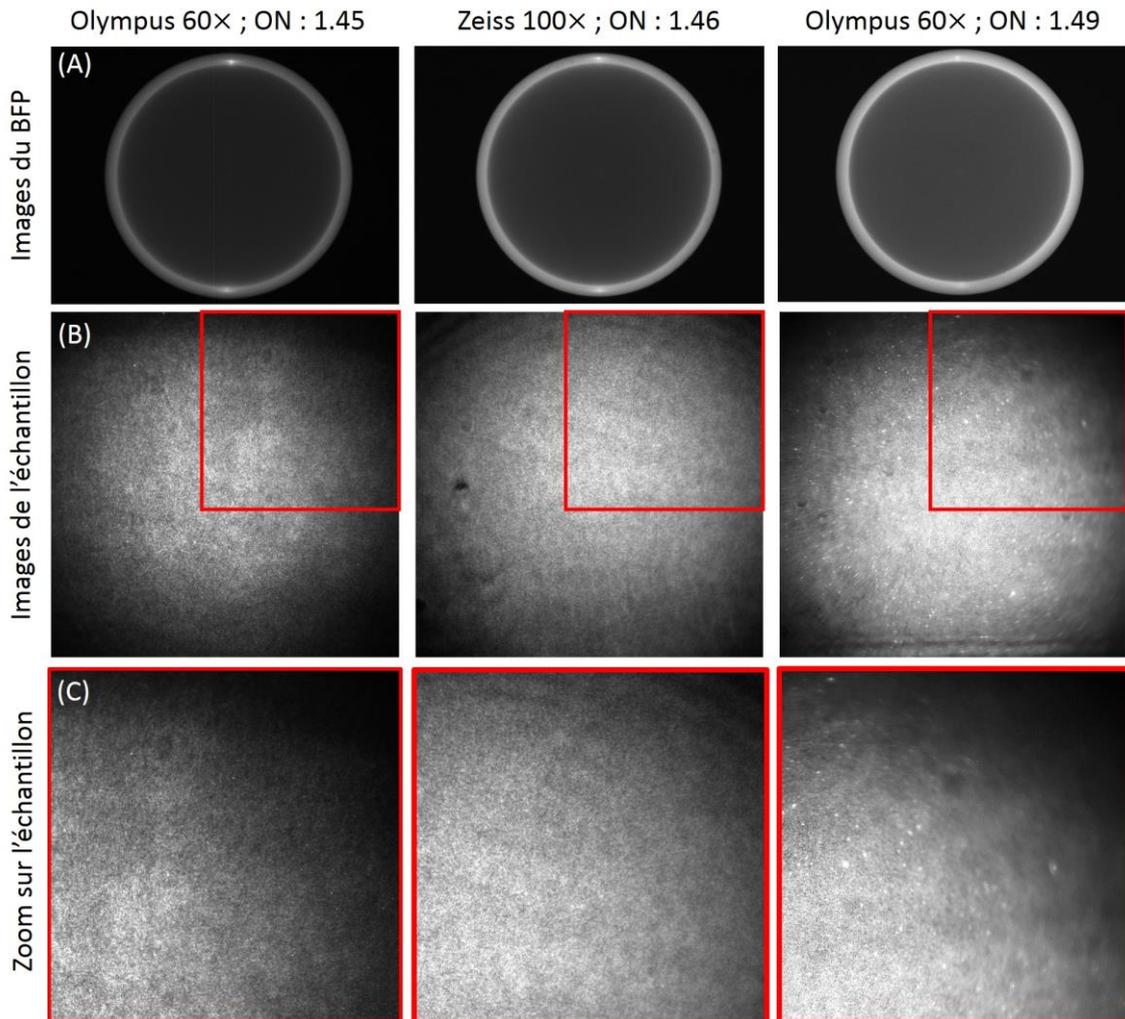


Figure 3.21 : Aberrations de type courbure de champ obtenues avec les différents objectifs utilisés. (A) Images du BFP avec $\theta \geq \theta_c$ pour l'interface verre/eau. Elles sont obtenues à partir d'une monocouche de QDs excitées à 488 nm et qui émettent à une longueur d'onde d'environ 510 nm. **(B)** Images correspondantes de l'échantillon. **(C)** Zoom sur les zones encadrées de l'échantillon.

3.3.3 Facteur de correction

L'excitation laser sur l'interface dépend de l'état de polarisation de la lumière incidente (section 2.4.3.2) et de l'angle d'incidence θ . Toutes mes expériences ont été réalisées en polarisation s, ainsi nous pouvons calculer la variation théorique de l'amplitude de l'onde évanescente sur l'interface en utilisant les équations (2.11) et (2.12). Il est cependant possible de mesurer expérimentalement l'évolution de γ en fonction de θ , en mesurant le signal émis par une monocouche de QDs qui présente une émission isotrope. Le signal de fluorescence

enregistré est proportionnel à γ , puisqu'on travaille avec des irradiations laser très faibles (pas de saturation de signal). Nous avons enregistré les images du BFP à différents angles d'incidence pour l'interface verre/eau. Nous avons normalisé ce signal par rapport à $\theta = 0$ et $\theta = 66.2^\circ$ (Figure 3.22). Pour vérifier la précision de notre méthode de calibration, nous avons comparé la dépendance angulaire théorique de γ aux observations expérimentales pour l'interface verre/eau. On observe une bonne concordance entre les mesures de γ et son évolution théorique, ce qui indique que la méthode de calibration choisie est très précise. Dans le régime évanescent entre 66° et 70° , l'évolution de γ suit un comportement quasi linéaire (insert de la figure 3.22) et s'ajuste par une fonction affine simple (équation (2.12)) :

$$\frac{\gamma_s(\theta \geq \theta_c)}{\gamma_s(\theta = \theta_1)} = a \cos^2 \theta \quad (3.15)$$

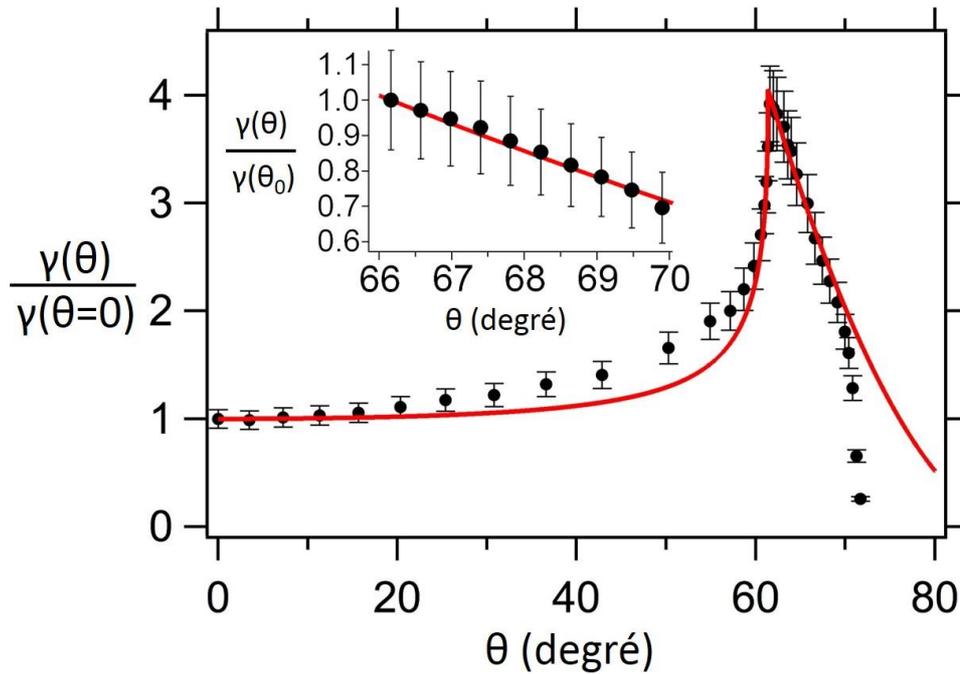


Figure 3.22 : Evolution de γ en fonction de l'angle d'incidence θ pour l'interface verre/eau obtenue avec l'objectif Olympus. Les points noirs et la courbe rouge représentent respectivement les données expérimentales et l'évolution théorique de γ . Les barres d'erreur correspondent aux écarts types expérimentaux. L'insert correspond au zoom dans la région évanescente où l'évolution relative de γ a été tracée et calculé à partir de $\theta_0 = 66.2^\circ$.

3.3.4 Vérification du zéro ($h = 0$)

Une dernière vérification de la procédure de calibration consiste à évaluer qu'on obtient bien $h = 0$ dans le cas où les émetteurs sont localisés sur la surface. Pour cela, j'ai testé la procédure de calcul de va-TIRFM sur un échantillon contenant une monocouche de PMMA dopée de QDs, déposée sur une lamelle de verre et couverte d'eau. J'ai obtenu une valeur moyenne aux alentours de zéro ($h = -8 \pm 12$ nm). Cette valeur dépend beaucoup de

l'homogénéité de l'échantillon étudié. Malheureusement juste déposer par centrifugation les QDs ne donne pas une monocouche parfaitement homogène. On trouve toujours de petits agrégats ou bien des trous au sein de l'échantillon. Cependant, la hauteur mesurée est comprise dans la gamme de résolution axiale du va-TIRF (typiquement 20 nm) et est suffisante pour prouver que la procédure de calcul est suffisamment précise.

3.3.5 Conclusion

Nous avons construit un système optique bien adapté pour mesurer la distance entre la membrane cellulaire et son substrat. Ensuite nous avons mis en place une procédure de calibration simple et bien adéquate pour déterminer l'angle d'incidence du faisceau laser sur la surface du verre, particulièrement utile en TIRF. Les principaux avantages de cette méthode sont sa facilité de mise en œuvre et sa grande fiabilité. Concernant l'échantillon de calibration, il peut être facilement obtenu en déposant par spin-coating un film dopé de QDs d'épaisseur nanométrique sur une lamelle de verre. Ensuite, les images du plan focal arrière de l'objectif ont été utilisées pour mesurer l'angle critique θ_c de différentes interfaces. Par conséquent, la procédure de calibration (Figure 3.20) nous donne l'angle d'incidence sur la surface avec une bonne précision, typiquement $\pm 0.1^\circ$. Cette précision convient à la plupart des expériences TIRF, permettant par exemple d'estimer la longueur d'atténuation du champ évanescent κ avec une précision nanométrique. Cette méthode de calibration a été appliquée avec succès à la microscopie TIRF à angle variable, pour étudier l'adhérence cellulaire en quantifiant les distances entre les cellules et le substrat [4,5].

4. EVALUATION DE L'ADHERENCE DE CELLULES INDIVIDUELLES PAR VA- TIRFM

4.1 Introduction

L'adhérence cellulaire est un processus très dynamique et multiparamétrique. Elle peut être étudiée à différentes échelles : de l'échelle nanométrique, au niveau des protéines, à l'échelle de l'ensemble de la cellule. L'étude de l'adhérence à l'échelle de la cellule individuelle s'est très largement développée ces dernières années. Plusieurs techniques optiques ont été développées, entre autres, la microscopie à haute résolution (PALM, STORM, STED, SIM, TIRFM, RICM...), la microscopie de force de traction (TFM) et les pinces optiques. Ces techniques peuvent être complétées par des méthodes non optiques telles que l'AFM, la microfluidique, les pinces magnétiques et les micropipettes. Ces techniques sont principalement utilisées pour visualiser et étudier les points focaux d'adhérence (PFA). Par exemple, la tomographie par cryomicroscopie électronique a décrit l'architecture moléculaire du réseau d'actine dans les adhérences focales [137], le PALM à deux longueurs d'onde a montré que les différentes protéines des PFA sont organisées en nano-agrégats [138], le SIM a permis de visualiser les différentes protéines des PFA sous forme de sous-unités linéaires bien distinctes avec une largeur et un espacement bien définis [26], l'iPALM a révélé une organisation multicouche des PFA le long de l'axe z [19], le STORM et le STED ont permis de mettre en évidence une réorganisation dynamique distincte dans les PFA selon leur état d'activité [139], le FRAP a montré que la dynamique et la distribution des protéines telles que la paxilline et la vinculine dépendent de l'emplacement et de l'orientation des PFA [140]. L'ensemble de ces techniques a permis d'étudier finement l'adhérence cellulaire en termes d'ultrastructure, de dynamique et d'organisation protéiques. Dans tous ces travaux, les auteurs se sont focalisés sur les aspects " spécifiques " de l'adhérence (reconnaisances protéiques), très peu se sont intéressés aux interactions non-spécifiques qui interviennent dans l'adhérence. Or les interactions non-spécifiques peuvent jouer un rôle crucial. Citons à titre d'exemple le rôle

complexe du glycocalyx. En maintenant une certaine distance entre les récepteurs d'une cellule et la MEC, le glycocalyx peut réguler la dynamique spatio-temporelle de la formation de liaisons adhésives [54]. Ainsi, le glycocalyx doit être comprimé lors de l'adhérence cellulaire pour permettre aux intégrines de se lier à la MEC. Sachant que certaines cellules cancéreuses ont un glycocalyx très volumineux, il faut que la cellule exerce une pression supérieure à 15 kPa pour pouvoir adhérer [141]. Cette résistance à la pression offerte par le glycocalyx peut en partie expliquer la perte d'adhérence dans les cellules tumorales circulantes. Le rôle important joué par le glycocalyx, illustre parfaitement l'enjeu qu'il y a, à l'heure actuelle, d'étudier simultanément les interactions spécifiques et non-spécifiques entre une cellule et son environnement. Dans ce contexte, le va-TIRFM permet d'une part, de représenter en temps réel la topographie de la membrane cellulaire avec une résolution axiale nanométrique, d'autre part, de distinguer les zones d'interactions spécifiques et non-spécifiques entre la cellule et la surface. Les interactions spécifiques seront visibles là où la membrane est très proche du substrat et là où n_{eff} est élevé (correspond à l'agglomération de protéines). Au contraire, les interactions non-spécifiques ont des effets beaucoup plus globaux et sont visibles sur l'ensemble de la cellule. Ainsi, en localisant à la fois les zones d'adhérence spécifique et non-spécifique, nous sommes en mesure de quantifier de façon très précise l'interaction d'une cellule avec la matrice.

Pour mettre en évidence l'intérêt de cette approche nous avons choisis d'étudier l'adhérence de cellules gliales, sur-exprimant et sous-exprimant les intégrines $\alpha 5\beta 1$, récepteurs de la fibronectine [142]. Ce chapitre, consacré à la méthodologie expérimentale et à l'exploitation des données, sera suivi d'une discussion sur les différents paramètres impliqués dans l'adhérence et la migration de ces cellules, entre autres, le taux d'expression d'intégrine $\alpha 5\beta 1$, la formation des plaques d'adhérence, leur taille, leur nombre et leur énergie.

4.2 Matériels et méthodes

4.2.1 Choix du modèle cellulaire : lignée U-87 MG

Durant mon travail de thèse, j'ai utilisé des cellules gliales fournies par l'équipe de Monique Dontenwill (Equipe Signalisation tumorale et cibles thérapeutiques – LBP UMR CNRS 7021, Strasbourg). Ces cellules ont été initialement établies à partir d'un glioblastome humain et appelées U-87 MG (ATCC[®] HTB-14[™]). Elles sont souvent utilisées dans les études d'adhérence sur la fibronectine puisqu'elles expriment différentes intégrines à leur surface, notamment les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3/\beta 5$ [143].

Concernant mes expériences, j'ai utilisé deux lignées cellulaires dérivées de la lignée U-87 MG [142]. La première sur-exprime la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine : elles seront désignées U-87 MG $\alpha 5+$. Ces dernières ont été transfectées de manière stable par un plasmide pcDNA3.1 contenant le gène humain de l'intégrine $\alpha 5$. La deuxième n'exprime pas (ou peu) la sous-unité $\alpha 5$ des intégrines : on les notera U-87 MG $\alpha 5-$. Ces dernières ont été transfectées de manière stable par un plasmide pSM2 qui est utilisé pour la transcription de petits ARN épingle à

cheveux (short hairpin RNA, shRNA). Ces shRNA ciblent l'ARNm spécifique codant pour l'expression de la sous-unité d'intégrine $\alpha 5$. Ces transfections ont été faites en utilisant jetPRIME® (Polypus transfection) conformément aux instructions du fabricant.

4.2.2 Culture cellulaire

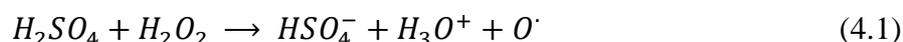
Les cellules sont maintenues en culture dans des flacons T25 traités pour la culture, de surface 25 cm² (Nunc™ EasYFlasks™, 156367, Thermo Scientific) placées en atmosphère humide à 5% CO₂, à 37°C. Les lignées sont cultivées dans du milieu EMEM (Minimum Essential Medium Eagle, BE12-611F, Lonza Bioscience) qui contient de la L-glutamine. Ce milieu est supplémenté par du Sérum de Veau Fœtal (SVF, 10270106, Thermo Scientific) à 10% et par un mélange d'antibiotiques (Pénicilline/Streptomycine) et d'antifongique (Amphotéricine B) à 1% (17-745E, Lonza Bioscience). L'entretien des cellules se fait dans des conditions stériles, sous une hotte à flux laminaire. Tout d'abord, le milieu de culture est enlevé et les cellules sont lavées 2 fois avec 5 mL d'une solution tampon PBS (Phosphate-Buffered Saline, pH = 7.2, 20012019, Gibco). Le tampon est ensuite retiré des T25 et 300 μ L de trypsine-EDTA 0.05% (25300-054, Gibco) sont ajoutés uniformément au fond de T25 pour décoller les cellules. Ces dernières sont ensuite incubées 3 à 5 minutes à 37°C. Pour inhiber l'action de la trypsine, 5 mL de milieu de culture complet sont ajoutés dans chaque flacon. Dans le but de quantifier le nombre de cellules, 10 μ L de suspension cellulaire sont mélangés avec 10 μ L du Bleu de Trypan 0.4% (T10282, Invitrogen). La densité cellulaire est estimée à l'aide d'un compteur de cellules automatique (Countess™ II Automated Cell Counter, AMQAX1000, Invitrogen). Les cellules sontensemencées à une concentration de 10⁴ cellules/mL. Pour le maintien en phase de croissance exponentielle les cellules sont passées 1 à 2 fois par semaine.

4.2.3 Préparation des échantillons

Pour étudier l'adhérence spécifique des cellules U-87 MG, il faut préparer les lamelles de verre afin d'y déposer une fine couche de fibronectine. Les cellules sontensemencées au-dessus de cette couche. La préparation de l'échantillon est réalisée dans des conditions stériles pour éviter toute contamination, bactérienne ou fongique.

4.2.3.1 Fonctionnalisation des lamelles de verre

La fibronectine adhère uniformément sur une surface de verre par simple physisorption. Pour obtenir une couche homogène de fibronectine, il faut tout d'abord bien nettoyer les lamelles de verre avec une solution de piranha. La solution de piranha traditionnelle est un mélange 3:1 d'acide sulfurique (H₂SO₄) et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 30% ou 35%. Elle est utilisée pour éliminer les résidus organiques des substrats selon la réaction suivante [144] :



Les radicaux libres O^\bullet réagissent avec la surface de verre (Figure 4.1) nous permettent d'obtenir une surface homogène avec des terminaisons SiOH qui induisent une attraction électrostatique des groupements amines présents sur la fibronectine.

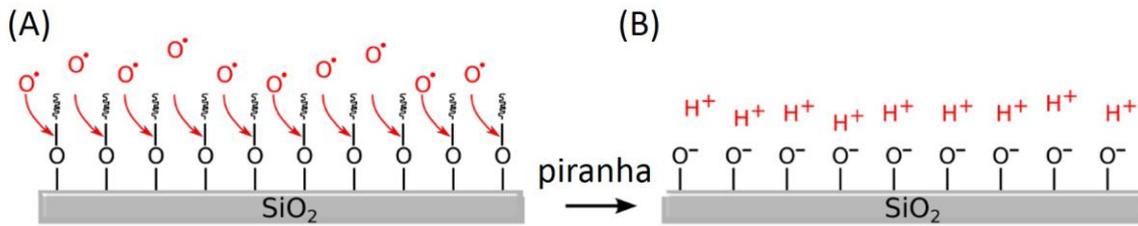


Figure 4.1 : Traitement des lamelles de verre au piranha. (A) Elimination des résidus organiques par les radicaux libres. (B) Surface propre présentant des terminaisons silanol SiOH, immergée dans l'eau. (extrait de la référence [36]).

Les lamelles de verre sont positionnées verticalement dans un bac Hellendahl contenant du H_2SO_4 (Sulfuric acid 95%, 7664-93-9, Fisher Chemical). Le peroxyde à 30% (Hydrogen peroxide 30%, 8070.2, Carl Roth) est ensuite ajouté très lentement à l'acide. Les lamelles sont exposées à ce mélange pendant 30 à 60 min à température ambiante. Ce mélange acide va provoquer immédiatement une réaction exothermique avec libération de gaz. L'ensemble est placé dans un bac de pyrex rempli d'eau. Il faut manipuler le piranha avec une extrême prudence. Les lamelles sont ensuite rincées à l'eau distillée et séchées à l'air sec. Par la suite, les lamelles sont incubées pendant 1h, avec une solution de fibronectine (Fibronectin Solution Human 1 mg/mL, C-43060, PromoCell) diluée à une concentration de 10 μ g/mL dans du PBS à pH = 7.2. Afin de se débarrasser de l'excès de protéine non adsorbée, les lamelles sont ensuite rincées à l'eau et puis séchées à l'air sec.

4.2.3.2 Mesures d'angles de contact

Pour vérifier l'homogénéité du dépôt de fibronectine sur la surface des lamelles, nous avons mesuré les angles de contact d'une goutte d'eau déposée sur les surfaces nettoyées et fonctionnalisées. Cette mesure permet d'estimer le degré d'hydrophobicité d'une surface. Elle est simple à réaliser et permet de vérifier rapidement la présence de fibronectine et l'homogénéité du dépôt. Elle consiste à déposer une goutte d'eau sur une surface et mesurer l'angle θ_c entre la surface et la goutte (Figure 4.2). Cet angle caractérise la mouillabilité « wetting behaviour » de la surface. Lorsqu'une goutte de liquide est déposée sur une surface, elle présente un profil sphérique, en raison de sa tension superficielle. Le profil de la goutte dépend d'un équilibre vectoriel de trois tensions (Figure 4.2 (D)) : la tension de surface du solide, notée σ_s , qui agit tout le long de la surface ; la tension aux interfaces solide-liquide, notée σ_{SL} , qui agit dans le sens opposé ; et la tension superficielle du liquide, notée σ_L , qui agit de manière tangentielle à la surface de la goutte. Le profil de la goutte peut être décrit par l'équation de Young :

$$\sigma_L \cos \theta_c = \sigma_s - \sigma_{SL} \quad (4.2)$$

Plus θ_c est grand, plus la surface est hydrophobe. De plus si la goutte présente un profil circulaire vu du haut, le dépôt est homogène. Toute fonctionnalisation de surface va changer les propriétés de la surface. Cette méthode de caractérisation est plus rapide et beaucoup plus simple à mettre en œuvre que d'utiliser la microscopie électronique ou à force atomique. La [figure 4.3](#) présente l'évolution de l'angle de contact au cours des différentes étapes de préparation de la surface. Ces mesures ont été faites après la mise au point du protocole de fonctionnalisation à l'aide de l'instrument optique de mesure des angles de contact (OCA15EC, DataPhysics Instruments) ([Figure 4.2 \(A\)](#)). Le logiciel de traitement d'image reconnaît et enregistre le contour de la goutte ([Figures 4.2 \(B\) et \(C\)](#)), ainsi que la ligne de base à l'interface solide-liquide, et adapte une fonction mathématique à la forme de la goutte.

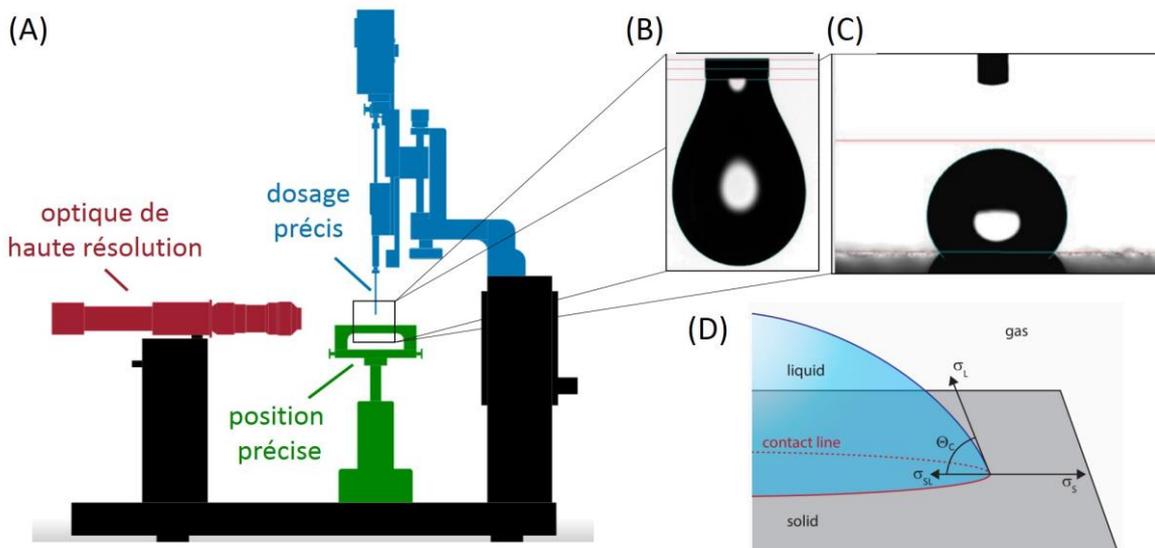


Figure 4.2 : Système de mesure des angles de contact. (A) Schéma représentant l'instrument optique de mesure d'angles de contact, combinant un système d'observation pour visualiser le profil de la goutte sur la surface, un pousse-seringue pour déposer un petit volume précis et un système de réglage de positionnement. (B) Profil d'une goutte juste avant son contact avec la surface. (C) Profil d'une goutte étalée sur une surface solide bien hydrophobe. (D) Schématisation des différentes tensions superficielles d'une goutte déposée sur une surface solide (extrait adapté de la référence [145]).

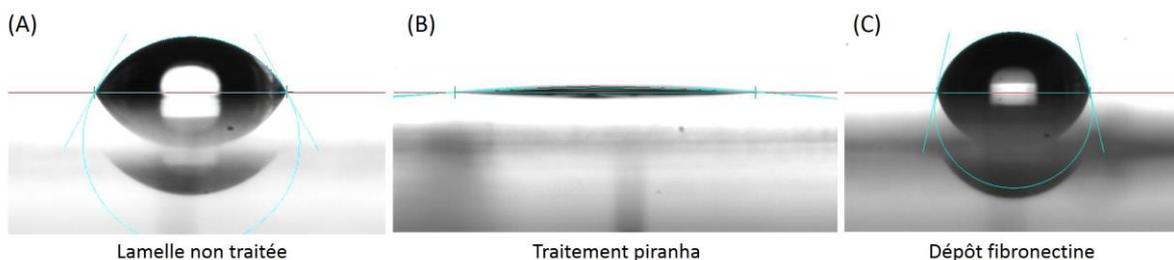


Figure 4.3 : Profil d'une goutte d'eau de 1 μ L déposée sur la surface d'une lamelle de verre : non traitée (A), nettoyée au piranha (B) et fonctionnalisée avec de la fibronectine (C). La ligne rouge représente la ligne de base au niveau de l'interface eau/substrat. Le profil est démarqué par l'ellipse dessinée en bleu. Après le nettoyage au piranha, les surfaces sont très hydrophiles et l'angle de contact est inférieur à 5° (l'appareil est incapable de mesurer avec précision des angles $\leq 5^\circ$).

Nous avons effectué une dizaine de mesure sur des lamelles de verre avec différents traitements (Tableau 4.1). Pour cela une goutte d'eau de 1 μL a été déposée sur la surface de la lamelle à l'aide d'un pousse-seringue (Figure 4.2 (A)). La mesure d'angle est faite à partir de l'image obtenue par le système. Une ligne de base est tracée au niveau de l'interface eau/substrat. Le profil de la goutte est déterminé par le logiciel SCA 20, qui utilise la méthode par arc d'ellipse pour déterminer l'angle de contact. Ainsi, tout le contour de la goutte est pris en compte et pas juste l'intersection du liquide avec la ligne de base. Les angles de contact des deux côtés de la goutte sont obtenus grâce à un ajustement numérique.

Tableau 4.1 : Mesures d'angles de contact à température ambiante (21°C).

Surface	Angle moyen (degré)	Ecart-type (degré)
Lamelle de verre non traitée	$\theta = 62.2^\circ$	$\Delta\theta = 2.3^\circ$
Lamelle de verre nettoyée au piranha	$\theta < 5^\circ$	-
Fibronectine	$\theta = 74.0^\circ$	$\Delta\theta = 6.4^\circ$

4.2.3.3 Marquage de la membrane plasmique avec de la DiO

Une fois les lamelles de verre fonctionnalisées, il faut marquer la membrane plasmique des cellules vivantes pour pouvoir étudier leur adhérence en va-TIRFM. J'ai utilisé pour cela la sonde fluorescente DiO. Ses propriétés ont été décrites dans la section 2.2.1. Je l'ai choisi parce qu'elle s'insère dans la membrane plasmique de façon homogène, marquant l'ensemble de la surface de la cellule. De plus, son émission est optimale lorsqu'elle est excitée en polarisation s.

Tout d'abord, une solution de DiO (3,3'-Diocetadecyloxycarbocyanine Perchlorate, D275, Invitrogen) diluée dans du DMF à une concentration de 700 μM est placée dans un bain à ultrasons pendant 10 min. Pendant ce temps on prépare les cellules. Le milieu de culture est enlevé et les cellules sont rincées 2 fois avec 5 mL d'une solution tampon PBS. Le tampon est ensuite retiré des T25 et 300 μL de trypsine-EDTA 0.05% sont ajoutés uniformément au fond de T25 pour décoller les cellules. Ces dernières sont ensuite incubées 3 à 5 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite resuspendues à une concentration d'environ 3×10^5 cellules/mL dans 1 mL de milieu d'observation non fluorescent DMEM^{sp}-2 (Dulbecco's Modified Eagle antibleaching live cell visualization medium, MC102, Evrogen). Ce milieu est supplémenté par de la L-glutamine (L-Glutamine 200 mM, 25030081, Gibco) à une concentration finale de 2 mM, du Sérum de Veau Fœtal à 1%, et de l'HEPES (HEPES Buffer Solution (1M), 15630-056, Gibco) à une concentration finale de 20 mM. Ensuite, 5 μL de DiO soniquée est ajoutée à la suspension cellulaire (la concentration finale de la DiO est de 3.5 μM). Les cellules sont incubées à l'étuve (37°C, 5% CO_2) pendant 5 min. Elles sont ensuite centrifugées à 1500 rpm pendant 5 min. Les cellules sédimentent au fond du tube et le surnageant qui contient l'excès de sondes fluorescentes non intégrées à la membrane est éliminé. Le culot cellulaire est repris dans 1 mL de milieu non fluorescent chauffé à 37°C. La centrifugation est refaite deux fois de plus pour

s'assurer d'avoir éliminé le maximum de DiO non liée à la membrane cellulaire. Les cellules sont ensuite resuspendues à une concentration de 12×10^3 cellules/mL dans le milieu d'observation chauffé à 37°C et puis déposées sur les lamelles de verre fonctionnalisées. L'ensemble est monté dans un porte-échantillon (section 3.2.3) et placé dans l'incubateur pendant 1 heure.

Pour pouvoir comparer toutes les données expérimentales, les expériences ont toutes été réalisées de la même manière. Les mesures va-TIRF sont faites pendant 1h à 37°C sous microscope. L'observation des cellules a été réalisé dans le milieu d'observation non fluorescent à 488 nm : DMEM^{gfp}-2. Ce milieu est dépourvu de rouge de phénol, de riboflavine et appauvri en acide folique. Il préserve les cellules dans un très bon état physiologique et ne génère quasiment pas de bruit de fond à 488 nm et à 561 nm. L'observation est réalisée à l'aide du montage expérimental va-TIRFM (Figure 3.8). Le signal de fluorescence des cellules vivantes et marquées est enregistré avec la caméra CMOS (ORCA-Flash 4.0, Hamamatsu). Les images sont traitées avec une routine développée avec le logiciel Igor Pro (Igor Pro 8, WaveMetrics).

4.2.3.4 Immunomarquage indirect : paxilline

Pour visualiser de façon usuelle les adhérences focales, j'ai choisi de faire un immunomarquage indirect avec un anticorps dirigé contre la paxilline. J'ai également réalisé un double marquage pour comparer ce qu'on observe en va-TIRFM, avec la distribution de la paxilline. Tout d'abord, j'ai marqué la membrane avec la DiO, comme présenté dans le paragraphe précédent. Ensuite j'ai fixé les cellules et réalisé un immunomarquage indirect.

Une fois les cellules marquées à la DiO et incubées pendant 1 heure à 37°C, le milieu d'observation est enlevé. Les cellules sont fixées pendant 10 min à température ambiante avec une solution filtrée (0.2 μ m) de paraformaldéhyde à 3.7% diluée dans du PBS (Paraformaldéhyde, 16% w/v, methanol free, 43368, Alfa Aesar) chauffée à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées trois fois avec du PBS, puis perméabilisées et saturées avec une solution filtrée (0.2 μ m) de saponine à 0.1% et BSA⁷ à 3% diluée dans du PBS, pendant 1h à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire (Paxillin Monoclonal Antibody (5H11), AHO0492, Invitrogen) dilué à une concentration finale de 1 μ g/mL dans la solution de PBS-Saponine 0.1%-BSA 3% pendant 3h à température ambiante. Pour cela, les lamelles sont installées dans une boîte de pétri avec du papier humide tout autour pour ne pas les assécher. Après incubation avec l'anticorps primaire, les cellules sont rincées trois fois avec du PBS puis incubées avec l'anticorps secondaire couplé à une Alexa 568 (Alexa Fluor™ 568 goat anti-mouse IgG (H+L), A11004, Invitrogen) dilué à une concentration finale de 2 μ g/mL dans la solution de PBS-Saponine 0.1%-BSA 3% pendant 45 min dans l'obscurité à température

⁷ La saponine (Saponin, 8047-15-2, Fisher Chemical) crée des pores là où la molécule de cholestérol est incluse dans la membrane plasmique. Ces pores se referment en absence de saponine. Ainsi, sa présence est nécessaire à toutes les étapes après la perméabilisation. L'albumine de sérum bovin (BSA, 04-100-812-E, Euromedex) est une protéine globulaire qui sert à minimiser les liaisons non-spécifiques de l'anticorps primaire.

ambiante. Les cellules sont ensuite lavées trois fois avec du PBS, puis soumises à une post-fixation de 2 min, à température ambiante dans une solution filtrée (0.2 μm) de paraformaldéhyde à 1% diluée dans le PBS (pour que les anticorps ne diffusent pas). Les cellules sont ensuite lavées trois fois avec du PBS, puis montées dans le porte-échantillon avec comme milieu d'observation du PBS.

4.2.3.5 Marquage du cytosquelette d'actine avec de la phalloïdine

Pour visualiser le cytosquelette d'actine, j'ai choisi de faire un marquage indirect avec un marqueur spécifique de la F-actine, la phalloïdine. Cette dernière est une toxine isolée du champignon mortel l'Amanita phalloïdes. Là encore j'ai fait un double marquage pour comparer ce qu'on observe en va-TIRFM avec la distribution de l'actine. Tout d'abord, j'ai marqué la membrane avec la DiO, comme présenté dans la section **4.2.3.3**. Ensuite j'ai fixé les cellules et réalisé un marquage avec la phalloïdine.

Le marquage du cytosquelette d'actine est réalisé après fixation par le paraformaldéhyde et la perméabilisation et saturation à l'aide d'une solution de PBS-Saponine 0.1%-BSA 1%. Les cellules sont ensuite incubées avec une solution de phalloïdine couplée à une Alexa 568 (Alexa Fluor™ 568 Phalloidin, A12380, Invitrogen) diluée à une concentration finale de 0.33 μM dans du PBS-Saponine 0.1%-BSA 1% pendant 40 min à l'abri de la lumière et à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées trois fois avec du PBS, puis soumises à une post-fixation de 2 min, à température ambiante dans une solution filtrée (200 μm) de PBS-1% paraformaldéhyde. Les cellules sont ensuite lavées trois fois avec du PBS, puis montées dans le porte-échantillon avec comme milieu d'observation du PBS.

4.2.4 Test de migration des cellules

Pour étudier la migration de nos deux types cellulaires U-87 MG $\alpha 5^+$ et $\alpha 5^-$, j'ai préparé des lamelles fonctionnalisées avec de la fibronectine et j'ai déposé les cellules vivantes non marquées au-dessus. J'ai laissé les cellules incuber 1h dans l'étuve (37°C, 5% CO₂) avec le milieu d'observation non fluorescent DMEM^{gfp}-2 supplémenté par la glutamine, le SVF et l'HEPES. La migration des cellules a été observé en réalisant une série d'images en contraste de phase et en champs large de l'échantillon à 37°C avec 5% de CO₂. Les images ont été acquises manuellement toutes les 10 minutes pendant 10 heures, à l'aide d'une caméra CMOS (ORCA-Flash 4.0, Hamamatsu). Cette série d'images est obtenue avec un microscope inversé (Zeiss Axio Observer D1) équipé d'un objectif à sec (Zeiss EC Plan-NEOFLUAR- Phase 2, 20 \times , ON = 0.5). Les images ont été traitées avec le logiciel Image J (National Institutes of Health).

4.3 Origines biologiques des contacts proches

4.3.1 Notions de contacts « proches » et « distants »

La microscopie va-TIRF consiste à enregistrer une série d'images TIRF en augmentant progressivement l'angle d'incidence du faisceau laser sur l'échantillon (Figure 4.4 (A)). Un simple traitement d'image permet de reconstruire la topographie de la membrane cellulaire au-dessus d'une lamelle de verre recouverte d'une fine couche de la fibronectine (Figure 4.4 (B)). Il est également possible d'extraire la distribution spatiale de l'indice effectif n_{eff} du cortex cellulaire (Figure 4.4 (C)). Les zones de contact spécifique, autrement dit les contacts proches (CC pour « Close Contact »), peuvent donc être localisées là où la membrane est très proche du substrat ($h < 70$ nm, i.e. sur l'image topographique les zones en bleu foncé) et là où n_{eff} est élevé ($n_{eff} > 1.39$, i.e. les zones en rouge sur l'image d'indice) comme illustré sur les figures 4.4 (B) et (C). Dans cet exemple, les zones de contacts proches représentent une petite partie des interactions membrane/substrat (8% de la surface de contact). Le reste de la cellule, autrement dit les contacts distants (DC pour « Distant Contact »), regroupent les interactions non-spécifiques. Ce double seuillage sur h et n_{eff} permet de reconstruire une nouvelle image (Figure 4.4 (D)) qui fait apparaître les contacts proches (en rouge), et les contacts distants (en bleu). On peut également distinguer les CC des DC sur la distribution des hauteurs en appliquant un seuillage sur l'indice, $n_{eff} > 1.39$ (Figure 4.4 (E)).

La figure 4.4 montre très clairement que les cellules n'adhèrent pas de façon uniforme, mais présentent plusieurs contacts proches apparaissant principalement à l'avant et à l'arrière de la cellule. L'histogramme des distances h montre que la majorité de la membrane cellulaire est située entre 50 et 200 nm, comme déjà observé précédemment sur d'autres lignées [4,56,146]. D'autres informations peuvent être extraites des distributions des hauteurs. Le premier paramètre est la hauteur moyenne séparant la membrane cellulaire du substrat, notée $\langle h \rangle$. J'ai mesuré cette hauteur sur 20 cellules U-87 MG $\alpha 5+$ différentes adhérentes sur la fibronectine. J'ai obtenu une hauteur moyenne $\langle h \rangle = 148$ nm. L'écart-type des hauteurs moyennes est $\sigma_{\langle h \rangle} = 13$ nm. Cette faible disparité entre $\langle h \rangle$ montre que la hauteur de la membrane ne change pas de manière significative entre les différentes cellules. Comme expliqué précédemment, le double seuillage sur h et n_{eff} permet de distinguer les contacts proches et distants et d'analyser les distributions de hauteur correspondantes. Sur les cellules $\alpha 5+$ j'ai trouvé que $\langle h \rangle_{CC} = 74$ nm avec $\sigma_{\langle h \rangle_{CC}} = 6$ nm, et $\langle h \rangle_{DC} = 160$ nm avec $\sigma_{\langle h \rangle_{DC}} = 12$ nm. Ainsi là encore la hauteur moyenne de la membrane au niveau des contacts spécifiques et non-spécifiques ne varie pas notablement d'une cellule à l'autre. Au niveau des contacts proches, l'indice effectif est typiquement supérieur à 1.39. Ceci implique que l'indice de réfraction cytoplasmique local dans ces régions est légèrement supérieur ou voisin de 1.39 [4] (Figure 3.4 (C)). Cette augmentation significative de l'indice cytoplasmique peut s'expliquer en partie par la présence de fibres de stress d'actine au niveau des points focaux d'adhérence [48].

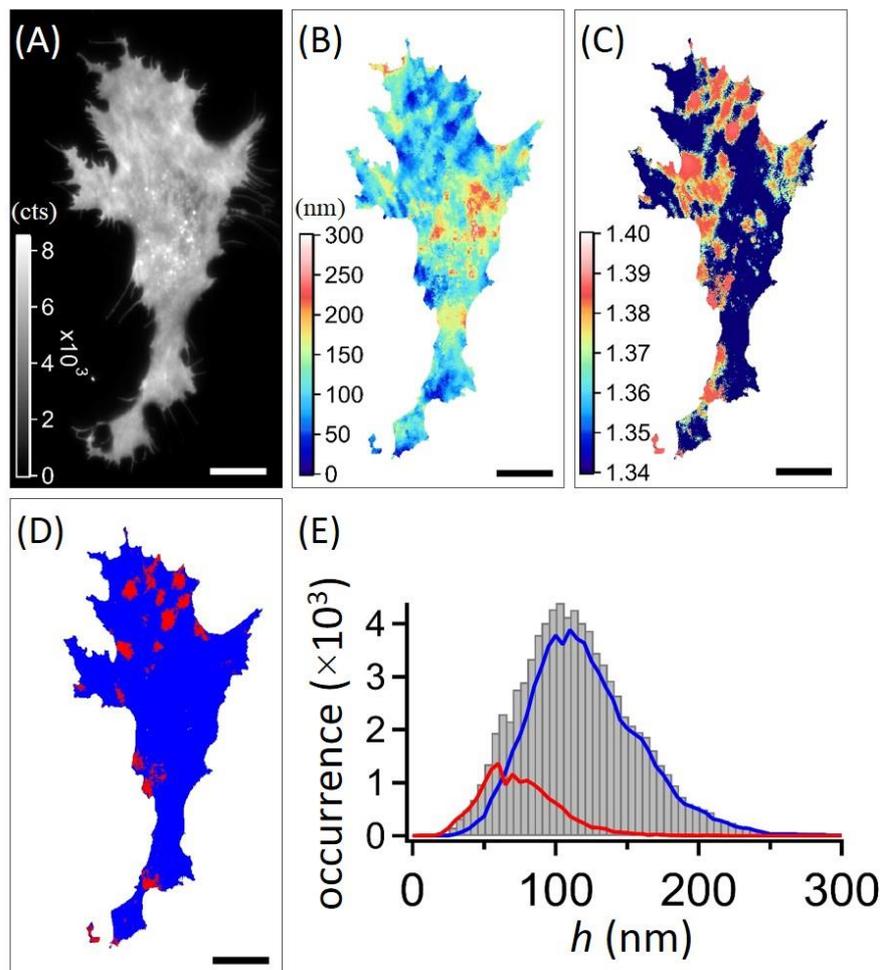


Figure 4.4 : Exemple d'analyse va-TIRF sur une cellule U-87 MG $\alpha 5+$ adhérente sur une fine couche de fibronectine à 37°C (marquage de la membrane avec de la DiO). Une des images TIRF (A), la topographie de la membrane plasmique (B), l'indice effectif n_{eff} (C), la localisation des contacts proches qui apparaissent en rouge sur fond bleu (D) et la distribution de la distance entre membrane et substrat des contacts proches (tracé rouge), des contacts distants (tracé bleu) et pour l'ensemble (tracé gris) (E). La fluorescence a été collectée à l'aide d'un objectif à immersion ($ON = 1.45$; 60 \times) pour une excitation laser à 488 nm et un temps d'acquisition de 100 ms par image. La barre d'échelle représente 10 μm .

4.3.2 Définition des différents paramètres de seuillage

Pour caractériser l'adhérence en va-TIRFM, nous avons introduit la notion de zones de contacts proches et distants en faisant un double seuillage sur la hauteur h et l'indice de réfraction n_{eff} . Toutefois pour établir un lien entre les contacts proches et les PFA, j'ai marqué une protéine des plaques d'adhérence (la paxilline) et les filaments d'actine du cortex cellulaire. Pour co-localiser la paxilline et l'actine avec les contacts proches, j'ai besoin de définir différents ratios de recouvrement. Chacun de ces ratios représentent le rapport entre l'aire du recouvrement défini par un double ou un triple seuillage, et une seconde aire de recouvrement défini par un simple ou un double seuillage. Par exemple, $R_{h,n}^{h,n,pax}$ est le rapport entre l'aire de recouvrement défini par le triple seuillage suivant la hauteur h , l'indice n_{eff} et un niveau d'intensité de fluorescence de la paxilline, et l'aire des contacts proches :

$$R_{h,n}^{h,n,pax} = \frac{S_{h,n,pax}}{S_{h,n}} \quad (4.3)$$

où $S_{h,n,pax}$ n'est rien d'autre que l'aire de recouvrement entre les contacts proches et les plaques de paxilline. Le dénominateur $S_{h,n}$ représente l'aire des contacts proches. Plusieurs autres rapports R peuvent être également définis concernant l'actine, comme :

$$R_{h,n}^{h,n,act} = \frac{S_{h,n,act}}{S_{h,n}} \quad (4.4)$$

$$R_n^{n,act} = \frac{S_{n,act}}{S_n} \quad (4.5)$$

Dans l'équation (4.5), S_n n'est rien d'autre que l'aire défini lorsqu'on applique un seuillage par rapport à n_{eff} . Les niveaux de seuillage en intensité sur les images TIRF de paxilline et d'actine varient d'une image à l'autre. La valeur de seuillage a été ajustée afin de bien localiser les PFA ou les filaments d'actine. Concernant h et n_{eff} , les seuillages ont été réalisés constamment pour $h \leq 70$ nm et $n_{eff} \geq 1.39$.

4.3.3 Origine de n_{eff}

Dans le but de vérifier que l'augmentation de l'indice effectif est due à une forte augmentation locale de la concentration de protéines, comme les fibres de stress, nous avons décidé de marquer le cytosquelette d'actine et de comparer sa distribution spatiale avec les zones d'augmentation de l'indice effectif. Ce marquage a été réalisé sur des cellules U-87 MG $\alpha 5+$ fixées. La fixation et la perméabilisation endommagent notablement la membrane cellulaire. Il en résulte que l'observation de la membrane en va-TIRF est délicate. La [figure 4.5](#) montre que les cellules fixées présentent des trous dans leur membrane même en utilisant la saponine ([Figures 4.5 \(B\) et \(C\)](#)) à la place du triton ([Figure 4.5 \(A\)](#)). L'utilisation d'un détergent améliore la pénétration des anticorps ou molécules fluorescentes dans les cellules, mais élimine également les lipides de la membrane plasmique [147,148]. Ainsi, après la perméabilisation, la plupart des colorants de la famille des carbocyanines utilisés pour marquer la membrane vont être retirés en même temps que les lipides membranaires [147]. La perméabilisation avec la saponine et le marquage direct ([Figure 4.5 \(C\)](#)) causent le moins de dommage possible sur la membrane cellulaire. Cette modification de la composition de la membrane après fixation et perméabilisation, provoque également un rapprochement des cellules ($\langle h \rangle = 77$ nm avec $\sigma_h = 14$ nm) et entraîne la descente du noyau. Ceci fait augmenter de façon artéfactuelle, les valeurs de l'indice effectif et la surface des contacts proches. Etant donné que notre méthode d'analyse repose sur le marquage uniforme de la membrane plasmique, travailler sur des cellules fixées et perméabilisées n'est pas un choix optimal. On peut avoir des faux-positifs et des faux-négatifs dus simplement à la fixation, d'où l'intérêt de

travailler sur des cellules vivantes. En sélectionnant les cellules les moins endommagées, j'ai pu néanmoins extraire des informations pertinentes qui font apparaitre le lien entre indice de réfraction n_{eff} et agglomération de protéines.

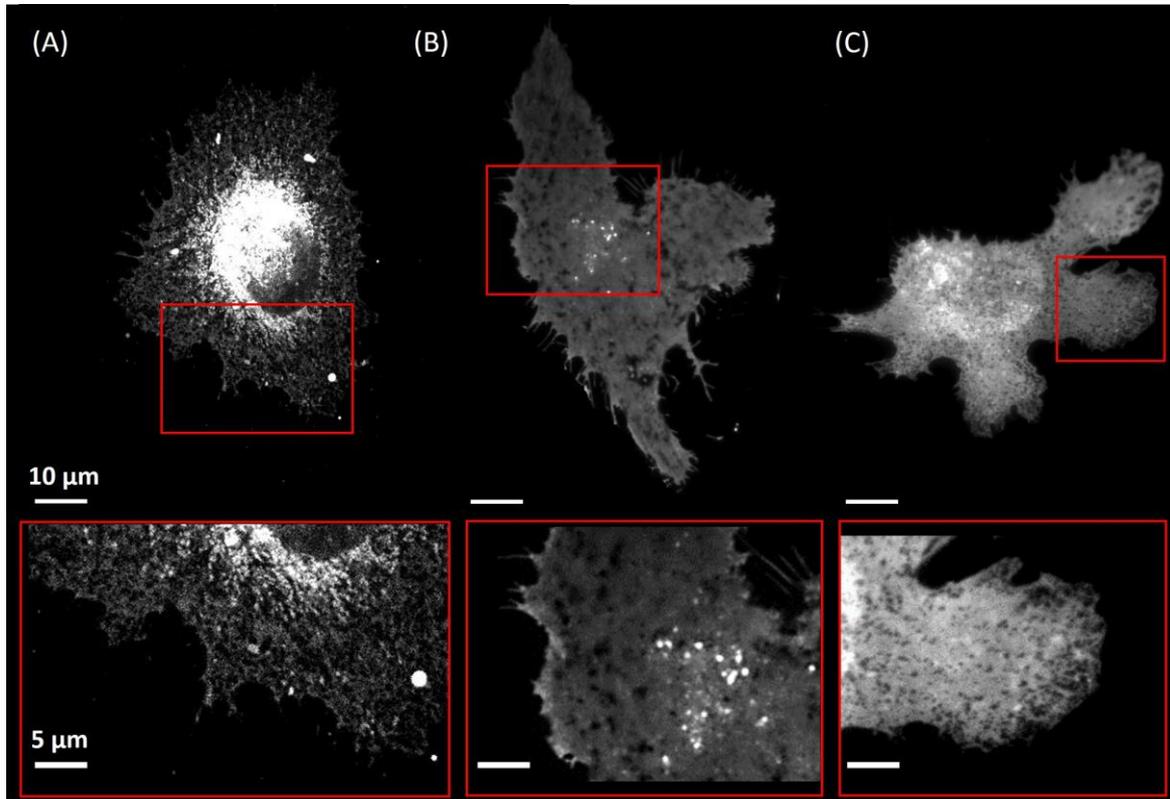


Figure 4.5 : Effet de la fixation et de la perméabilisation sur la membrane plasmique des cellules U-87 MG $\alpha 5+$, marquée avec de la DiO. Image confocale d'une cellule perméabilisée avec une solution de triton X-100 à 0.1% et suivie d'un immunomarquage avec un anticorps dirigé contre la paxilline. Elle est réalisée avec un objectif à immersion 60 \times monté sur un microscope confocal (Leica TCS SPE II) (A). Image TIRF d'une cellule perméabilisée avec une solution de saponine à 0.1% et suivie d'un immunomarquage avec un anticorps dirigé contre la paxilline (B) ou bien suivie d'un marquage direct avec la phalloïdine (C). La fluorescence a été collecté à l'aide d'un objectif à immersion ($ON = 1.49$; 54,8 \times) pour une excitation laser à 488 nm et un temps d'acquisition de 100 ms par image. Les images de bas représentent des zooms des zones encadrées.

Après l'analyse de quelques dizaines de cellules fixées suivant le protocole le moins invasif, i.e. avec une solution de saponine à 0.1%, nous avons mis en évidence que 42% de la surface de contact où n_{eff} est grand (≥ 1.39) se recouvre avec le cortex d'actine ($\langle R_n^{n,act} \rangle = 42\%$, $\sigma_{R_n} = 12\%$). Un exemple d'analyse de résultats est montré sur la [figure 4.6](#). Les flèches jaunes sur les [figures 4.6 \(C\)](#) et [\(D\)](#) indiquent les zones où on observe simultanément un signal de fluorescence intense de l'actine et un indice effectif supérieur à 1.39, les flèches bleues l'inverse. L'image de recouvrement entre les fibres de stress et les zones où n_{eff} est élevé ([Figure 4.6 \(E\)](#)) a été obtenue par un double seuillage du signal de fluorescence ([Figure 4.6 \(D\)](#)) et de l'indice effectif ($n_{eff} \geq 1.39$, [Figure 4.6 \(C\)](#)). A noter que le seuillage sur l'intensité de la phalloïdine a été choisi pour sélectionner que les fibres d'actine ([Figure 4.6 \(D\)](#)). Dans cet exemple, $\langle R_n^{n,act} \rangle = 51\%$.

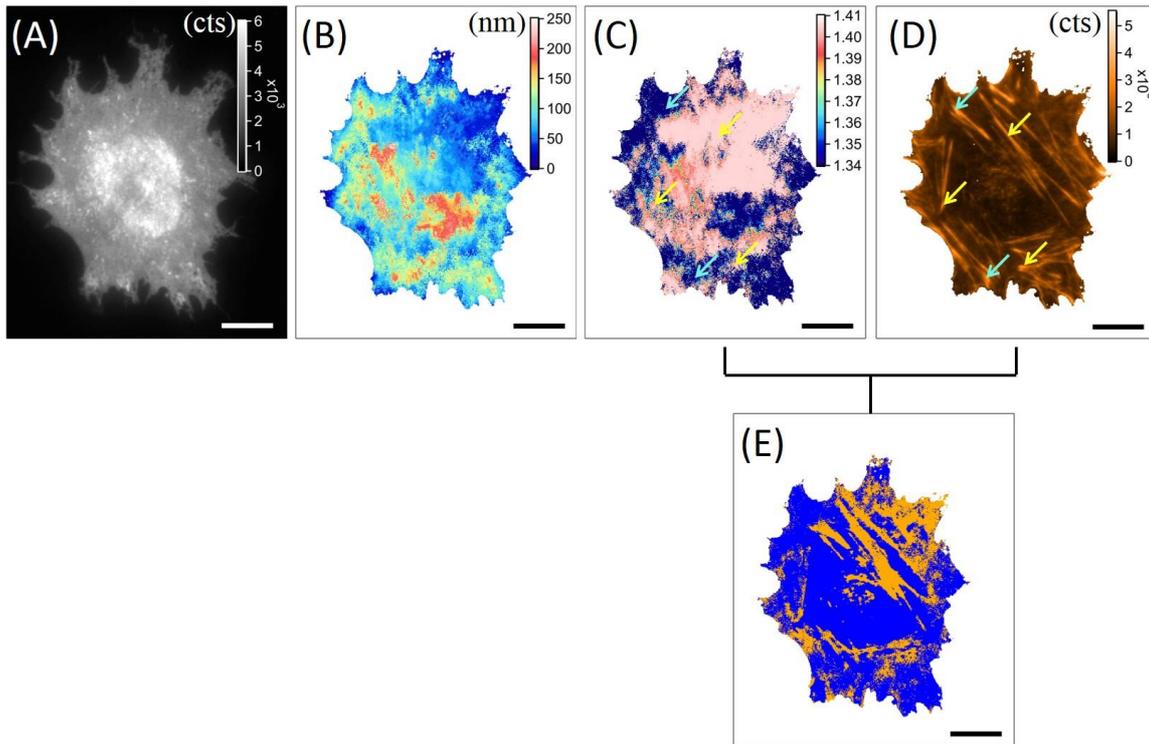


Figure 4.6 : Exemple d'analyse va-TIRF d'une cellule U-87 MG $\alpha 5+$ fixée sur une fine couche de fibronectine avec le cytosquelette d'actine marqué. Une des images TIRF (A), topographie de la membrane plasmique (B), variation spatiale de l'indice effectif n_{eff} (C), actine marquée avec de la phalloïdine (D), et recouvrement des zones d'indice effectif élevé avec l'actine (E). Les flèches représentent des zones avec des fibres de stress et $n_{eff} > 1.39$ (jaunes) ou bien $n_{eff} \approx 1.34$ (bleues). La fluorescence de la membrane marquée à la DiO a été collecté à l'aide d'un objectif à immersion ($ON = 1.49$; $54,8\times$) pour une excitation laser à 488 nm et un temps d'acquisition de 100 ms par image. Celle de la phalloïdine visualisée à l'aide de la molécule d'Alexa 568, a été collecté à l'aide du même objectif pour une excitation laser à 561 nm et un temps d'acquisition de 100 ms. La barre d'échelle représente 10 μm .

Sur la [figure 4.6\(A\)](#), on observe nettement que le noyau est plutôt proche de la surface ([Figure 4.6 \(B\)](#)) et qu'en-dessous l'indice effectif est plutôt élevé ([Figure 4.6 \(C\)](#)). Ceci est clairement un effet de la fixation car le noyau n'est jamais visible de cette manière en TIRF sur des cellules vivantes. Cette extension des zones d'indice supérieur à 1.39 peut expliquer, entre autres, le recouvrement partiel avec le cortex d'actine. Une autre explication pourrait être la présence de grandes fibres de stress, qui vont générer un signal de fluorescence très intense en TIRF, même si elles sont assez éloignées de la surface (flèches bleues sur les [figures 4.6 \(C\)](#) et [\(D\)](#)). Cependant même si le recouvrement entre n_{eff} et l'actine n'est pas total, cette expérience a permis de mettre clairement en évidence le lien entre l'augmentation de n_{eff} et l'agglomération de protéines comme l'actine. Ainsi, il existe au niveau du cortex cellulaire et sur la membrane un grand nombre de protéines qui jouent un rôle plus ou moins important dans l'adhérence et qui seront à l'origine de l'augmentation de n_{eff} , comme par exemple les glycoprotéines du glycocalyx.

4.3.4 Origine des contacts proches

Pour vérifier que ce qu'on appelle des contacts proches incluent bien les contacts focaux, j'ai localisé simultanément une protéine du PFA (la paxilline) avec les contacts proches obtenus par l'analyse va-TIRFM (double seuillage sur h et n_{eff}). La paxilline est une protéine adaptatrice qui se lie à la fois aux intégrines et à de nombreuses protéines de signalisation cellulaire et d'organisation du cytosquelette d'actine. On la retrouve au niveau des adhérences focales médiées par les intégrines [149]. Elle est ainsi une cible de choix pour visualiser les PFA (Figure 4.7). Après fixation et perméabilisation, la membrane est partiellement détruite autour du PFA. Ainsi, sur les cellules enregistrées, très peu ($\approx 40\%$) donnent des résultats exploitables.

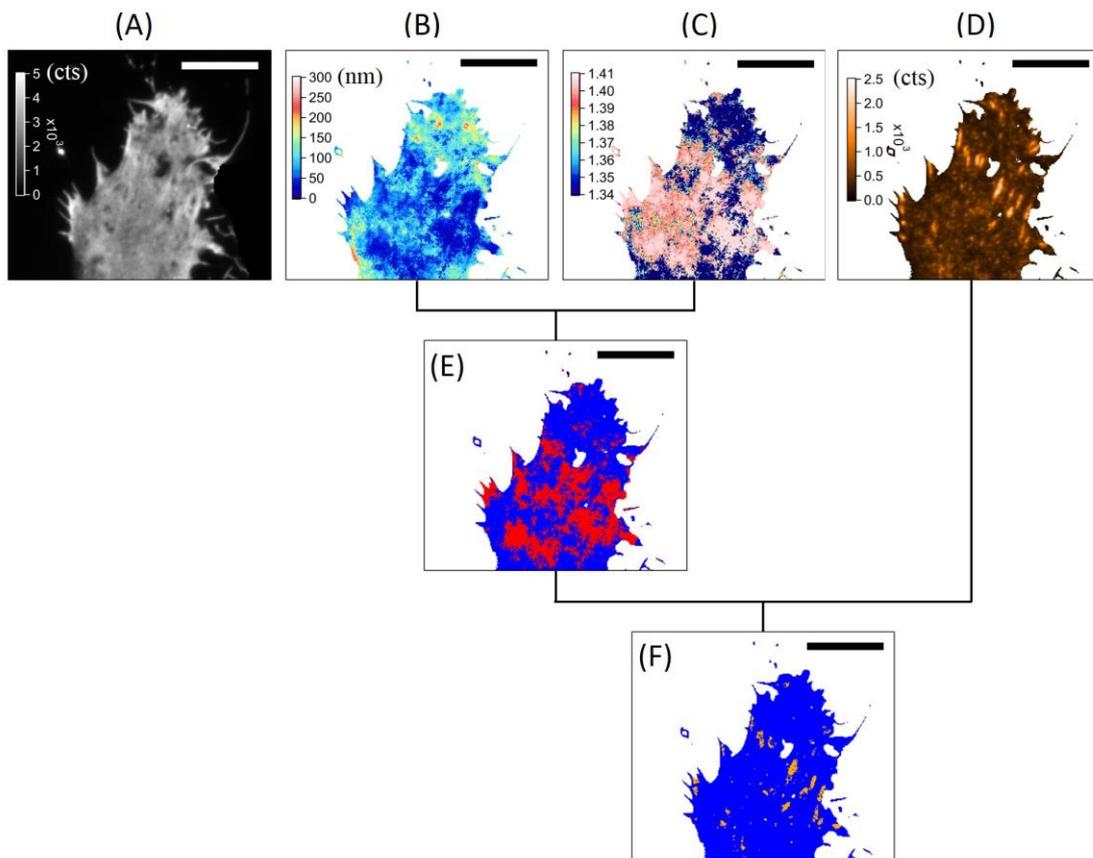


Figure 4.7 : Exemple d'analyse va-TIRF d'une fraction de cellule U-87 MG $\alpha 5+$ fixée sur une fine couche de fibronectine avec la paxilline marquée. Une des images TIRF (A), topographie de la membrane plasmique (B), variation spatiale de l'indice effectif n_{eff} (C), distribution de la paxilline (D), localisation des contacts proches qui apparaissent en rouge sur fond bleu (E) et recouvrement des zones de contacts proches avec des sites de paxilline (F). La fluorescence de la membrane marquée à la DiO a été collectée à l'aide d'un objectif à immersion ($ON = 1.49$; $54,8\times$) pour une excitation laser à 488 nm et un temps d'acquisition de 100 ms par image. Celle de la paxilline visualisée à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à la molécule d'Alexa 568, a été collectée à l'aide du même objectif pour une excitation laser à 561 nm et un temps d'acquisition de 100 ms. La barré d'échelle représente $10 \mu m$.

L'immunodétection de la paxilline sur 16 cellules différentes montre que le ratio $R_{h,n}^{h,n,pax}$ moyen est de 16% (avec un écart type de 5%). Ce faible pourcentage est dû au fait que les contacts proches occupent une surface plus importante que la paxilline, comme on peut le voir sur les figures 4.7 (E) et (F). Cependant, 62% en moyenne ($\pm 10\%$) des plaques de paxilline

se recouvrent complètement ou partiellement avec les zones de contact proches. Ce nombre passe à $(77 \pm 8) \%$ si on ne tient pas compte de l'indice de réfraction dans le seuillage. Autrement dit, même si la surface totale des PFA est bien plus faible que celle des contacts proches, environ deux tiers des plaques d'adhérence focale sont co-localisées avec les contacts proches. Le fait qu'on n'obtienne pas 100% de co-localisation, peut s'expliquer par le fait que la fixation endommage la membrane. On perd ainsi une partie de l'information sur l'indice au niveau des PFA. Un exemple d'analyse de résultats est montré sur la [figure 4.7](#). Sur 27 plaques de paxilline identifiées par seuillage d'intensité sur la [figure 4.7 \(D\)](#), 23 plaques se recouvrent avec les contacts proches (85% de recouvrement). Par contre, en termes de surface on trouve un taux de recouvrement que de $R_{h,n}^{h,n,pax} = 12\%$ ([Figure 4.7 \(F\)](#)). Si on compare cette fois-ci le recouvrement entre les contacts proches et les fibres d'actine, on trouve un taux de recouvrement moyen plus important qu'avec la paxilline ($\langle R_{h,n}^{h,n,act} \rangle = 38\%$, $\sigma_{\langle R \rangle} = 8\%$). Sur l'exemple de la [figure 4.8](#) : on trouve un ratio de 52.3% ([Figures 4.6 \(E\) et \(F\)](#)). Ainsi, les fibres d'actine sont non seulement responsables de l'augmentation de l'indice effectif, mais font aussi partie des contacts proches.

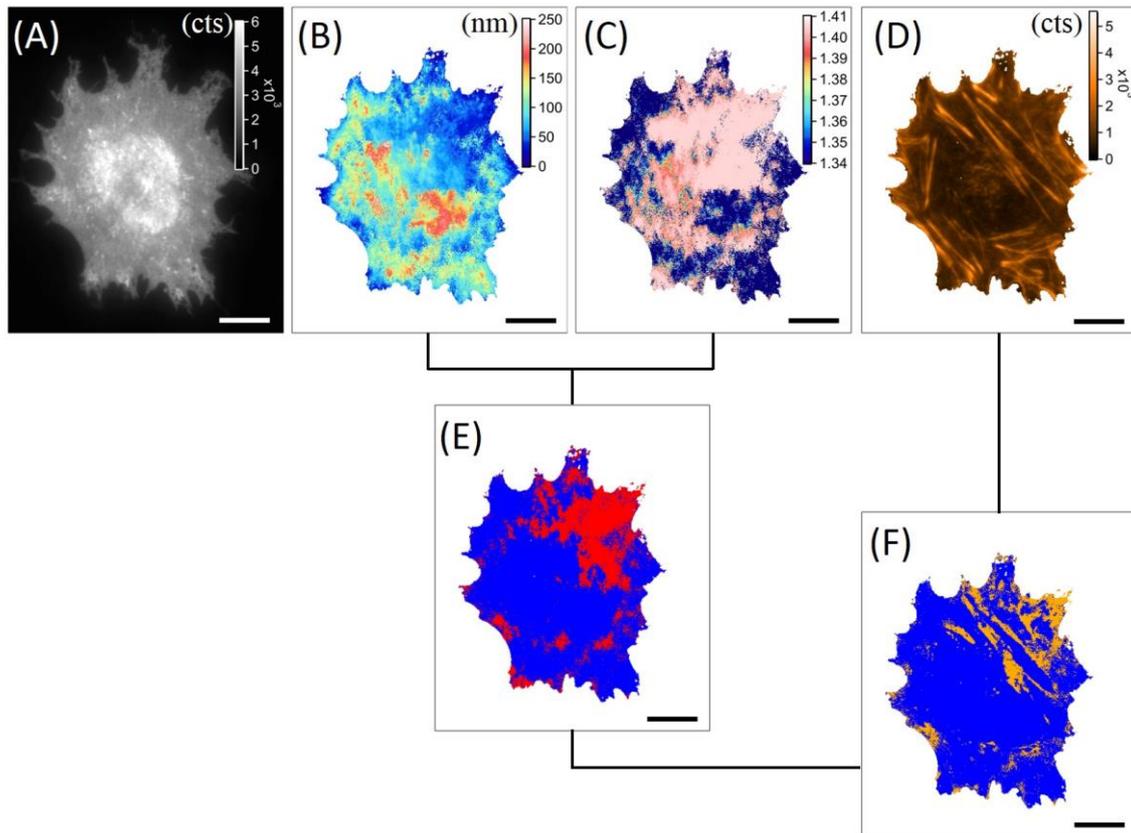


Figure 4.8 : Exemple d'analyse va-TIRF d'une cellule U-87 MG $\alpha 5+$ fixée sur une fine couche de fibronectine avec le cytosquelette d'actine marqué. Une des images TIRF (A), topographie de la membrane plasmique (B), variation spatiale de l'indice effectif n_{eff} (C), actine marquée à la phalloïdine (D), localisation des contacts proches qui apparaissent en rouge sur fond bleu (E) et recouvrement des zones contacts proches avec des sites de l'actine (F). La fluorescence de la membrane marquée à la DiO a été collectée à l'aide d'un objectif à immersion ($ON = 1.49$; $54,8\times$) pour une excitation laser à 488 nm et un temps d'acquisition de 100 ms par image. Celle de la phalloïdine visualisée à l'aide de la molécule d'Alexa 568, a été collectée à l'aide du même objectif pour une excitation laser à 561 nm et un temps d'acquisition de 100 ms. La barre d'échelle représente $10 \mu m$.

Après l'analyse des images sur cellules fixées, j'ai trouvé un meilleur taux de recouvrement en terme de surface avec l'actine ($\langle R_{h,n}^{h,n,act} \rangle = 38\%$) qu'avec la paxilline ($\langle R_{h,n}^{h,n,pax} \rangle = 16\%$). Ceci peut être expliqué en partie par la présence de trous dans la membrane après l'immunomarquage (Figure 4.5). Ainsi la fixation/perméabilisation peut-être à l'origine de ce faible recouvrement. En effet, j'ai observé sur plusieurs cellules que la membrane est détruite là où se localise la paxilline. On peut aussi imaginer que la paxilline ne soit pas suffisamment dense pour augmenter l'indice effectif. Il faut peut-être marquer plusieurs protéines de l'adhésome pour les corrélérer avec l'augmentation de l'indice. Ce recouvrement faible avec la paxilline peut être aussi dû au fait que la paxilline n'est pas présente de façon homogène au niveau de tous les points focaux [150]. Les adhérences fibrillaires, par exemple, contiennent un taux relativement faible de paxilline et plutôt un taux élevé de tensine [150,151].

Seulement deux tiers des plaques de paxilline se recouvrent avec les zones de contacts proches. A l'opposée avec l'actine, on a toujours un recouvrement entre un site de close contact et un filament d'actine. Il ne faut pas oublier que la vitesse du flux d'actine est supérieure à celle des protéines adaptatrices [152]. La vitesse d'élongation de l'actine est typiquement $\approx 0.5 \mu\text{m}/\text{sec}$ [153,154], alors que celle des plaques d'adhérence est $\approx 0.5 \mu\text{m}/\text{min}$ [26]. En conséquence, on peut tout à fait imaginer avoir marqué des plaques de paxilline qui ne participent plus à l'adhérence et qui font partie d'anciens contacts focaux ou bien qui ont été endocytées pour être recyclées.

Tableau 4.2 : Récapitulatif des différents taux de recouvrement sur cellules fixées.

Seuillage	Valeur moyenne (%)	Ecart-type σ (%)	Nombre de cellules
$R_{h,n}^{h,n,pax}$	16	5	n = 16
$R_{h,n}^{h,n,act}$	38	8	n = 31
$R_n^{n,act}$	42	12	n = 31

A partir de l'analyse des images va-TIRF de cellules U-87 MG $\alpha 5+$ fixées, où l'actine et la paxilline ont été marquées, on a trouvé que les contacts proches contiennent ces deux protéines (tableau 4.2). Le point marquant dans nos observations est que les contacts proches, définis en seuillant sur la hauteur h et l'indice de réfraction n_{eff} , occupent une surface plus importante que la surface propre des PFA (paxilline) et des filaments du cortex d'actine : les PFA ne représentent que 16% de la surface des contacts proches, les filaments d'actine 38%. En conclusion, ce qu'on appelle un « close contact » est un domaine membranaire qui est plus grand qu'un point focal. Il inclue les contacts focaux, qu'on appelle également plaques d'adhérence, mais aussi sûrement d'autres protéines, comme les récepteurs de facteurs de croissance [155], les protéoglycanes [156] et les tétraspanines⁸ [3]. Ces protéines influencent le

⁸ Les tétraspanines sont des protéines transmembranaires impliquées dans la formation de micro-domaines membranaires spécifiques, et jouent un rôle dans l'adhérence cellulaire, la signalisation et le trafic membranaire.

« clustering » des intégrines et participent donc à l'adhérence cellulaire. L'intérêt de notre technique est de quantifier l'adhérence sans faire de marquage spécifique afin de ne pas perturber le système cellulaire. Ces contacts spécifiques identifiés en va-TIRF doivent nous permettre d'extraire des informations liées à la paxilline, à l'actine mais aussi à d'autres protéines indispensables à la signalisation et à l'adhérence cellulaires. D'ailleurs c'est très intéressant de voir que lorsqu'on veut quantifier le nombre de points focaux d'adhérence entre les deux lignées $\alpha 5+$ (sur-exprime la sous-unité $\alpha 5$ des intégrines) et $\alpha 5-$ (sous-exprime la sous-unité $\alpha 5$ des intégrines), on trouve également une différence significative d'expression de la paxilline (Figure 4.9). Cette observation corrobore le western blot (Figure 4.9 (C)). Ce dernier montre bien qu'on a une surexpression et sous expression des intégrines dans ces deux lignées. De plus, les tests de migration montrent que les cellules $\alpha 5+$ migrent plus vite que les cellules $\alpha 5-$ [143], ce qui va dans le sens de la surexpression des intégrines. Dans la suite de ce chapitre, en observant des cellules vivantes et non marquées spécifiquement, je vais montrer que notre analyse va-TIRF montre bien une différence significative de distribution des contacts proches entre les deux lignées.

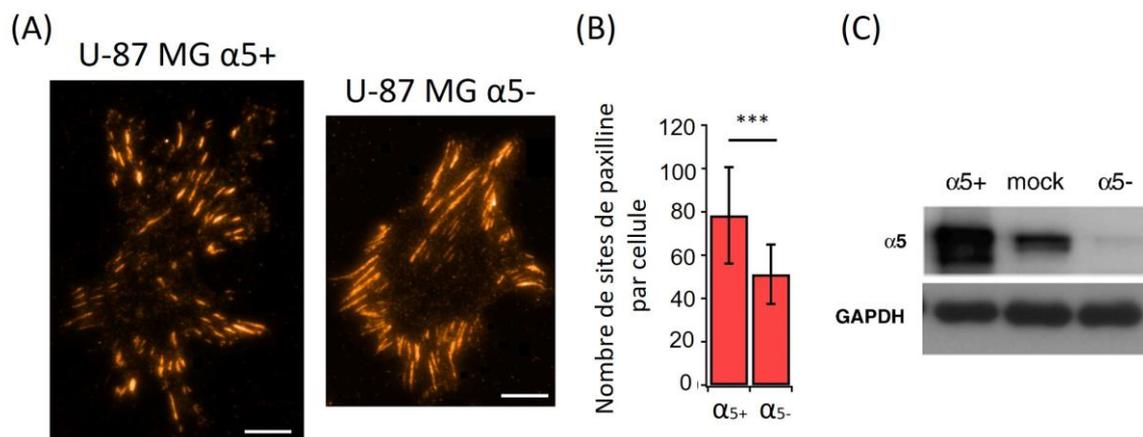


Figure 4.9 : Un exemple de cellules U-87 MG $\alpha 5+$ et $\alpha 5-$ fixées sur une couche fine de fibronectine avec la paxilline marquée. (A) Images TIRF de cellules $\alpha 5+$ et $\alpha 5-$ à température ambiante. La paxilline a été localisée à l'aide d'un anticorps primaire et visualisé à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à la molécule d'Alexa 568. Illumination TIRF à l'aide d'un laser à 561 nm et d'un objectif de grandissement 54.8 \times , d'ouverture numérique 1.49. La barre d'échelle correspond à 10 μm . (B) Représentation graphique du nombre de plaques de paxilline par cellule pour les deux lignées. Les barres d'erreur représentent +/- l'écart-type. Les analyses statistiques ⁹ nous ont données une valeur de $p \leq 10^{-6}$. (C) Vérification de l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ des intégrines par Western blot (extrait de la référence [143]). GAPDH a été utilisée comme contrôle de dépôt pour l'analyse Western Blot. Mock est le contrôle de transfection.

⁹ Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Igor Pro, $*10^{-3} \leq p \leq 10^{-2}$, $**10^{-5} \leq p \leq 10^{-4}$ et $***p \leq 10^{-6}$ avec un test de Mann-Whitney Wilcoxon.

4.4 Energie d'adhérence

A partir des distributions de distance on peut déterminer le potentiel d'interaction entre la cellule et le substrat, aussi appelé énergie libre d'interaction, et obtenir une énergie de dissociation directement liée à la force d'adhérence [5]. Cette donnée est particulièrement utile pour étudier et caractériser la dynamique d'adhérence d'une cellule en déplacement ou bien à comparer l'adhérence entre deux lignées différentes. Comme je l'ai déjà expliqué, les interactions entre la cellule et la surface sont régies par des forces spécifiques et non-spécifiques. Toutes les molécules impliquées dans ces processus peuvent se déplacer librement en fonction de la fluidité de la membrane plasmique et la réorganisation du cytosquelette. Par conséquent, un mouvement de type brownien (d'origine thermique) va réguler l'évolution dans le temps de la hauteur h qui sépare la membrane du substrat. Il en résulte que la probabilité de trouver la membrane à une hauteur h , après un long temps d'observation, est donnée par la statistique de Boltzmann. Si $p(h)$ est la densité de probabilité de trouver la membrane à une hauteur h , alors :

$$p(h) = c_n e^{-V(h)/k_B T} \quad (4.6)$$

où c_n est un facteur de normalisation tels que $\int p(h)dh = 1$, $k_B T$ correspond à l'énergie thermique et $V(h)$ est l'énergie potentielle qui comprend toutes les interactions spécifiques et non-spécifiques. La densité de probabilité peut être évaluée en mesurant l'évolution de la distance membrane/substrat d'une cellule unique au cours du temps. Cependant il est également possible d'obtenir $p(h)$ en sommant les distributions des hauteurs enregistrées sur plusieurs cellules différentes (hypothèse ergodique). C'est de cette manière que j'ai opérée. A partir de l'équation (4.6), il est possible de déterminer $V(h)$ en prenant le logarithme de $p(h)$:

$$\frac{V(h)}{k_B T} = -\ln p(h) + \text{constante} \quad (4.7)$$

La constante dans cette équation est donnée par la valeur minimale de $V(h)$. Elle dépend du facteur de normalisation c_n , et change avec le « binning » utilisé pour tracer la distribution $p(h)$ (Figure 4.10 (A)). Ainsi, on peut s'affranchir de cette constante en traçant [157,158] :

$$\frac{V(h) - V_m}{k_B T} = -\ln p(h) \quad (4.8)$$

où V_m est la valeur minimale de $V(h)$ et la hauteur correspondante est notée h_m , $V(h_m) = V_m$. Ainsi, il est possible d'obtenir l'allure de l'énergie potentielle qui régit les interactions cellule/substrat, comme sur l'exemple de la figure 4.10.

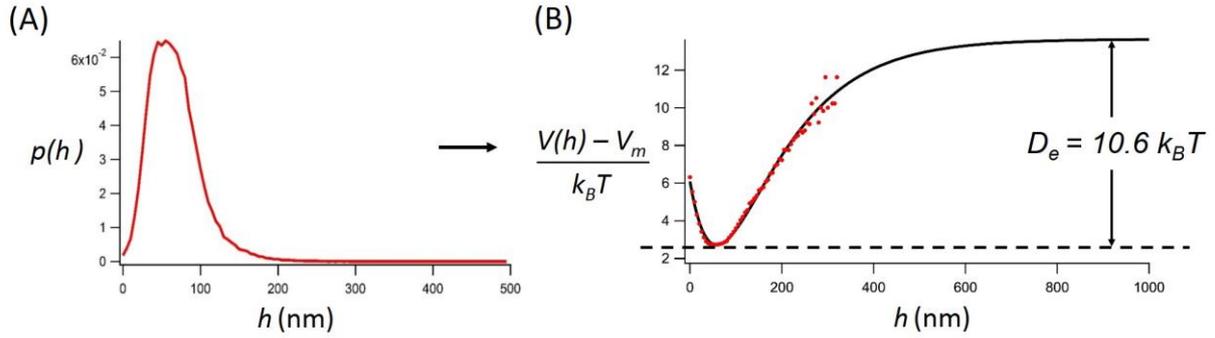


Figure 4.10 : Exemple d'analyse de la distribution des distances membrane/substrat des contacts proches. (A) La distribution normalisée des distances $p(h)$ enregistrée sur un ensemble de 20 cellules U-87 MG $\alpha 5+$ adhérentes sur une couche mince de fibronectine. (B) Le potentiel d'interaction $V(h)$ correspondant, calculé à partir de $p(h)$ et ajusté par une fonction de Morse (courbe noire). Dans cet exemple, l'énergie de dissociation D_e obtenue est d'environ $11 k_B T$.

Ainsi, les équations (4.7) et (4.8) permettent de tracer l'énergie potentielle globale qui régit les interactions cellule/substrat. La figure 4.10 (B) montre clairement que le profil de l'énergie potentielle, autour de son minimum, n'est pas symétrique. Ceci signifie que $V(h)$ ne peut pas être ajusté par un potentiel harmonique. Une des principales caractéristiques du $V(h)$ est que l'énergie d'interaction doit être nulle, lorsque la membrane plasmique est très éloignée de la surface. Ainsi, $V(h)$ tend vers une valeur constante lorsque la cellule est éloignée de l'interface ($h \rightarrow \infty$). Cela montre que le modèle le mieux adapté pour décrire les interactions cellule/substrat est un potentiel anharmonique [159]. L'expression la plus adaptée pour ajuster cette courbe est la fonction de Morse [160] :

$$V(h) = V_m + D_e (1 - e^{-\beta(h-h_m)})^2 \quad (4.9)$$

où D_e correspond à l'énergie de dissociation, définie sur la figure 4.10 (B) comme étant la profondeur du puits de potentiel et β une constante. D_e est égale à la différence entre l'énergie potentielle minimale V_m et l'énergie potentielle asymptotique lorsque $h \rightarrow \infty$. Cette énergie de dissociation est un paramètre clé pour quantifier l'adhérence et la migration cellulaire [5]. Ce paramètre, complété par d'autres comme la surface de contact, permet entre autres de calculer les énergies surfaciques d'adhérence des interactions spécifiques et non-spécifiques.

4.5 Mise en évidence de la surexpression de $\alpha 5$ par va-TIRFM

4.5.1 Approche expérimentale

Comme je l'ai déjà expliqué dans le chapitre 1, les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire font intervenir les intégrines. Ces dernières forment des adhésomes constitués d'un ensemble de protéines dynamiques qui vont activer des voies de signalisation impliquées dans la migration cellulaire [3]. L'activation des intégrines et la formation des adhésomes ainsi que leurs fonctions va dépendre de plusieurs paramètres tels que la maturité

du PFA, la composition du microenvironnement cellulaire, la force exercée sur la cellule, etc. La complexité des mécanismes mis en jeu dans les interactions intégrine/MEC rend difficile la corrélation entre adhérence et migration. Ainsi, l'étude de l'effet du taux d'expression de la sous-unité $\alpha 5$ des intégrines et les interactions cellule/substrat par va-TIRFM pourrait donner lieu à une toute nouvelle approche pour mieux quantifier l'adhérence et la migration des cellules. Pour mettre en évidence l'intérêt de cette approche nous avons choisis d'étudier l'adhérence de cellules gliales, sur-exprimant et sous-exprimant la sous-unité $\alpha 5$ des intégrines [142].

En va-TIRF, il faut préalablement choisir un intervalle angulaire d'observation de façon à être constamment en régime évanescent sur l'ensemble de la cellule, même sous le noyau. Cet intervalle doit être compris entre 60.9° (qui correspond à l'angle critique pour l'interface verre/eau) et l'angle maximum donné par l'ouverture numérique de l'objectif. J'ai choisi de démarrer la progression angulaire de $\theta \approx 66^\circ$ à $\theta \approx 70^\circ$, avec un pas de $\alpha = 0.002^\circ$ au niveau de la platine de rotation M_R . Au-delà de cette valeur les images de fluorescence présentent un bruit de fond trop important et certaines aberrations rendent ces images difficilement exploitables. La progression angulaire choisie est donnée dans le [tableau 4.3](#). Les valeurs de θ sont déterminées à partir de la courbe de calibration $\theta(\alpha)$ (section [3.3.2](#)). Une image TIRF a donc été enregistrée pour chacun des angles d'incidence ([Tableau 4.3](#)). Des images de bruit de fond sur une zone sans cellules pour la même progression angulaire ont également été enregistrées. Pour chaque θ , les images de fond sont moyennées et ajustées à l'aide d'une fonction Gaussienne 2D (équation (3.10), [Figure 3.12](#)). Ainsi, un profil typique du fond va être soustrait à chaque image TIRF. Ce bruit de fond provient principalement du bruit propre de la caméra CMOS (offset = 100 coups) et de l'auto-fluorescence des protéines du sérum contenu dans le milieu d'observation (environ 20-30 coups). La hauteur membrane/substrat est calculée à partir de cette série d'images et à l'aide d'une procédure développée dans l'équipe sous Igor Pro. Au cours du calcul, le programme soustrait le fond pour chaque image TIRF, ensuite il détermine h et n_{eff} pour chaque pixel (section [3.1.2](#)).

Tableau 4.3 : Progression angulaire en va-TIRFM avec l'objectif 1.45 d'ouverture numérique.

α (degré)	0.488	0.490	0.492	0.494	0.496	0.498	0.500	0.502	0.504	0.506
θ (degré)	66.05	66.46	66.86	67.27	67.67	68.08	68.49	68.90	69.31	69.72

4.5.2 Résultats et discussion

Un exemple typique illustrant le comportement d'une cellule $\alpha 5^+$ et $\alpha 5^-$ en adhérence sur une surface recouverte de fibronectine est montré sur la [figure 4.11](#) : les images TIRF donnent un aperçu de l'étalement cellulaire. Ces deux cellules présentent un profil migratoire. Sur la [figure 4.11 \(A\)](#), la cellule $\alpha 5^+$ se trouve dans un stade final de migration, elle est en rétraction. Sur la [figure 4.11 \(F\)](#), la cellule $\alpha 5^-$ se trouve plutôt tout au début du processus de migration, elle crée des protrusions pour choisir dans quelle direction elle va se diriger. L'image des distances h obtenues en va-TIRF montre l'étirement de la membrane sur le substrat. Sur cet

exemple, la surface de contact de la cellule $\alpha 5+$ est de $331.8 \mu\text{m}^2$ (Figure 4.11 (B)) alors que la cellule $\alpha 5-$ s'étale sur une aire de $225.2 \mu\text{m}^2$ (Figure 4.11 (G)). Les images topographiques montrent que l'étalement des cellules est très hétérogène sur la surface. Les contacts proches ont été déterminés comme les zones ayant une hauteur inférieure à 70 nm et un indice effectif supérieur à 1.39 (Figures 4.11 (C) et (H)). On trouve ainsi, que les cellules $\alpha 5+$ présentent plus de contacts proches : $22.8 \mu\text{m}^2$ au total, alors que les cellules $\alpha 5-$ $6.6 \mu\text{m}^2$ (Figures 4.11 (D) et (I)). La distribution des hauteurs (Figures 4.10 (E) et (J)), montre également la différence de proportions entre les contacts spécifiques et non-spécifiques qu'il est possible d'observer entre ces deux lignées.

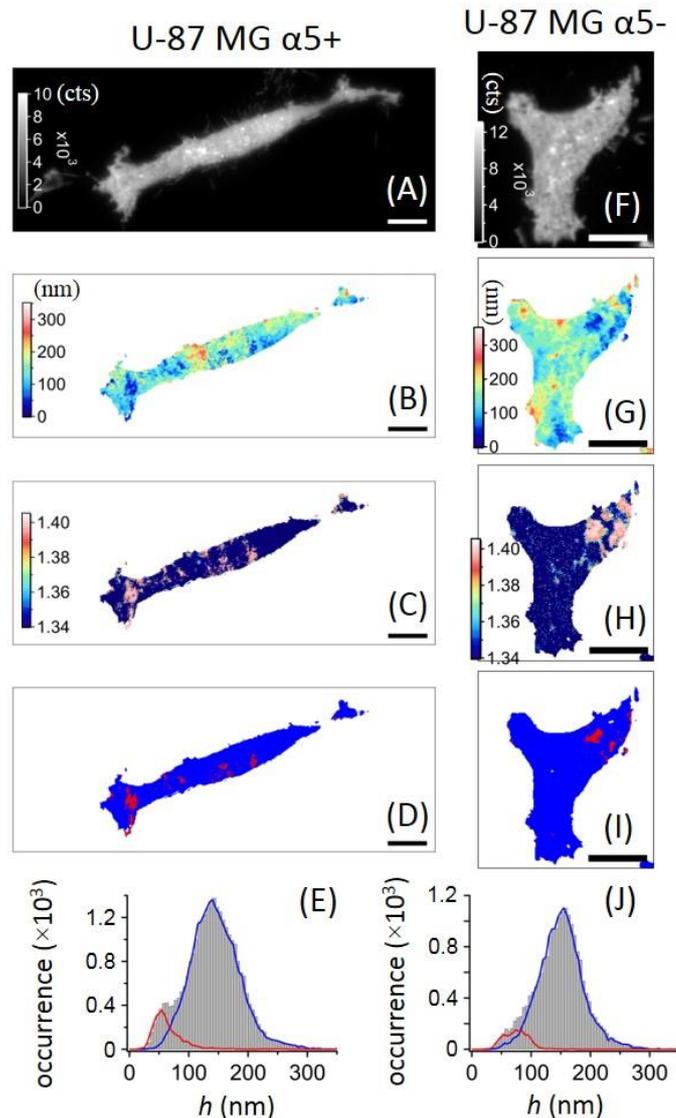


Figure 4.11 : Exemple d'analyse va-TIRF de cellules U-87 MG adhérees sur une fine couche de fibronectine à 37°C (marquage de la membrane avec de la DiO). Une des images TIRF de la cellule $\alpha 5+$ (A) et de la cellule $\alpha 5-$ (F), topographie de la membrane plasmique (B) et (G), variation spatiale de l'indice effectif n_{eff} (C) et (H), localisation des contacts proches qui apparaissent en rouge sur fond bleu (D) et (I), et distribution de la distance entre membrane et substrat des contacts proches (tracé rouge) et des contacts distants (tracé bleu) (E) et (J). Sur l'image (D) les contacts proches représentent 6.9% de la surface de contact, alors que sur l'image (I) ils ne représentent que 2.9%. La fluorescence a été collectée à l'aide d'un objectif à immersion ($ON = 1.45$; $60\times$) pour une excitation laser à 488 nm et un temps d'acquisition de 100 ms par image. La barre d'échelle représente $10 \mu\text{m}$.

J'ai quantifié la hauteur moyenne globale de la membrane ainsi que la hauteur des contacts proches et distants pour les deux lignées cellulaires sur un ensemble de cellules (19 cellules $\alpha 5+$ et 35 cellules $\alpha 5-$). Les figures 4.12 (A) et (B) montrent la distribution moyenne des hauteurs pour les deux lignées cellulaires. L'allure de ces distributions fait apparaître comme un léger rapprochement de la membrane pour les cellules $\alpha 5+$, décrit par un épaulement plus prononcé au niveau de 75 nm. Cependant, les analyses quantitatives ont montré qu'il n'y a pas de différence entre les deux lignées cellulaires, en termes de hauteurs globales, hauteur des contacts proches ou bien des contacts distants (Figure 4.12 (C)). Donc, l'analyse des hauteurs membrane/substrat ne donnent rien de concluant sur les deux lignées cellulaires. Ce point est très important puisque dans la littérature la majorité des techniques se limitent à l'étude de la hauteur, tels qu'en RICM [67], MIET [96,161] ou en TIRFM conventionnel [99]. Dans notre cas, la hauteur cellule/membrane n'apporte pas d'informations pertinentes. D'où l'intérêt du double seuillage, hauteur et indice, qui permet d'aller plus loin dans les interprétations et d'évaluer d'autres critères, entres autres, le nombre et la taille des contacts proches et distants et même leur énergie d'adhérence.

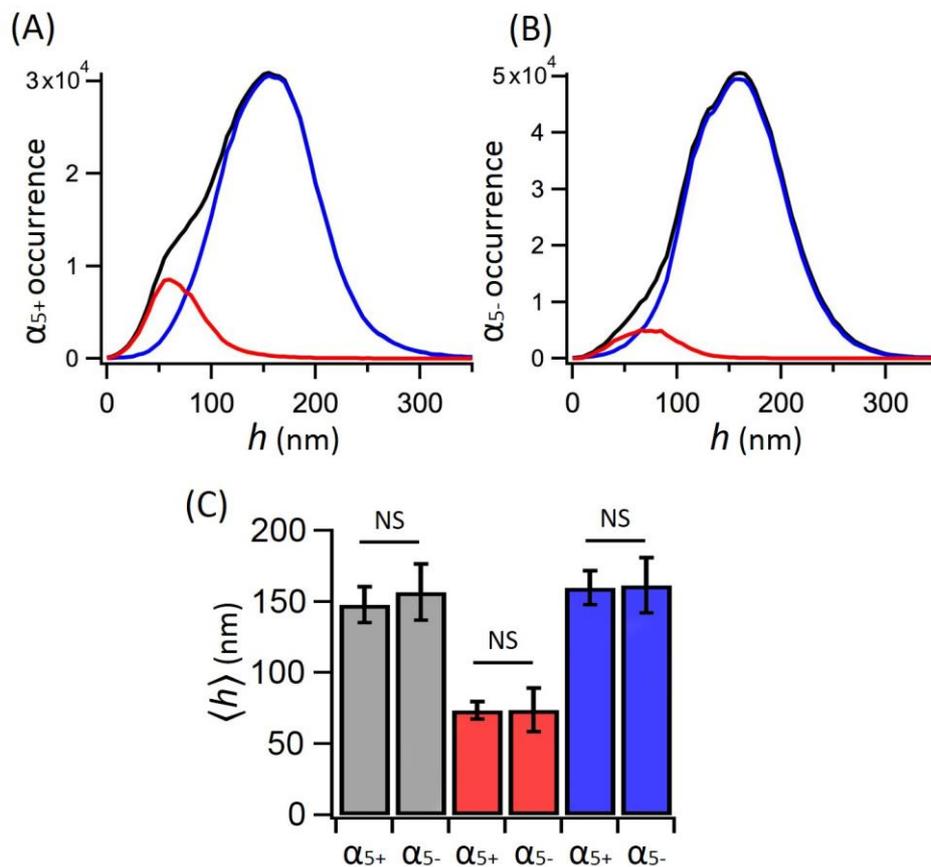


Figure 4.12 : Distribution des distances entre la membrane cellulaire et le substrat pour les deux lignées cellulaires : U-87 MG $\alpha 5+$ (A), U-87 MG $\alpha 5-$ (B). Les tracés noirs, rouges et bleus correspondent respectivement à la distribution de la hauteur globale, celle des contacts proches et celle des contacts distants. (C) Représentation graphique des valeurs moyennes des hauteurs membrane/substrat. Les colonnes grises, rouges et bleues correspondent respectivement à la hauteur moyenne globale, celle des contacts proches et celle des contacts distants. Les barres d'erreur représentent +/- les écart-types calculés pour l'ensemble des mesures. Les tests de Mann-Whitney Wilcoxon nous ont donnés des valeurs respectives de $p = 0.045$, $p = 0.591$ et $p = 0.844$ pour la hauteur moyenne, celle des contacts proches et distants (NS pour non significatif).

J'ai évalué ensuite la surface d'adhérence des deux lignées cellulaires, la surface des contacts proches et distants, ainsi que le nombre et la taille de ces contacts proches. J'ai trouvé que sur la fibronectine, les cellules $\alpha 5+$ occupent une surface d'environ $500 \mu\text{m}^2$, alors que les cellules $\alpha 5-$ occupent une surface d'environ $300 \mu\text{m}^2$ (Figure 4.13 (A)). La barre d'erreur ne correspond pas à une erreur de mesure mais à l'hétérogénéité des valeurs entre cellules. L'aire de contacts proches des cellules $\alpha 5+$ est environ $34 \mu\text{m}^2$ et celle des cellules $\alpha 5-$ environ $8 \mu\text{m}^2$ (Figure 4.13 (B)). En calculant la différence entre l'aire totale et celle des contacts proches, on obtient l'aire des contacts distants représentée sur la figure 4.13 (C). Ces deux figures montrent que la proportion de contacts proches et distants est nettement plus élevée chez les cellules $\alpha 5+$. Cette différence peut avoir deux origines : soit il y a un nombre plus élevé de contacts proches par cellule $\alpha 5+$, soit leur nombre est similaire et ils occupent une surface plus grande. Afin de trouver l'origine de cette différence, j'ai tracé le nombre de contacts proches par cellule et la distribution de leur taille. J'ai trouvé que les cellules $\alpha 5+$ présentent en moyenne trois fois plus de contacts proches par cellule que les cellules $\alpha 5-$ (Figure 4.13 (D)). La barre d'erreur ne correspond pas à une erreur de mesure mais à une dispersion du nombre de contacts par cellule. Concernant la taille des contacts proches, on n'a pas de différence significative entre ces deux lignées. La figure 4.13 (E) montre que la majorité des contacts proches ont une taille comprise entre 0.15 et $1 \mu\text{m}^2$. La taille minimale d'un contact proche est choisie par rapport à un spot limité par diffraction. En conclusion, l'augmentation de la proportion des contacts proches dans les cellules $\alpha 5+$ est due à une augmentation de leur nombre et non pas de leur taille.

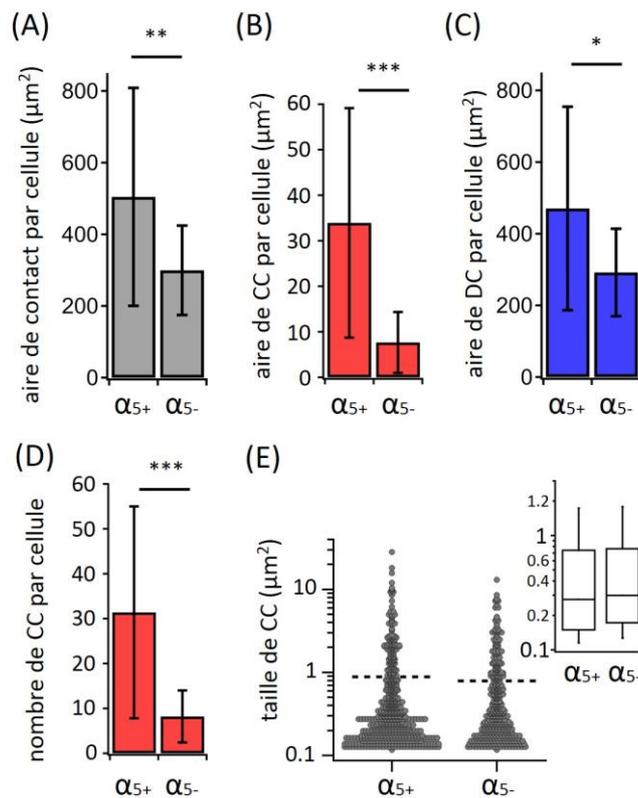


Figure 4.13 : Caractérisation des contacts proches et distants des deux lignées cellulaires $\alpha 5+$ et $\alpha 5-$. Représentation graphique des valeurs moyennes de l'aire de contact par cellule (A), de l'aire des contacts proches (B) et distants (C), du nombre des contacts proches par cellule (D) et de la distribution de taille des contacts proches avec une représentation en boîtes à moustaches en insert (E). Les barres d'erreur représentent +/- les écart-types calculés pour l'ensemble des mesures.

Pour finir, j'ai décidé de comparer les énergies de dissociation D_e des deux lignées (Figure 4.14). J'ai déjà montré qu'il était possible en analysant la distribution des distances membrane/substrat, d'obtenir l'allure de l'énergie potentielle qui régit les interactions cellule/substrat (section 4.3.3). Et ainsi, après un ajustement numérique par une fonction de Morse, on arrive à extraire l'énergie de dissociation définie comme la profondeur du puits de potentiel (Figure 4.10). Cette énergie correspond à une énergie de dissociation moyenne par cellule, calculée à partir de la distribution normalisée des hauteurs. Les figures 4.15 (A), (B) et (C) montrent que l'énergie de dissociation est toujours plus faible dans le cas des cellules $\alpha 5+$, que ce soit pour les contacts proches ou distants. Ces résultats sont conformes aux résultats publiés précédemment [5], où les cellules adhérentes sur la poly-L-lysine ont des énergies plus élevées que celles adhérentes sur la fibronectine : les surfaces recouvertes de poly-L-lysine bloquent la migration par une forte attraction électrostatique entre les groupes amines chargés positivement présents à la surface du verre et le glycocalyx chargé négativement présent sur la membrane cellulaire. Ainsi, les cellules $\alpha 5+$ adhèrent moins d'un point de vue énergétique, ce qui leur permet de migrer un peu plus vite que les cellules $\alpha 5-$ [143]. J'ai mesuré que les cellules $\alpha 5+$ se déplacent en moyenne avec une vitesse de $(7 \pm 6) \mu\text{m/h}$ alors que les cellules $\alpha 5-$ se déplacent à $(4 \pm 5) \mu\text{m/h}$. Le grand écart-type est dû au fait que ces cellules migrent rarement dans une direction choisie mais font plutôt du sur place ou bien des mouvements de va-et-vient.

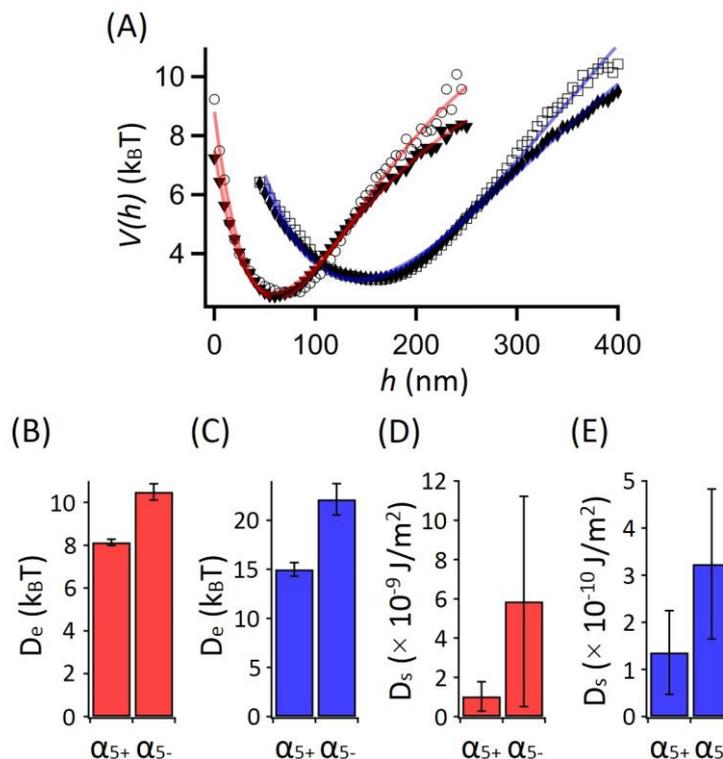


Figure 4.14 : Energie de dissociation (ou énergie d'adhérence) des contacts proches et distants pour les deux lignées $\alpha 5+$ et $\alpha 5-$. (A) Potentiels d'interaction $V(h)$ des contacts proches des cellules $\alpha 5+$ (\blacktriangledown) et $\alpha 5-$ (\circ). Potentiels d'interaction des contacts distants des cellules $\alpha 5+$ (\blacklozenge) et $\alpha 5-$ (\square). Les courbes rouges et bleues correspondent aux ajustements numériques selon l'équation (4.9). Représentation graphique de l'énergie de dissociation D_e des contacts proches (en rouge) (B) et distants (en bleu) (C). Les barres d'erreur représentent les incertitudes obtenues par la méthode des moindres carrés. Représentation graphique de l'énergie surfacique D_s des contacts proches (en rouge) (D) et distants (en bleu) (E). Les barres d'erreur représentent l'erreur de mesure, mais reflètent en réalité l'hétérogénéité des surfaces de contact que l'on a observé (Figure 4.13 (B) et (C)).

Si on rapporte l'énergie de dissociation D_e , à la surface de contact des cellules, on obtient alors une énergie surfacique D_s (en J/m^2) (Figures 4.15 (D) et (E)). Cette énergie D_s tient compte de la surface de contact. Dans ce cas, la différence est plus accentuée entre les deux lignées. La barre d'erreur est grande puisqu'elle est directement liée à la grande variation en taille et en forme de nos cellules. Pour diminuer cette barre il faut travailler plutôt avec des microstructures de fibronectine et faire du « patterning » cellulaire afin d'avoir la même surface d'étalement entre les différentes cellules [162,163]. De façon très intéressante, on trouve une différence d'un ordre de grandeur entre l'énergie surfacique des contacts proches (10^{-9}) et distants (10^{-10}). Ceci montre que les interactions non-spécifiques sont 10 fois moins énergétiques que les interactions spécifiques. Mais vu qu'elles sont beaucoup plus nombreuses, elles présentent *in fine* un poids tout aussi important que les interactions spécifiques.

4.6 Conclusion

Nous nous sommes intéressés à l'étude de l'adhérence cellulaire en distinguant les interactions spécifiques et non-spécifiques. Notre technique va-TIRF nous permet d'extraire avec une résolution nanométrique la topographie de la membrane cellulaire en contact avec le support et la répartition de l'indice effectif. Cette double mesure permet d'identifier les zones d'interactions spécifiques et non-spécifiques. L'analyse des images va-TIRF de cellules fixées, où l'actine et la paxilline ont été marquées, a montré que les contacts proches sont des domaines membranaires contenant les plaques d'adhérence (point focal et cortex d'actine) et d'autres protéines qui participent aux interactions membrane/substrat.

Grace à la microscopie va-TIRF, nous avons pu mettre en évidence le comportement adhésif de deux lignées différentes ($\alpha 5^+$ et $\alpha 5^-$) dont l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ des intégrines est différente. Nous avons étudié séparément leurs interactions spécifiques et non-spécifiques. Nous avons trouvé aucune différence concernant les distances membrane/support entre les deux lignées. La différence réside en réalité dans leur surface de contact. Les cellules $\alpha 5^+$ s'étalent plus que les cellules $\alpha 5^-$. De plus, les cellules $\alpha 5^+$ présentent un plus grand nombre de contacts proches. Cependant ces contacts sont énergétiquement plus faibles que ceux des cellules $\alpha 5^-$. Ainsi au cours de leur migration, les cellules $\alpha 5^+$ créent plus de contacts spécifiques que les cellules $\alpha 5^-$, avec une énergie de liaison plus faible.

En ce qui concerne les énergies d'interaction non-spécifique nous avons trouvé qu'elles sont 10 fois moins énergétiques que celles spécifiques. Cependant en regardant la distribution des hauteurs, les cellules interagissent très peu avec le substrat d'une manière spécifique, la majorité de la membrane est en interaction non-spécifique. D'ailleurs c'est très intéressant de voir que la transfection agit à la fois sur l'adhérence spécifique et non-spécifique. Ainsi, les interactions non spécifiques ont un rôle non négligeable dans l'adhérence et ne doivent pas être oubliées dans l'étude de l'adhérence et de la migration. Par exemple il suffit de regarder le comportement de cellules immunitaires qui ont un comportement de migration amiboïde. Elles ne présentent pas de PFA et peuvent migrer à une vitesse importante [164,165].

5. ETUDE DU RÔLE DE DIFFERENTS ACTEURS DE L'ADHÉRENCE

5.1 Introduction

L'adhérence cellulaire joue un rôle fondamental dans de nombreux processus biologiques, comme la différenciation cellulaire [166], la migration de cellules embryonnaires [167] et le maintien de l'intégrité des tissus [168,169]. Toute modification de l'adhérence et en particulier celle induite par les intégrines, conduit à un certain nombre de dérèglements qu'on rencontre dans les maladies inflammatoires [170] et le cancer [171]. Ainsi, on observe une forte expression des intégrines dans les cancers par rapport aux tissus sains. Ceci peut avoir pour conséquence de favoriser le développement tumoral et la résistance aux thérapies. Les intégrines jouent également un rôle important dans l'angiogenèse tumorale, notamment les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3/\beta 5$ [172], faisant d'elles des cibles de choix pour le développement d'agents thérapeutiques [173–176].

Différentes approches ont été développées pour cibler les intégrines, citons à titre d'exemple l'utilisation d'anticorps monoclonaux [177] ou bien de molécules non-peptidiques qui miment la séquence peptidique RGD des protéines de la matrice extracellulaire [178]. Ces dernières sont capables de bloquer la signalisation intracellulaire induite par l'activation des intégrines lors de la liaison avec la MEC. Leur action est souvent mise en évidence par des mesures d'adhérence et de migration *in vitro* (test de rinçage, test de blessure, etc.). Il est cependant possible d'enregistrer des résultats contradictoires à l'aide des techniques de caractérisation conventionnelle. Ainsi, nous avons choisi d'explorer les données fournies par la microscopie va-TIRF et d'étudier en temps réel, et de façon non-invasive, l'effet d'antagonistes d'intégrines sur l'adhérence de cellules vivantes. Dans cette perspective, nous avons choisi d'étudier la lignée U-87 MG $\alpha 5+$, et de mettre en évidence les propriétés inhibitrices d'antagonistes RGD-like spécifiques soit des intégrines $\alpha 5\beta 1$ (molécule **FR248**), soit des intégrines $\alpha v\beta 3$ (molécule **SN243**) [143]. Ces antagonistes nous ont été fournis par l'équipe de

Monique Dontenwill (Equipe Signalisation tumorale et cibles thérapeutiques – LBP UMR CNRS 7021, Strasbourg).

Le cytosquelette joue également un rôle crucial dans l'adhérence. Il permet à la cellule d'exercer les forces de traction nécessaires à la migration. Pour mettre en évidence l'impact du cytosquelette dans les mesures d'adhérence par va-TIRF, nous avons choisi d'étudier les interactions spécifiques et non-spécifiques entre les cellules et leur support, en présence de différentes drogues qui agissent sur l'actine. Nous avons choisi d'utiliser deux molécules. La première, **Y-27632** (1254, Tocris Bioscience), inhibe ROCK et perturbe ainsi la contractilité du cytosquelette d'acto-myosine [179]. La deuxième, **CK666** (fournie par Hélène Moreau, équipe de dynamique spatio-temporelle des cellules du système immunitaire – INSERM U932, Paris), inhibe l'activation d'Arp2/3 et ainsi réduit le taux de polymérisation du cortex d'actine [180].

Le but de ce chapitre est d'explorer les différentes possibilités offertes par la microscopie va-TIRF et d'étudier de façon non-invasive, d'une part, l'effet des antagonistes d'intégrines et d'autre part, d'agents perturbateurs du cytosquelette d'actine sur l'adhérence de cellules vivantes. Dans cette perspective, nous avons choisi d'étudier la distribution des distances membrane/support, le nombre et la taille des contacts proches ainsi que l'énergie de liaison des interactions spécifiques et non-spécifiques.

5.2 Effet des antagonistes d'intégrines sur l'adhérence

5.2.1 Impacts sur la morphologie

Dans le but d'étudier l'effet des antagonistes d'intégrines, j'ai tout d'abord marqué la membrane des cellules avec la DiO, comme présenté dans le chapitre 4 (section 4.2.3.3). Ensuite, j'ai ajouté les antagonistes à la suspension cellulaire avant de les déposer sur les lamelles de verre fonctionnalisées avec la fibronectine. Les antagonistes sont dilués dans le DMSO. Afin de limiter l'impact du DMSO, j'ai dilué 4 μL d'une solution d'antagonistes à 2.5 mM dans 500 μL de milieu de culture non fluorescent (la concentration finale d'antagonistes est de 20 μM). L'ensemble est monté dans un porte-échantillon et placé dans l'incubateur pendant 1 heure. Pour comparer toutes les données expérimentales, les expériences ont toutes été réalisées de la même manière : les observations va-TIRF ont été faites pendant 1h à 37°C sous microscope.

J'ai tout d'abord évalué la morphologie 2D des cellules U-87 MG $\alpha 5+$ sous l'action des antagonistes d'intégrines. Des exemples d'images obtenues en contraste de phase et en RICM sont données sur la [figure 5.1](#). J'ai trouvé que les cellules exposées à la molécule SN243 présentent une augmentation subtile du nombre de protrusions à la périphérie par rapport aux cellules normales ([Figures 5.1 \(A\) et \(C\)](#)). En revanche, les cellules traitées avec la molécule FR248, bien connue pour bloquer l'activation des intégrines $\alpha 5\beta 1$, deviennent plus ou moins globulaires. Leur surface de contact avec le substrat, bien visible sur les images RICM, est très faible en comparaison avec les cellules traitées avec du DMSO seul. Les [figures 5.1 \(B\) et \(D\)](#)

représentent le même échantillon mais après fixation avec du paraformaldéhyde. Il est intéressant de noter que les cellules fixées s'étalent plus sur la fibronectine et provoque une augmentation artéfactuelle de la surface de contact. Ceci est bien visible sur les cellules traitées avec du FR248 (Figures 5.1 (B) et (D)).

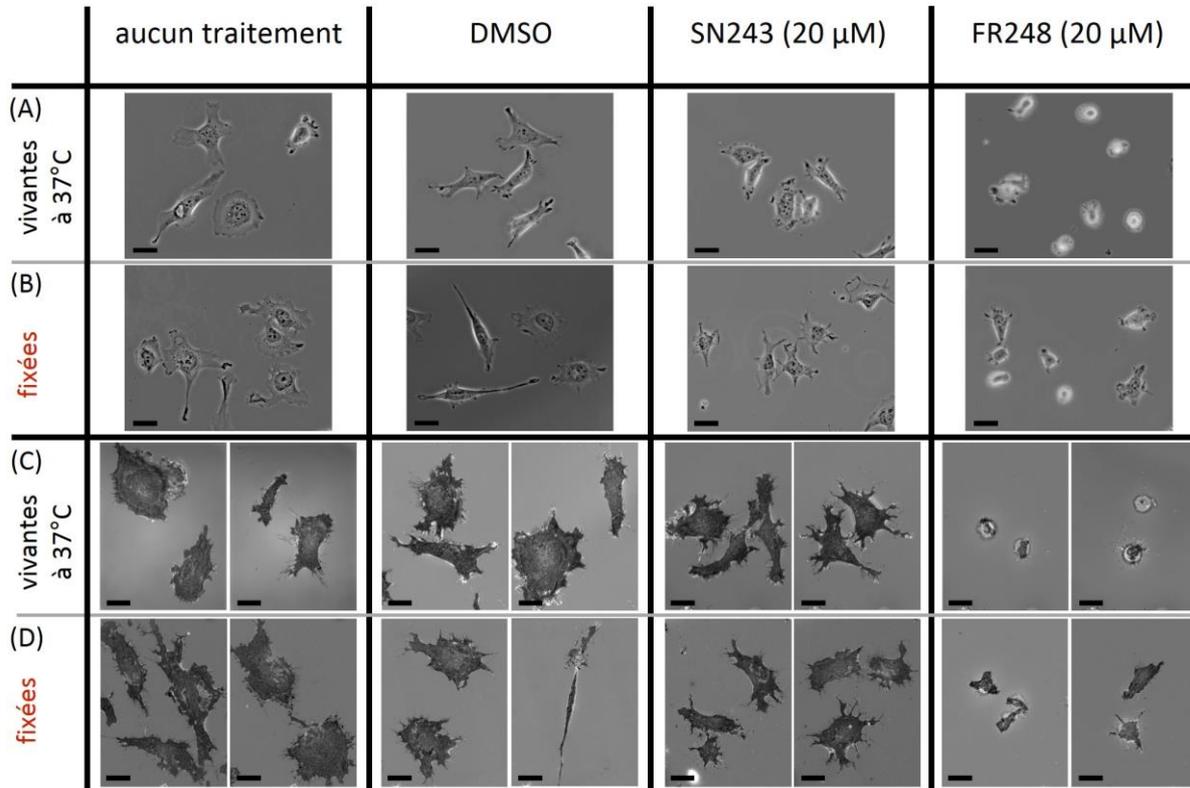


Figure 5.1 : Effet des antagonistes d'intégrines sur la morphologie 2D de cellules U-87 MG α 5+ adhérentes sur une fine couche de fibronectine. Images obtenues en contraste de phase des cellules vivantes à 37°C et 5% de CO₂ (A) et fixées à température ambiante (B), avant et après traitement. Le signal a été collecté à l'aide d'un objectif à sec (Zeiss EC Plan-NEOFLUAR-Phase 2, 20 \times , ON = 0.5). Images RICM de cellules vivantes à 37°C et 5% de CO₂ (C) et fixées à température ambiante (D), avant et après traitement. Le signal a été collecté à l'aide d'un objectif à immersion (Zeiss EC Plan-NEOFLUAR-Antiflex, 63 \times , ON = 1.25) (illumination avec une LED à $\lambda \approx 630$ nm). La barre d'échelle représente 20 μ m. Le DMSO est utilisé comme contrôlé négatif puisque les antagonistes sont solubles dans le DMSO.

La figure 5.2 montre des exemples de traitement en va-TIRF illustrant les effets des antagonistes d'intégrines sur les cellules α 5+. Les images TIRF donnent un aperçu de l'étalement cellulaire (Figure 5.2 (A)). Les cellules traitées avec SN243 présentent des profils migratoires identiques aux cellules contrôles. Ceci est en accord avec les résultats publiés par l'équipe de M. Dontenwill où cette molécule provoque une augmentation de la vitesse de migration des cellules traitées [143]. Au contraire, les cellules traitées avec la molécule FR248 présentent une plus petite surface d'adhérence. Les images topographiques montrent qu'avec FR248 les cellules se rapprochent du substrat (zones bleues foncées sur la figure 5.2(B)) ce qui s'accompagne d'une augmentation de l'indice effectif n_{eff} (Figure 5.2 (C)). Sur ces exemples, les contacts proches ont été déterminés comme les zones ayant une hauteur inférieure à 70 nm et un indice effectif supérieur à 1.39 (Figure 5.2 (D)). J'ai ainsi trouvé que le traitement

augmente la fraction de contacts proches par rapport à l'ensemble de la zone de contact pour les deux antagonistes : $\langle f \rangle_{SN243} = 24\%$ avec $\sigma_{\langle f \rangle_{SN243}} = 7\%$, et $\langle f \rangle_{FR248} = 30\%$ avec $\sigma_{\langle f \rangle_{FR248}} = 13\%$ ($\langle f \rangle_{DMSO} = 5\%$ avec $\sigma_{\langle f \rangle_{DMSO}} = 4\%$).

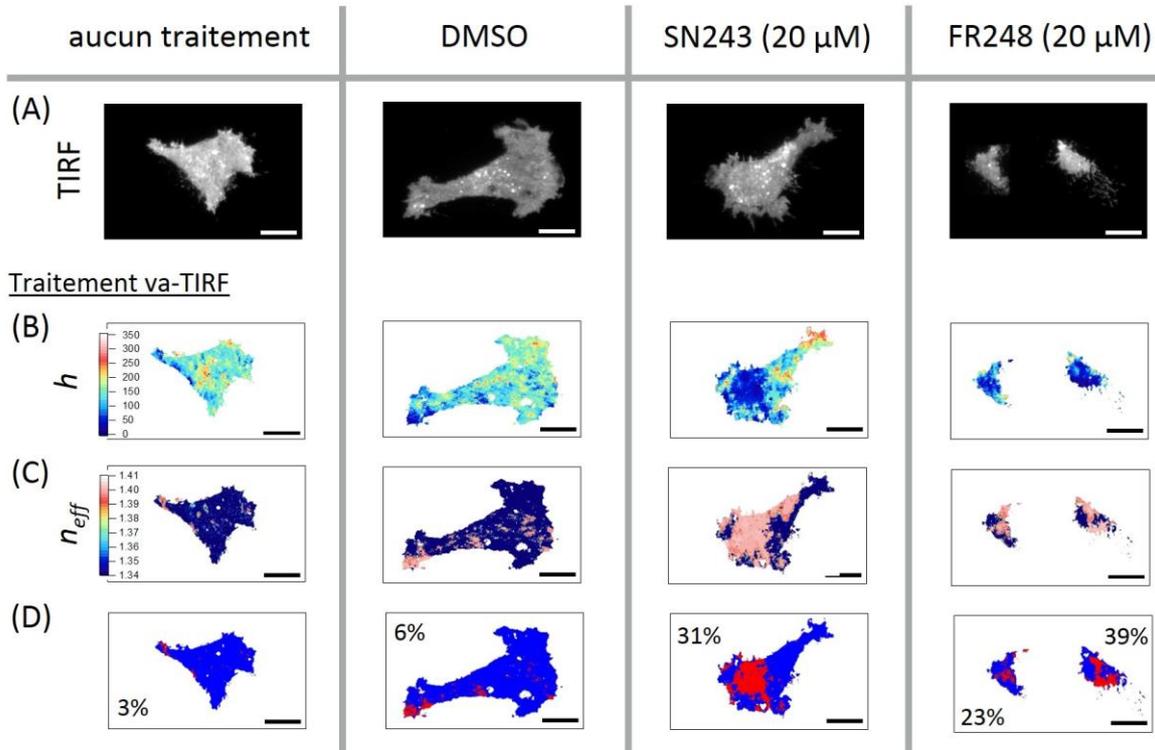


Figure 5.2 : Exemples d'analyse va-TIRF de cellules U-87 MG $\alpha 5+$ adhérentes sur une fine couche de fibronectine à 37°C et traitées avec les antagonistes d'intégrines (marquage de la membrane avec de la DiO). Une des images TIRF (A), topographie de la membrane plasmique (B), variation spatiale de l'indice effectif n_{eff} (C) et localisation des contacts proches qui apparaissent en rouge sur fond bleu (D). La fluorescence a été collectée à l'aide d'un objectif à immersion ($ON = 1.45$; 60 \times) pour une excitation laser à 488 nm et un temps d'acquisition de 100 ms par image. La barre d'échelle représente 10 μm .

5.2.2 Effets sur la hauteur membrane/substrat

Je me suis tout d'abord attachée à quantifier la hauteur moyenne de l'ensemble de la membrane ainsi que la hauteur des contacts proches et distants sur plusieurs cellules (20 à 30 cellules). Les figures 5.3 (A), (B) et (C) montrent les distributions moyennes des hauteurs avant et après traitement avec les deux antagonistes. L'allure de ces distributions montre que les antagonistes induisent un rapprochement de la membrane cellulaire et une augmentation de la fraction des contacts proches. Les analyses quantitatives (Figure 5.3 (D)) montrent que les cellules traitées avec FR248 sont en moyenne plus proches que celles traitées avec SN243. J'ai trouvé que $\langle h \rangle_{FR248} = 93$ nm avec $\sigma_{\langle h \rangle_{FR248}} = 18$ nm, $\langle h \rangle_{SN243} = 110$ nm avec $\sigma_{\langle h \rangle_{SN243}} = 14$ nm et $\langle h \rangle_{DMSO} = 148$ nm avec $\sigma_{\langle h \rangle_{DMSO}} = 11$ nm. Cette diminution de la hauteur moyenne résulte d'une part, de la diminution du poids relatif des contacts non-spécifiques et d'autre part, de la réduction de la distance membrane/substrat au niveau de ces contacts. Ce point est très surprenant car les antagonistes ont été créés pour affaiblir les interactions spécifiques. J'ai comparé les résultats obtenus après l'ajout du DMSO aux cellules non traitées pour vérifier que

le DMSO n'a pas ou peu d'effet sur l'adhérence. La [figure 5.3 \(E\)](#) montre l'évolution de la distribution normalisée des hauteurs avant et après traitement avec les deux antagonistes à différentes concentrations. Avec une faible concentration d'antagonistes (5 μM) on observe un effet transitoire qui impacte surtout les interactions non-spécifiques. Ce résultat corrobore le résultat précédent, à savoir que seuls les contacts distants semblent être affectés par les deux antagonistes.

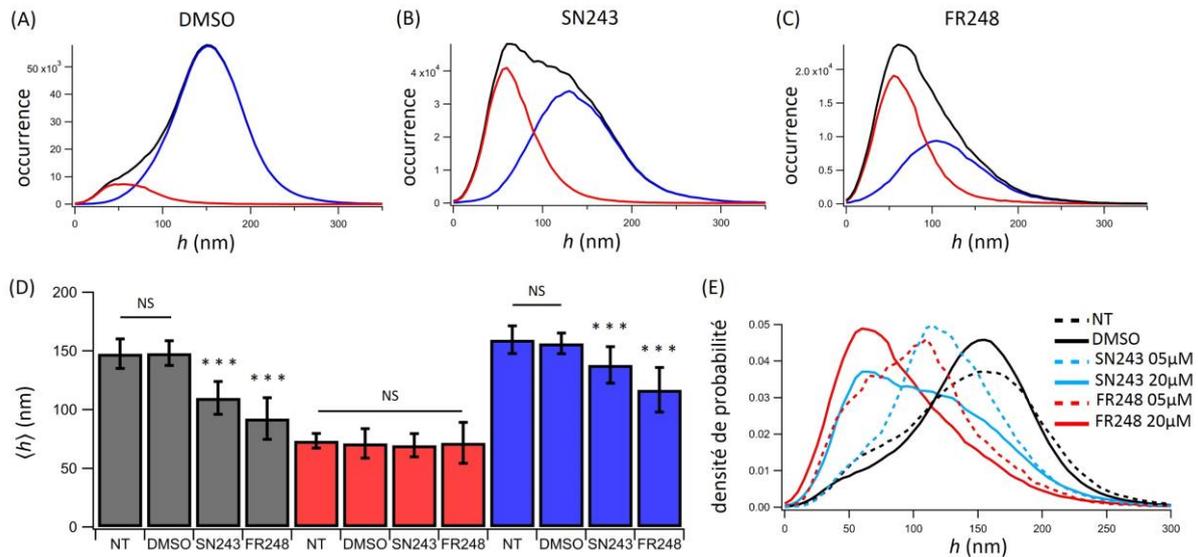


Figure 5.3 : Distribution des distances entre la membrane cellulaire et le substrat pour les différents traitements : cellules traitées avec du DMSO (A), la molécule SN243 (B) et FR248 (C). Les tracés noirs, rouges et bleus correspondent respectivement à la distribution de la hauteur globale, celle des contacts proches et celle des contacts distants. (D) Représentation graphique des valeurs moyennes des hauteurs membrane/substrat. Les colonnes grises, rouges et bleues correspondent respectivement à la hauteur moyenne globale, celle des contacts proches et celle des contacts distants. Les barres d'erreur représentent +/- les écart-types calculés pour l'ensemble des mesures. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Igor Pro, $*10^{-3} \leq p \leq 10^{-2}$, $**10^{-5} \leq p \leq 10^{-4}$ et $***p \leq 10^{-6}$ avec un test de Mann-Whitney Wilcoxon (NS pour non significatif). (E) Représentation graphique des distributions normalisées des distances enregistrées sur un ensemble de cellules adhérentes sur une couche mince de fibronectine en fonction de la concentration des antagonistes.

5.2.3 Effets sur les contacts proches et distants

J'ai ensuite évalué la surface totale d'adhérence des cellules avant et après traitement, les surfaces des contacts proches et distants, ainsi que le nombre et la taille de ces contacts proches. J'ai trouvé que la molécule SN243 n'a pas vraiment d'effet sur la surface totale d'adhérence des cellules, alors que FR248 diminue deux fois cette surface ([Figure 5.4 \(A\)](#)). La barre d'erreur ne correspond pas à une erreur de mesure mais à l'hétérogénéité des valeurs entre cellules. L'aire des contacts proches des cellules traitées avec SN243 est environ $135 \mu\text{m}^2$ et celle des cellules traitées avec FR248 environ $68 \mu\text{m}^2$, alors que celles des cellules exposées juste au DMSO est environ $26 \mu\text{m}^2$ ([Figure 5.4 \(B\)](#)). Cette figure montre que les deux antagonistes ont le même effet : ils augmentent la surface des contacts proches. En calculant la différence entre l'aire totale et celle des contacts proches, on obtient l'aire des contacts distants représentée sur la [figure 5.4 \(C\)](#). Cette figure montre que seul FR248 a un effet sur les contacts distants. L'analyse des aires de contacts montre que la molécule FR248 a une double action : elle

modifie à la fois l'aire des contacts proches et distants. En revanche, SN243 n'agit que sur les interactions spécifiques. J'ai ensuite tracé le nombre de contacts proches par cellule ainsi que la distribution de leur taille. J'ai trouvé que les cellules traitées avec SN243 présentent en moyenne deux fois plus de contacts proches par cellule que les cellules contrôles (Figure 5.4 (D)). Les cellules traitées avec FR248 ne présentent quant à elles pas de différence en terme de nombre de contacts proches. La barre d'erreur ne correspond pas à une erreur de mesure mais à une dispersion du nombre de contacts par cellule. La figure 5.4 (E) montre que les deux antagonistes augmentent de manière significative la taille des contacts proches. La taille minimale d'un contact proche est choisie par rapport à un spot limité par diffraction, comme dans le chapitre précédent. En conclusion, SN243 et FR248 agissent sur les interactions spécifiques en augmentant leur aire, leur nombre (que pour SN243) et leur taille. Pour tenter de comparer les résultats obtenus en va-TIRF avec des méthodes conventionnelles, j'ai marqué la paxilline sur des cellules fixées. Sur les cellules traitées avec la molécule FR248, on observe que le signal de la paxilline est réparti à la périphérie des cellules de façon complètement diffuse (Figure 5.4 (F)). Au contraire, on observe très bien les PFA sur les deux autres images. De façon surprenante, je n'ai pas observé de différences sur les cellules traitées avec SN243 et juste du DMSO. Seul FR248 semble avoir induit une modification sur l'organisation des PFA.

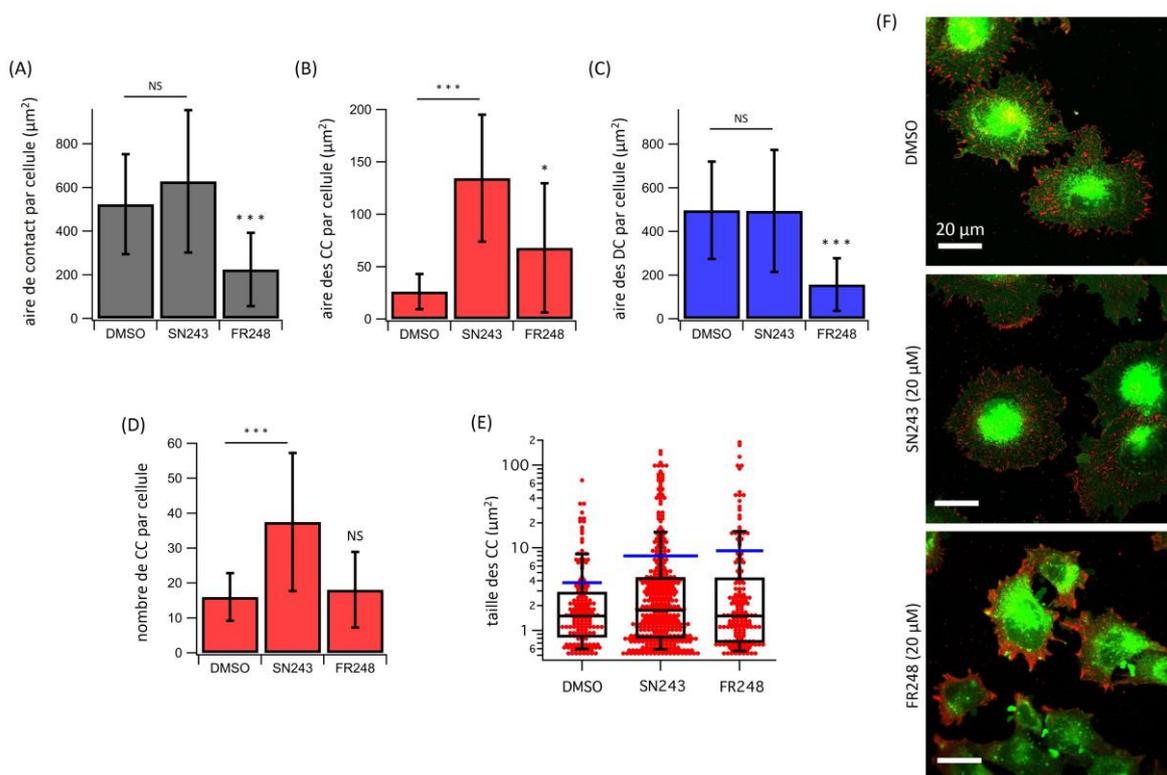


Figure 5.4 : Caractérisation des contacts proches et distants après l'action des antagonistes d'intégrines. Représentation graphique des valeurs moyennes de l'aire de contact par cellule (A), de l'aire des contacts proches (B) et distants (C), du nombre de contacts proches par cellule (D) et de la distribution des tailles des contacts proches en configuration boîtes à moustaches (E). Les traits bleus représentent la moyenne. Les barres d'erreur représentent +/- les écart-types calculés pour l'ensemble des mesures. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Igor Pro, $*10^{-3} \leq p \leq 10^{-2}$, $**10^{-5} \leq p \leq 10^{-4}$ et $***p \leq 10^{-6}$ avec un test de Mann-Whitney Wilcoxon (NS pour non significatif). (F) Images confocales de cellules marquées avec la DiO (en vert), perméabilisées avec une solution de triton X-100 à 0.1% et suivie d'un immunomarquage avec un anticorps dirigé contre la paxilline (en rouge). Elles ont été réalisées avec un objectif à immersion 60 \times monté sur un microscope confocal (Leica TCS SPE II).

5.2.4 Effets sur l'énergie d'adhérence

Pour finir, j'ai déterminé l'évolution de l'énergie libre d'interaction membrane/substrat, obtenue en va-TIRF pour les contacts spécifiques et non-spécifiques, avant et après traitement (Figure 5.5). Les figures 5.5 (A), (B), (C) et (D) montrent que l'énergie d'adhérence est toujours plus faible dans le cas des cellules traitées avec la molécule FR248, que ce soit pour les contacts proches ou distants. Ce résultat conforte les précédents, à savoir que l'antagoniste FR248 agit à la fois sur les interactions spécifiques et non-spécifiques. Ces résultats sont également conformes à ceux publiés par l'équipe de M. Dontenwill où il a été démontré que cette molécule diminue fortement le taux d'adhérence [143]. Les cellules traitées avec la molécule SN243 présentent une diminution de l'énergie uniquement pour les contacts distants. Si on regarde maintenant l'énergie surfacique D_s (en J/m^2) (Figures 5.5 (E) et (F)). Dans ce cas, la différence est plus accentuée pour les cellules traitées avec SN243 par rapport aux cellules contrôles. Leur énergie d'adhérence est plus faible que ce soit pour les contacts proches ou distants. Ce résultat couplé avec le grand nombre de contacts proches (Figure 5.4 (D)) peut expliquer pourquoi ces cellules migrent plus vite [143] (comme dans le cas des cellules $\alpha 5+$ et $\alpha 5-$). La barre d'erreur est grande puisqu'elle est directement liée à la grande variation en taille et en forme de nos cellules. De façon très intéressante, on trouve que les cellules traitées avec FR248 présentent une énergie surfacique plus faible au niveau des contacts proches, ce qui n'est pas le cas des contacts distants.

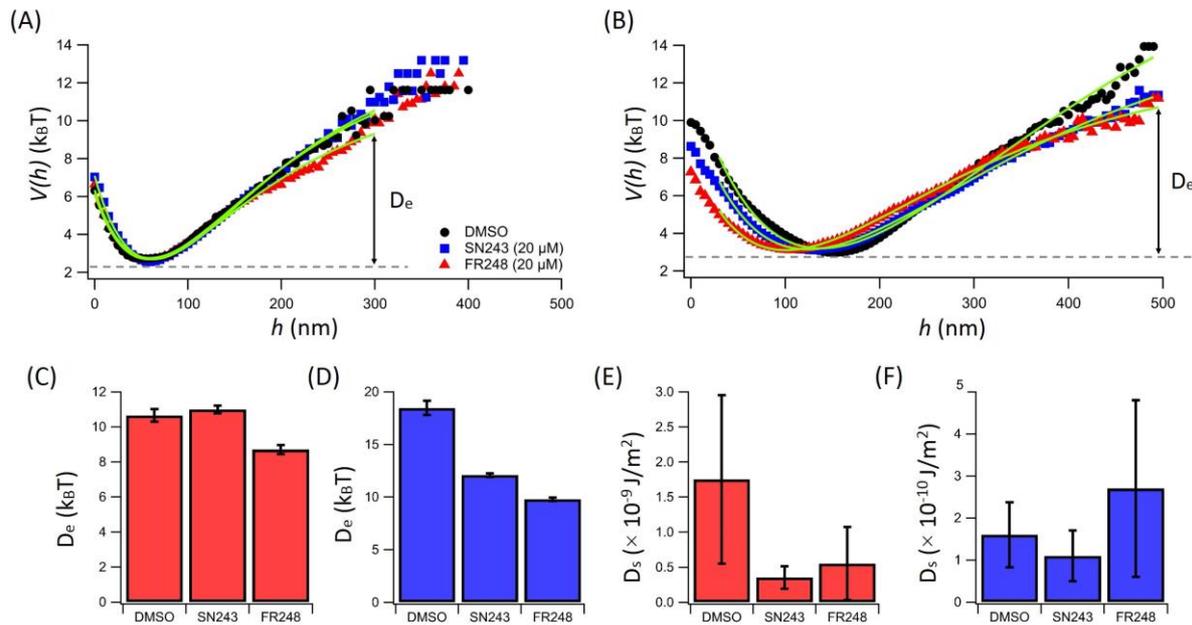


Figure 5.5 : Energie de dissociation (ou énergie d'adhérence) des contacts proches et distants pour les cellules U-87 MG $\alpha 5+$ avant et après traitement. Potentiels d'interaction $V(h)$ des contacts proches (A) et distants (B) des cellules traitées avec DMSO (●) SN243 (■) et FR248 (▲). Les courbes vertes correspondent aux ajustements numériques selon l'équation (4.9). Représentation graphique de l'énergie de dissociation D_e des contacts proches (en rouge) (C) et distants (en bleu) (D). Les barres d'erreur représentent les incertitudes obtenues par la méthode des moindres carrés. Représentation graphique de l'énergie surfacique D_s des contacts proches (en rouge) (E) et distants (en bleu) (F). Les barres d'erreur représentent l'erreur de mesure, mais reflètent en réalité l'hétérogénéité des surfaces de contact que l'on a observé (Figures 5.4 (B) et (C)).

5.2.5 Discussion et conclusion

Nous nous sommes intéressés au rôle des intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ dans le processus d'adhérence des cellules issues d'un glioblastome. J'ai étudié l'impact de l'inhibition fonctionnelle de ces intégrines par des antagonistes RGD-like en va-TIRF. L'analyse des images va-TIRF de cellules vivantes avant et après traitement a montré que les deux antagonistes développés d'un point de vue biochimique pour agir uniquement sur les contacts proches, ont également un effet notable sur les contacts distants. Les effets opposés des deux antagonistes dans certains cas impliquent que les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ ont des rôles différents dans l'adhérence et la migration des cellules U-87 MG $\alpha 5+$. L'analyse des différents paramètres est résumée dans le [tableau 5.1](#).

Tableau 5.1 : Récapitulatif des effets des antagonistes d'intégrines par rapport aux cellules non traitées.

Antagonistes	Contacts proches (CC)	Contacts distants (DC)
SN243	<ul style="list-style-type: none"> - l'aire des CC augmente alors que la surface totale de contact ne varie pas. - le nombre et la taille des CC sont plus importants. - leur énergie d'adhérence surfacique est plus faible. 	<ul style="list-style-type: none"> - l'aire des DC ne varie pas. - leur énergie d'adhérence surfacique est plus faible.
FR248	<ul style="list-style-type: none"> - l'aire des CC augmente tandis que la surface totale de contact diminue. - le taille des CC est plus importante mais leur nombre ne change pas. - leur énergie d'adhérence surfacique est plus faible 	<ul style="list-style-type: none"> - l'aire des DC diminue. - leur énergie d'adhérence surfacique est plus élevée.

Comme les cellules non traitées, les cellules traitées avec la molécule SN243 présentent toujours un aspect pro-migratoire. Le [tableau 5.1](#) résume les modifications induites par SN243 sur les contacts proches. Ces résultats permettent de comprendre pourquoi les cellules exposées à la molécule SN243 migrent plus vite que les cellules contrôles (par analogie avec ce que l'on a observé entre les cellules $\alpha 5+$ et $\alpha 5-$) : elles possèdent plus de contacts proches, d'énergie surfacique faible. A l'opposé cet antagoniste ne modifie pas de façon notable les interactions non-spécifiques, sauf au niveau des énergies d'interactions. Dans le cas des cellules traitées avec la molécule FR248, on observe un effet global à la fois sur les interactions spécifiques et non-spécifiques qui explique peut-être l'aspect globulaire des cellules. Les résultats résumés

dans le [tableau 5.1](#) montrent que sous l'action de FR248, même si la surface d'étalement diminue, les domaines membranaires contenant les plaques d'adhérence sont plus grands et énergétiquement faibles. De plus, il semblerait que FR248 peut déclencher une voie de signalisation qui aura un effet sur les interactions non-spécifiques, qui pourrait, par exemple, altérer la composition du glycocalyx.

Lorsqu'on traite les cellules avec SN243, l'adhérence spécifique est médiée par les interactions intégrines $\alpha5\beta1$ -fibronectine, alors que lorsqu'on traite les cellules avec la molécule FR248, l'adhérence spécifique est contrôlée par les interactions intégrines $\alpha\beta3$ -fibronectine. Bien que les énergies de liaison de ces deux intégrines avec la fibronectine soient du même ordre de grandeur ($\approx 5 \times 10^{-10}$ J/m²), il est clair que ces deux reconnaissances déclenchent des voies de signalisation très différentes. SN243 modifie la migration des cellules individuelles en déclenchant une voie de signalisation qui aura un effet très marqué sur les interactions spécifiques. A l'opposé, sous l'action de FR248, les cellules en adhérence par l'intermédiaire de la reconnaissance intégrines $\alpha\beta3$ -fibronectine, ne présentent pas de comportement migratoire, bien au contraire, leur énergie d'adhérence moyenne étant faible ([Figures 5.5 \(C\) et \(D\)](#)), il sera aisé de les décoller de la surface en appliquant une faible force de cisaillement à l'aide d'une micropipette.

Concernant les contacts distants, l'analyse des potentiels d'interaction met en évidence un déplacement de la position d'équilibre (h_{eq}) des interactions ([Figures 5.5 \(B\)](#)). Pour mieux comprendre ce phénomène, j'ai comparé l'allure de ces énergies potentielles par rapport à un profil simulé ([Figure 5.6 \(A\)](#)) qui fait intervenir deux types d'interactions différentes : une attraction de van der Waals et une répulsion stérique. Cette simulation montre qu'en l'absence de force externe, l'énergie de dissociation D_e change avec la position d'équilibre h_{eq} : D_e augmente lorsque h_{eq} diminue ([Figure 5.6 \(A\)](#)). On observe un comportement différent sur la [figure 5.5 \(B\)](#) qui nous permet de supposer d'une part, que la variation de la position d'équilibre est liée à une modification de la composition de la membrane, d'autre part, que la diminution de D_e lorsqu'on fait agir SN243 puis FR248 est liée à l'apparition d'une force extérieure de traction de plus en plus importante [181,182]. La [figure 5.6 \(B\)](#) montre en effet que le travail d'une force extérieure de traction ($-F \times h$) abaisse de façon apparente l'énergie de dissociation. Concernant la position d'équilibre h_{eq} , elle peut changer si la composition de la membrane est modifiée, en particulier l'épaisseur de la couche de glycocalyx [183]. Un effet similaire est visible au niveau des contacts proches ([Figure 5.5 \(A\)](#)) : FR248 diminue l'énergie de liaison sans modifier la position d'équilibre h_{eq} . Autrement dit, on peut supposer qu'il existe là encore une force supplémentaire extérieure qui apparaît sous l'action de la molécule FR248. Ces diminutions de l'énergie d'adhérence D_e par une force extérieure de traction est probablement médiée par le cytosquelette d'actine de la cellule. Sachant que les contacts distants sont plus impactés par l'effet des deux antagonistes (modification de la composition membranaire et force extérieure de traction), on peut raisonnablement imaginer que ces deux antagonistes peuvent déclencher une voie de signalisation réservée aux interactions non-spécifiques en modulant par exemple, le cytosquelette d'actine.

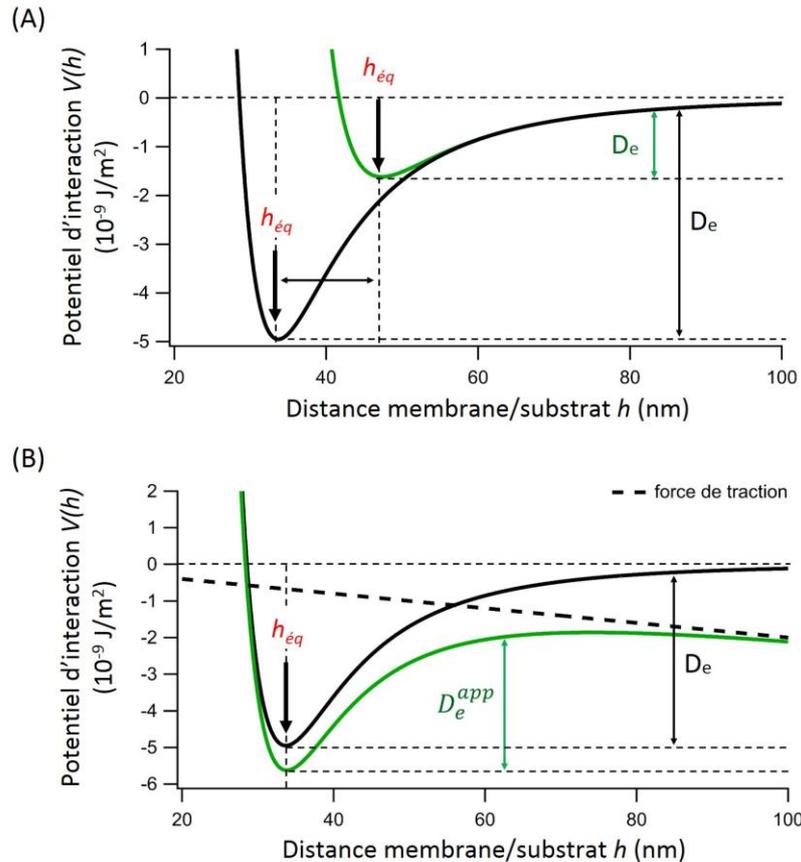


Figure 5.6 : Variation du potentiel d'interaction cellule/substrat en fonction de la distance qui sépare une membrane d'une surface en verre. (A) Représentation schématique de l'énergie libre d'interaction calculée à 37°C (tracé noir). La répulsion stérique a été évaluée en considérant la présence de polymères en forme de « champignon » à la surface de la cellule, l'attraction de van der Waals en considérant une bicouche lipidique de 10 nm d'épaisseur dans l'eau. (B) Modification du profil de $V(h)$ par le travail d'une force extérieure de traction. L'énergie de dissociation apparente D_e^{app} est inférieure à D_e .

Les résultats obtenus en va-TIRF ont démontré l'importance de sonder simultanément les interactions spécifiques et non-spécifiques. Sous l'action des deux antagonistes, j'ai pu mesurer les énergies de liaison des intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ avec la fibronectine. J'ai trouvé que la liaison $\alpha 5\beta 1$ -fibronectine (3.5×10^{-10} J/m²) est légèrement moins énergétique que $\alpha v\beta 3$ -fibronectine (5.5×10^{-10} J/m²), ce qui peut expliquer leur rôle différent au niveau des PFA. $\alpha v\beta 3$ participe à l'initiation des PFA alors que $\alpha 5\beta 1$ joue plutôt un rôle dans leur maturation [22]. Il est difficile de comparer ces valeurs avec des données de la littérature parce qu'à ma connaissance toutes les mesures de force d'adhérence se font en appliquant une force extérieure, par exemple dans le cas de mesures avec des pinces magnétiques [184], qui peut perturber le système. Le point intéressant et surprenant est d'observer les effets des antagonistes sur les interactions non-spécifiques. J'ai d'ailleurs eu l'occasion d'observer la migration de cellules U-87 MG $\alpha 5+$ à la surface de lamelles recouvertes de PLL-g-PEG (poly-L-lysine grafted-Polyethylene glycol). Les PEG forment une structure type « brosse » très dense, produisant une répulsion stérique très forte qui inhibe l'étalement des cellules, mais pas leur capacité à se déplacer. Les cellules U-87 MG $\alpha 5+$ ont donc différents mécanismes d'adhérence et de migration, et semblent pouvoir s'adapter quel que soit le type d'inhibition intégrines-fibronectine.

5.3 Effet des inhibiteurs d'Arp2/3 et des ROCK sur l'adhérence

Les résultats présentés dans cette section sont préliminaires et donnent une idée de l'impact du cytosquelette ainsi que l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques d'Arp2/3 et des ROCK sur l'adhérence des cellules U-87 MG $\alpha 5+$ sur une couche de fibronectine.

5.3.1 Impacts sur la morphologie

Dans le but d'étudier l'effet de différentes drogues qui agissent sur l'actine, j'ai tout d'abord marqué la membrane des cellules avec la DiO, comme présenté dans le chapitre 4 (section 4.2.3.3). J'ai ensuite ajouté les drogues à la suspension cellulaire avant de déposer les cellules sur des lamelles de verre fonctionnalisées. Les molécules CK666 et Y27632 sont respectivement diluées dans le DMSO et l'eau. Afin de limiter l'impact du DMSO, j'ai dilué 4 μ L d'une solution de CK666 à 6.25 mM dans 500 μ L de milieu de culture non fluorescent (la concentration finale des molécules est de 50 μ M). Pour la molécule Y2763, l'effet du solvant est moins perturbatif car il s'agit de l'eau. Le protocole de dilution de cette deuxième molécule est néanmoins le même que la première, à savoir 4 μ L d'une solution initiale à 6.25 mM ajouté à 500 μ L de milieu de culture. L'ensemble est monté dans un porte-échantillon et placé dans l'incubateur pendant 1 heure. Pour comparer toutes les données expérimentales, les expériences ont toutes été réalisées de la même manière : les observations va-TIRF ont été faites pendant 1h à 37°C sous microscope.

J'ai tout d'abord évalué la morphologie 2D des cellules U-87 MG $\alpha 5+$ sous l'action de CK666 et Y27632. Des exemples d'images obtenues en contraste de phase (Figure 5.7 (A)) et en TIRFM (Figure 5.7 (B)) sont présentés ci-dessous. Pour visualiser le cytosquelette d'actine, les images en TIRFM ont été réalisées sur des cellules fixées où l'actine est marquée à l'aide de la phalloïdine. J'ai trouvé que les cellules exposées à la molécule CK666 présentent beaucoup de protrusions à la périphérie cellulaire (filopodes) par rapport aux cellules normales. Elles présentent des formes étoilées. Ce résultat est conforme à ce que l'on trouve dans la littérature, à savoir que l'inhibition d'Arp2/3 entraîne la perte du réseau d'actine ramifié dans le cortex cellulaire, empêchant la formation des lamellipodes. A la place, on voit apparaître de longs filopodes générés par les formines ou les Ena/VASP [185,186]. En revanche, les cellules traitées avec la molécule Y27632, bien connue pour inhiber les Rho-kinases (ROCK), deviennent plutôt fusiformes avec la formation de pseudopodes. Les images de la phalloïdine montrent que Y27632 inhibe la formation des fibres de stress dans les cellules traitées par rapport aux cellules contrôles. En revanche l'organisation périphérique de l'actine n'est pas affectée. Mes observations sont conformes avec ce qui est attendu pour ce composé qui agit sur la contractilité du cytosquelette d'acto-myosine, empêchant ainsi la formation de fibres de stress [187].

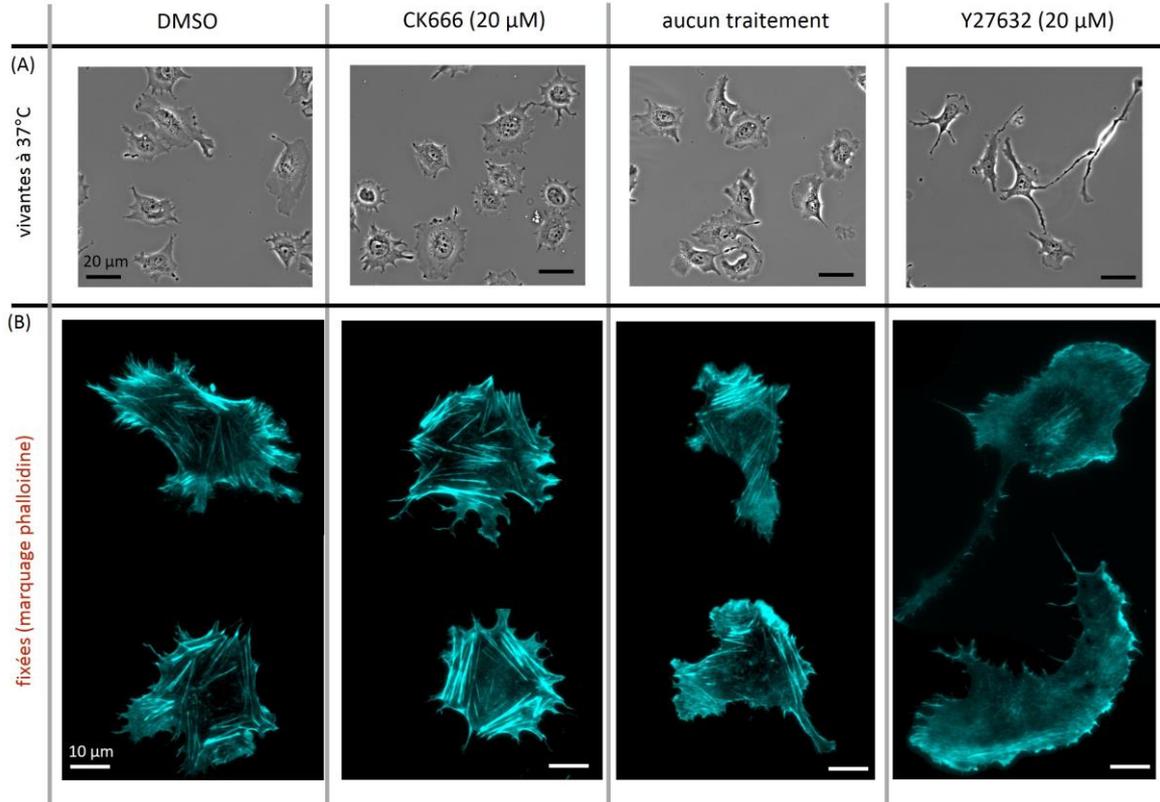


Figure 5.7 : Effet des perturbateurs d'actine sur la morphologie 2D de cellules U-87 MG α 5+ adhérentes sur une fine couche de fibronectine. (A) : Images obtenues en contraste de phase des cellules vivantes à 37°C et 5% de CO₂, avant et après traitement. Le signal a été collecté à l'aide d'un objectif à sec (Zeiss EC Plan-NEOFLUAR- Phase 2, 20 \times , ON = 0.5). La barre d'échelle correspond à 20 μ m. (B) : Images TIRF de cellules fixées à température ambiante, où l'actine est marquée avec la phalloïdine. Illumination TIRF à l'aide d'un laser à 561 nm et d'un objectif de grandissement 54.8 \times , d'ouverture numérique 1.49. La barre d'échelle correspond à 10 μ m.

5.3.2 Effets sur la hauteur membrane/substrat

Je me suis tout d'abord intéressée à quantifier la hauteur moyenne de l'ensemble de la membrane ainsi que la hauteur des contacts proches et distants sur plusieurs cellules (35 à 45 cellules différentes), comme dans le cas des cellules traitées avec les antagonistes d'intégrines. Les figures 5.8 (A), (B), (C) et (D) montrent la distribution moyenne des hauteurs avant et après traitement avec les deux composés chimiques. L'allure de ces distributions ainsi que les analyses quantitatives des hauteurs (Figure 5.8 (E)) ne varient pas de manière significative après les différents traitements. Toutefois, on peut distinguer une petite variation pour les cellules traitées avec la molécule CK666. Ces dernières semblent s'éloigner de la surface au niveau des contacts proches et distants. Cette variation est très subtile et doit être confirmée par des expériences supplémentaires.

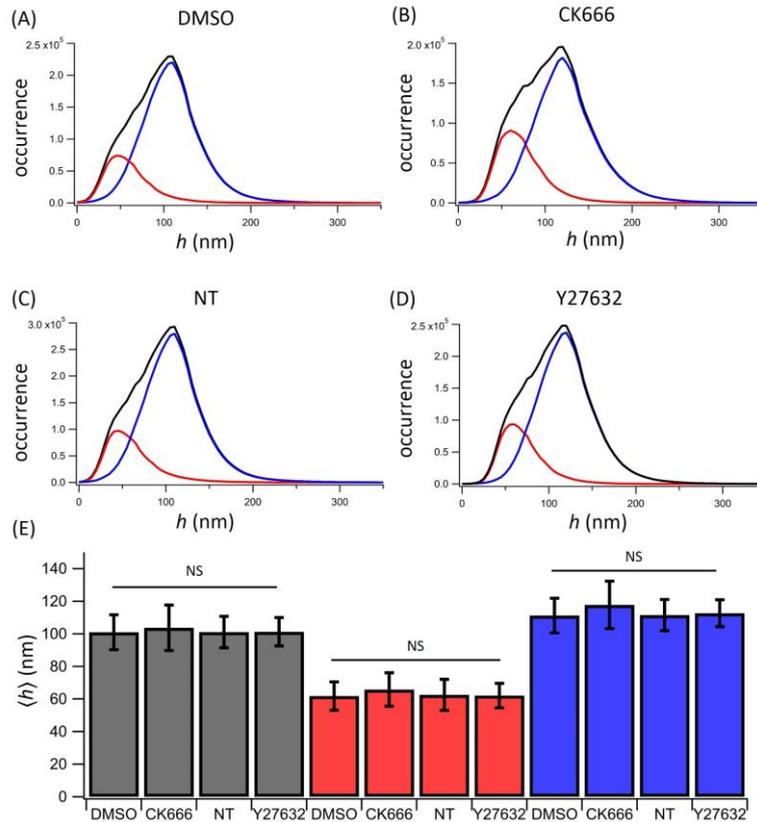


Figure 5.8 : Distribution des distances entre la membrane cellulaire et le substrat pour les différents traitements : cellules traitées avec du DMSO (A) et la molécule CK666 (B), cellules non traitées (C), ou bien traitées avec le composé Y27632 (D). Les tracés noirs, rouges et bleus correspondent respectivement à la distribution de la hauteur globale, celle des contacts proches et celle des contacts distants. (E) : représentation graphique des valeurs moyennes des hauteurs membrane/substrat. Les colonnes grises, rouges et bleues correspondent respectivement à la hauteur moyenne globale, celle des contacts proches et celle des contacts distants. Les barres d'erreur représentent +/- les écart-types calculés pour l'ensemble des mesures. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Igor Pro, $*10^{-3} \leq p \leq 10^{-2}$, $**10^{-5} \leq p \leq 10^{-4}$ et $***p \leq 10^{-6}$ avec un test de Mann-Whitney Wilcoxon (NS pour non significatif).

5.3.3 Effets sur les contacts proches et distants

Ensuite, j'ai évalué la surface totale d'adhérence des cellules avant et après traitement, les surfaces des contacts proches et distants, ainsi que le nombre et la taille de ces contacts proches. J'ai trouvé que Y27632 n'a pas d'effet sur la surface totale d'adhérence des cellules, alors que CK666 diminue significativement la surface totale d'adhérence (Figure 5.9 (A)). La barre d'erreur ne correspond pas à une erreur de mesure mais à l'hétérogénéité des valeurs entre cellules. Les Figures 5.9 (B) et (C) montrent que les deux molécules ont des effets distincts. Y27632 augmente légèrement l'aire des contacts proches, alors que CK666 diminue l'aire des contacts distants. Ces résultats montrent que CK666 a plutôt un effet sur les contacts distants alors que Y27632 agit plutôt sur les contacts proches. Par la suite, j'ai tracé le nombre de contacts proches par cellule ainsi que la distribution de leur taille. J'ai trouvé que les cellules traitées avec CK666 présentent en moyenne 25% de contacts proches par cellule en moins que les cellules contrôles (Figure 5.4 (D)). Les cellules traitées avec Y27632 ne présentent pas une différence significative en terme de nombre de contacts proches, toutefois on observe une

certainne tendance à la diminution de leur nombre. La barre d'erreur ne correspond pas à une erreur de mesure mais à une dispersion du nombre de contacts par cellule. La [figure 5.9 \(E\)](#) montre que la distribution des tailles est très hétérogène, mais en moyenne les deux antagonistes augmentent légèrement la taille des contacts proches. En conclusion, CK666 agit sur les interactions spécifiques et non-spécifiques en diminuant le nombre de contacts proches et l'aire des contacts distants. La molécule Y27632 agit plutôt sur les interactions spécifiques en augmentant l'aire et la taille des contacts proches.

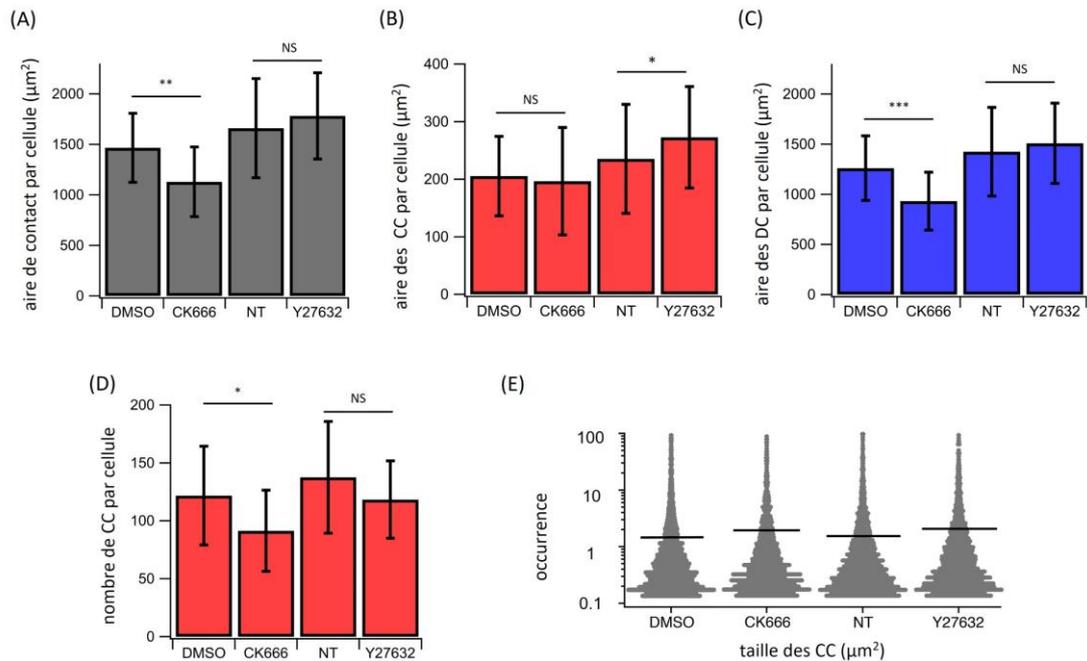


Figure 5.9 : Caractérisation des contacts proches et distants sous l'action des molécules inhibitrices de l'actine. Représentation graphique des valeurs moyennes de l'aire de contact totale par cellule (A), de l'aire des contacts proches (B) et distants (C), du nombre de contacts proches par cellule (D) et de la distribution de taille des contacts proches (E). Les traits noirs représentent la moyenne. Les barres d'erreur représentent +/- les écart-types calculés pour l'ensemble des mesures. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Igor Pro, $*10^{-3} \leq p \leq 10^{-2}$, $**10^{-5} \leq p \leq 10^{-4}$ et $***p \leq 10^{-6}$ avec un test de Mann-Whitney Wilcoxon (NS pour non significatif).

5.3.4 Effets sur l'énergie d'adhérence

Pour finir, j'ai représenté la variation de l'énergie d'interaction membrane/substrat pour les contacts spécifiques et non-spécifiques des cellules avant et après traitement ([Figure 5.10](#)). Les [figures 5.10 \(A\), \(B\), \(C\) et \(D\)](#) montrent que l'énergie moyenne d'adhérence augmente dans le cas des cellules traitées avec Y27632, que ce soit pour les contacts proches ou distants. Ainsi, cette molécule agit à la fois sur les énergies d'interactions spécifiques et non-spécifiques. En revanche, les cellules traitées avec la molécule CK666 présentent uniquement une légère diminution de l'énergie des contacts distants par rapport aux cellules contrôles. Si on regarde l'énergie surfacique D_s (en J/m²) ([Figures 5.10 \(E\) et \(F\)](#)) : seule l'énergie de liaison de contacts non-spécifiques pour les cellules traitées avec CK666 est modifiée.

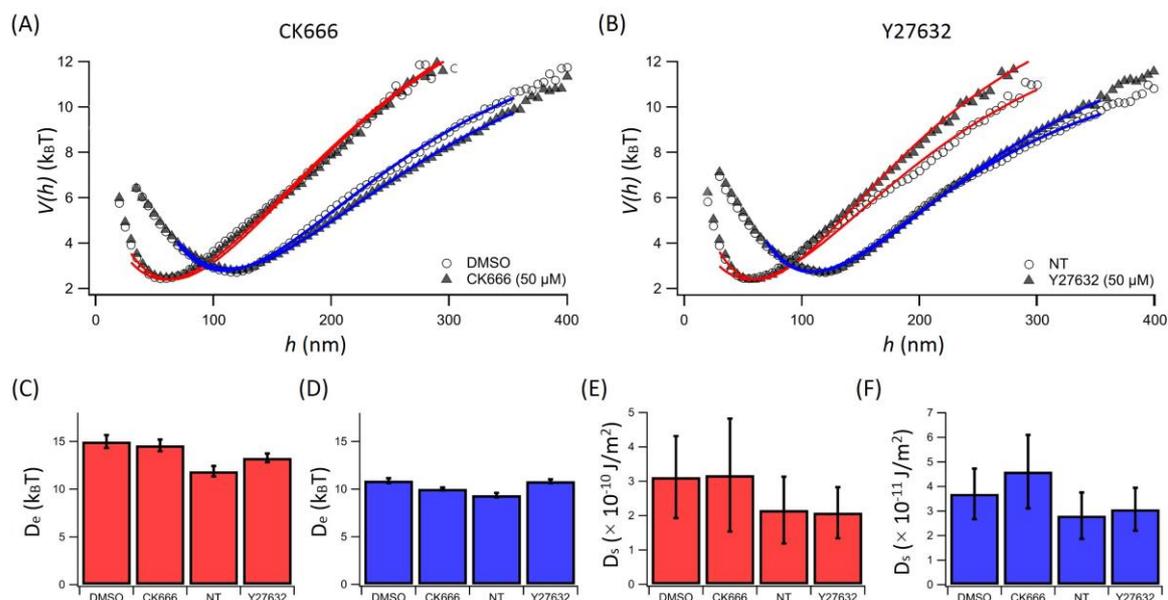


Figure 5.10 : Energie d'adhérence des contacts proches et distants avant et après traitement aux inhibiteurs d'actine. (A) : Potentiels d'interaction $V(h)$ des contacts proches (en rouge) et distants (en bleu) des cellules traitées avec DMSO (\circ) et CK666 (\blacktriangle). (B) : Potentiels d'interaction $V(h)$ des contacts proches (en rouge) et distants (en bleu) des cellules non traitées (\circ) et traitées avec Y27632 (\blacktriangle). Les courbes rouges et bleues correspondent aux ajustements numériques selon l'équation (4.9). Représentation graphique de l'énergie de dissociation D_e des contacts proches (en rouge) (C) et distants (en bleu) (D). Les barres d'erreur représentent les incertitudes obtenues par la méthode des moindres carrés. Représentation graphique de l'énergie surfacique D_s des contacts proches (en rouge) (E) et distants (en bleu) (F). Les barres d'erreur représentent l'erreur de mesure, mais reflètent en réalité l'hétérogénéité des surfaces de contact que l'on a observé (Figures 5.9 (B) et (C)).

5.3.5 Discussion et conclusion

Il est important de noter l'aspect préliminaire de ces expériences. En effet, les énergies surfaciques D_s calculées sur les figures 5.10 (E) et (F) sont un ordre de grandeur plus faible que celles calculées précédemment. Cet écart est lié aux grandes surfaces d'étalement de nos cellules U-87 MG $\alpha 5+$ sur la fibronectine (Figure 5.9 (A)), bien plus importantes que ce que l'on a pu mesurer au préalable. Ce changement d'état d'adhérence des cellules semble être vraisemblablement lié à notre solution de fibronectine qui se serait dégradée, pour une raison qui nous échappe encore. Malgré tout je pense que ces résultats préliminaires peuvent nous éclairer quant à l'origine de la force extérieure évoquée dans la section précédente et son lien au cytosquelette.

Nous nous sommes intéressés au rôle du cytosquelette d'actine dans le processus d'adhérence des cellules U-87 MG $\alpha 5+$. L'analyse des images va-TIRF de cellules vivantes avant et après traitement a montré que les deux molécules agissent de façon différente surtout au niveau de l'énergie de dissociation D_e . La molécule CK666 agit plutôt sur les interactions non-spécifiques en les diminuant, à l'opposé, la molécule Y27632 augmente l'énergie d'adhérence que ce soit pour les contacts proches ou distants. Il est important de noter que ces modifications des valeurs d'énergie ne s'accompagnent pas d'un changement de la position

d'équilibre h_{eq} , ce qui prouverait qu'il n'y a pas de modifications de la composition membranaire, mais plutôt l'apparition d'une force extérieure qui dans ce cas peut être de traction ou de contraction.

En effet, les résultats obtenus ont montré un effet opposé entre les deux molécules. La diminution de l'énergie moyenne liée aux interactions non-spécifiques, sous l'action de CK666 (Figure 5.10 (A)) peut être expliquée par la disparition plus ou moins complète de la force qui résulte de l'action du cortex d'actine, en faveur de celle générée par les fibres de stress (Figure 5.7 (B)). Ces dernières génèrent une force de traction plus importante (Figure 5.6 (B)) dont le travail va diminuer l'énergie de dissociation. A l'opposé, l'augmentation des énergies de dissociation spécifiques et non-spécifiques sous l'action de la molécule Y27632 (Figure 5.10 (B)) peut être due à la disparition des forces de traction des fibres de stress (comme déjà observé dans la référence[188]), dont la résultante serait une force de contraction du cortex d'actine qui aurait pour effet de produire un travail positif ($+F \times h$). L'absence d'effet de CK666 sur les contacts proches tend à renforcer l'idée qu'au niveau des PFA la résultante des forces extérieures dépend plutôt des fibres de stress d'actine et non pas de l'activation d'Arp2/3.

Ces résultats comparés à ceux obtenus sous l'action des antagonistes (Figure 5.5), montrent bien que la variation de De est induite par le travail d'une force de traction produite par le cytosquelette d'actine. La diminution plus ou moins importante de l'énergie d'adhérence peut être due à une modification de l'amplitude de cette force. Ainsi, les antagonistes d'intégrines déclenchent une voie de signalisation qui va également moduler le cytosquelette d'actine. Cette voie de signalisation semble agir plutôt sur une force de traction du cytosquelette, ce qui suppose au regard de ce que l'on vient de mettre en évidence avec les molécules Y27632 et CK666, que les antagonistes n'ont pas d'impact sur les fibres de stress, mais sur le cortex d'actine. Bien évidemment, ce résultat doit être confirmé par des expériences supplémentaires, comme en étudiant l'action d'autres molécule qui modifient l'organisation du cytosquelette, comme par exemple, la blebbistatine qui est un inhibiteur pharmacologique des isoformes IIa et IIb de la myosine ou bien la colchicine qui déstabilise les microtubules.

CONCLUSION

Mon projet de thèse consistait à développer un dispositif de nanoscopie de fluorescence va-TIRFM à deux longueurs d'onde, dans le but d'étudier de façon quantitative et non-invasive l'adhérence de cellules individuelles. Dans la perspective de montrer l'intérêt d'une telle approche, j'ai choisi d'étudier l'adhérence de lignées cellulaires issues d'un glioblastome (U-87 MG), en collaboration avec l'équipe de Monique Dontenwill. Ces cellules ont été modifiées pour sur-exprimer ou sous-exprimer la sous-unité $\alpha 5$ des intégrines à l'origine de la reconnaissance spécifique avec la fibronectine (U-87 MG $\alpha 5+$ et $\alpha 5-$). J'ai en particulier mis en évidence les propriétés inhibitrices des molécules antagonistes d'intégrines sur l'adhérence des cellules U-87 MG $\alpha 5+$. J'ai également déstructuré le cytosquelette d'actine en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques d'Arp2/3 et ROCK, afin de mieux comprendre son influence sur l'adhérence des cellules U-87 MG $\alpha 5+$. L'un des défis de ce travail, du point de vue de l'instrumentation, a été de superposer parfaitement les deux sources laser pour faire d'une part, du va-TIRF en excitant directement la DiO (marquage direct de la membrane cellulaire), et d'autre part, pour localiser par marquage spécifique les PFA ou les structures d'actine. Le dispositif expérimental a été optimisé à plusieurs reprises pour éviter toutes sortes d'aberrations et pour mesurer la distance entre la membrane cellulaire et le substrat avec une résolution nanométrique (typiquement de l'ordre de 20 nm). L'autre défi a été de mettre en place des protocoles de marquage spécifique et de bien maîtriser certains paramètres expérimentaux afin de préserver l'intégrité de la membrane cellulaire.

L'outil de nanoscopie que j'ai mis en place est basé sur une excitation laser via des ondes évanescentes. Il consiste à enregistrer une série d'images TIRF en augmentant progressivement l'angle d'incidence du faisceau laser sur l'échantillon. Pour déterminer avec précision cet angle, j'ai développé une procédure de calibration simple et qui permet d'atteindre la précision de $\pm 0.1^\circ$. Les principaux avantages de cette méthode sont sa facilité de mise en œuvre et sa grande fiabilité. Elle consiste à déposer un film de PMMA dopé avec des QDs sur une lamelle de verre et d'enregistrer les images du plan focal arrière de l'objectif afin de mesurer l'angle critique pour différentes interfaces. Cette méthode de calibration a été appliquée avec succès à la microscopie TIRF à angle variable, pour étudier l'adhérence cellulaire en quantifiant les distances entre les cellules et le substrat. Après la calibration, un simple traitement d'image permet de reconstruire la topographie de la membrane cellulaire au-dessus d'une lamelle de verre recouverte d'une fine couche de fibronectine. Il est également possible d'extraire de ces mesures la distribution spatiale de l'indice effectif n_{eff} du cortex cellulaire. Pour caractériser l'adhérence nous avons introduit la notion de zones de contacts proches et distants en faisant un double seuillage sur la hauteur et l'indice de réfraction effectif et ainsi identifier les zones d'interactions spécifiques et non-spécifiques. L'analyse des images va-TIRF de cellules fixées, où l'actine et la paxilline ont été marquées, a montré que les contacts proches sont des domaines membranaires contenant les plaques d'adhérence (point focal et cortex d'actine) et d'autres protéines qui participent aux interactions membrane/substrat.

Dans un premier temps, j'ai mis en évidence le comportement adhésif et migratoire des cellules U-87 MG $\alpha 5^+$ et $\alpha 5^-$ en étudiant simultanément leurs interactions spécifiques et non-spécifiques. De nombreuses informations peuvent être extraites de ce type d'analyse de données, tels que la hauteur moyenne de la membrane par rapport au substrat, la distribution des contacts proches et distants, ainsi que leur énergie d'adhérence. J'ai trouvé que les cellules $\alpha 5^+$ s'étalent plus sur la fibronectine que les cellules $\alpha 5^-$. De plus, elles présentent un grand nombre de contacts proches, mais ces contacts sont énergétiquement faibles, ce qui leur permet de migrer un peu plus vite que les cellules $\alpha 5^-$. Il est tout à fait possible d'enregistrer des images va-TIRF toutes les 5 ou 10 minutes afin de suivre en dynamique l'adhérence d'une cellule individuelle au fur et à mesure de sa migration. J'ai d'ailleurs eu l'occasion d'observer la migration d'une cellule U-87 MG $\alpha 5^+$ à la surface d'une lamelle recouverte de fibronectine. Le défi était de trouver une cellule qui migre avec persistance puisque ces cellules migrent rarement dans une direction choisie mais décrivent plutôt un mouvement aléatoire sur la surface. L'intérêt de l'approche dynamique est de quantifier par exemple, la persistance temporelle d'un contact proche.

Dans un deuxième temps, j'ai étudié en va-TIRF les effets de l'inhibition fonctionnelle des intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ par des antagonistes RGD-like. Le traitement des données a montré que les deux antagonistes, développés d'un point de vue biochimique pour agir uniquement sur les interactions spécifiques, ont également un effet non-négligeable sur les contacts distants. Les cellules traitées avec la molécule SN243 présentent toujours un aspect pro-migratoire. Cette molécule modifie la structure et l'organisation des contacts proches ainsi que l'énergie de liaison des interactions spécifiques. Ceci permet aux cellules traitées de migrer plus vite. A l'opposé, la molécule FR248 a un effet global à la fois sur les interactions spécifiques et non-spécifiques, leur donnant un aspect globulaire. La molécule FR248 modifie la structure et l'énergie à la fois des contacts proches et distants. Les effets opposés des deux antagonistes dans certains cas impliquent que les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ ont des rôles différents dans l'adhérence et la migration des cellules U-87 MG $\alpha 5^+$. Les expériences effectuées avant et après traitement avec CK666 et Y27632 sont des expériences préliminaires. Concernant l'effet de ces molécules chimiques sur la structure des contacts proches et distants, j'ai trouvé que CK666 agit plutôt sur les contacts distants alors que Y27632 a un effet à la fois sur les contacts proches et distants. Les deux produits modifient la valeur de l'énergie d'interaction cellule/substrat sans modifier la position d'équilibre. Ce résultat montre clairement que le cytosquelette d'actine influence notablement la mesure de l'énergie d'interaction. On peut ainsi supposer que les antagonistes d'intégrines déclenchent une voie de signalisation qui va moduler le cytosquelette d'actine et modifier la composition membranaire. Ces résultats montrent que l'énergie *De* s'avère être un paramètre clé pour quantifier l'adhérence des cellules et l'action des différentes molécules (antagonistes et autres drogues).

Durant mon travail de thèse, j'ai commencé à étudier l'adhérence des cellules U-87 MG $\alpha 5^+$ sur des surfaces microstructurées (micropatterns) en va-TIRF. L'utilisation de microstructures 2D, recouvertes de protéines matricielles comme de la fibronectine, est un moyen efficace pour étudier l'adhérence des cellules dans des conformations proches de certaines conditions physiologiques [162]. J'ai réalisé des microstructures 2D de fibronectine

par photolithographie et ainsi je me suis affranchie de la grande variation en taille et en forme des cellules. De plus, à l'aide de cette technique je peux envisager faire migrer les cellules dans une direction donnée. Cette technique de patterning cellulaire est compatible avec le va-TIRF et peut être une piste intéressante pour caractériser l'adhérence en fonction de l'architecture du cytosquelette. Nous avons récemment acquis le système Primo d'Alvéole [189] qui permet aisément de préparer des surfaces microstructurées de tailles et de géométries différentes. Par exemple, à l'aide de ce système nous serons capables de réaliser une migration dirigée des cellules à l'aide d'un gradient de concentration surfacique de fibronectine. Ce type d'expériences devrait permettre d'établir une corrélation entre la forme de la cellule et son pouvoir migratoire.

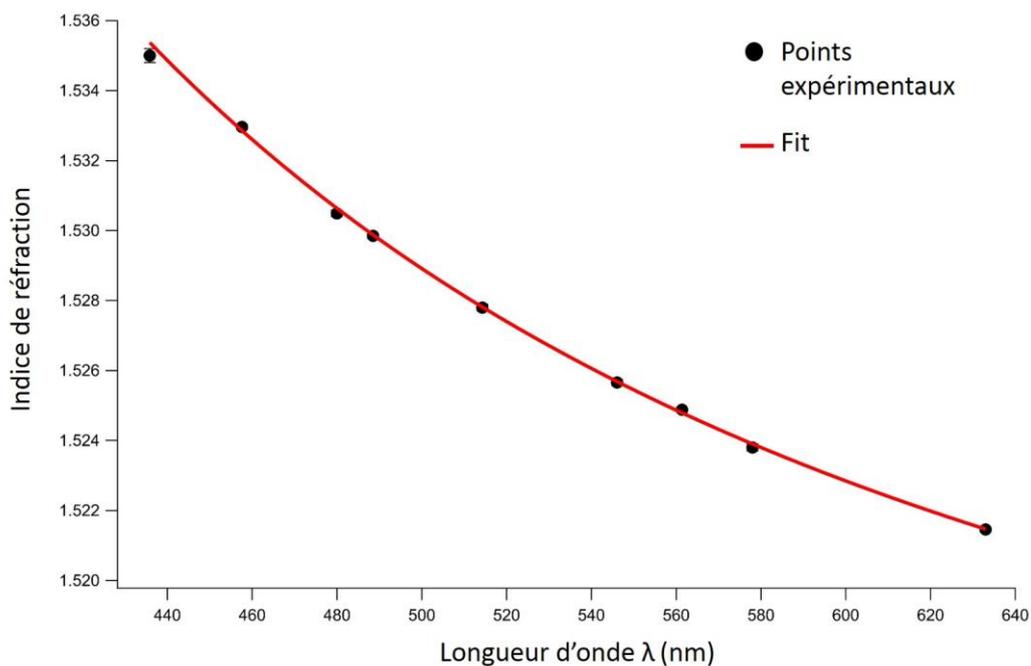
Pour finir, j'ai déjà insisté sur les méfaits de la fixation et de la perméabilisation sur la membrane cellulaire dans le chapitre 4. La présence de trous dans la membrane plasmique ainsi que le changement de sa composition peuvent générer des faux-positifs et des faux-négatifs en microscopie de fluorescence quantitative. Pour s'en affranchir nous pouvons localiser les contacts focaux sur des cellules vivantes en utilisant des aptamères ARN fluorescents, comme ceux développés par Laurence Choulier (Equipe Signalisation tumorale et cibles thérapeutiques – LBP UMR CNRS 7021, Strasbourg) [190]. Ces aptamères ciblent la partie extracellulaire des intégrines $\alpha 5 \beta 1$ et peuvent servir à étudier simultanément la dynamique des contacts proches seuls ou en association avec d'autres inhibiteurs d'intégrines ou du cytosquelette.

ANNEXES

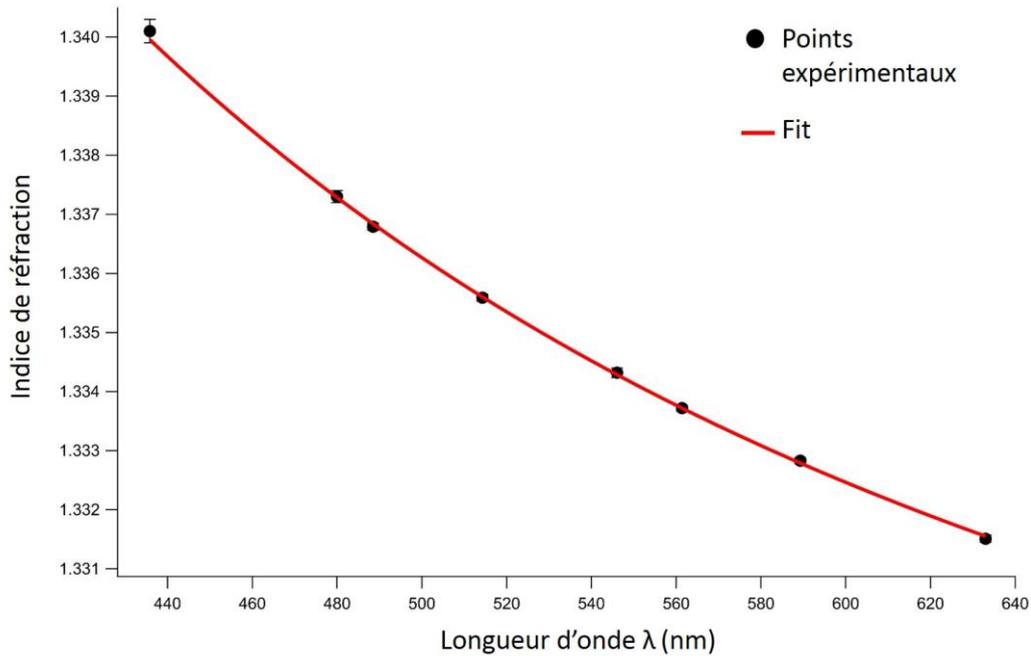
Nous avons mesuré à température ambiante (22°C) et à différentes longueurs d'onde allant du bleu au rouge, la variation des indices de réfraction des lamelles de verre, de l'eau ultra pure et du glycérol avec le réfractomètre d'Abbe (Abbe 60/ED, Bellingham and Stanley). Chaque mesure a été répétée 10 fois. Les points expérimentaux ont été ensuite ajustés numériquement selon le modèle de Cauchy afin d'obtenir les courbes de dispersion d'indice :

$$n(\lambda) = A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4} + \frac{D}{\lambda^6} + \dots$$

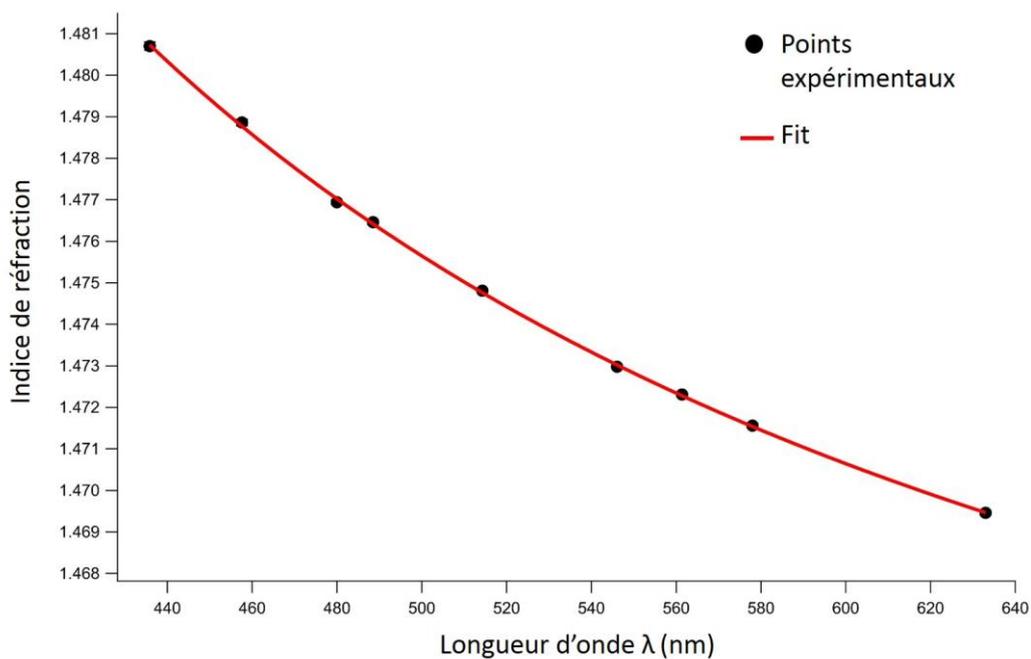
où A , B , C , et D sont des coefficients propres à chaque matériau.



Annexe 1.1 : Courbe de dispersion de l'indice de réfraction d'une lamelle de verre de 170 μm d'épaisseur (24 x 24) à température ambiante (22°C). Les points noirs et la courbe rouge représentent respectivement les données expérimentales et l'ajustement numérique selon le modèle de Cauchy : $A = 1,5096$; $B = 4612$; $C = 4,8559 \cdot 10^7$; $D = 7,0867 \cdot 10^{11}$. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types expérimentaux.



Annexe 1.2 : Courbe de dispersion de l'indice de réfraction de l'eau ultra pure à température ambiante (22°C). Les points noirs et la courbe rouge représentent respectivement les données expérimentales et l'ajustement numérique selon le modèle de Cauchy : $A = 1,3229$; $B = 3646,8$; $C = -7,9.10^7$; $D = 5,5356.10^9$. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types expérimentaux.



Annexe 1.3 : Courbe de dispersion de l'indice de réfraction du glycérol à température ambiante (22°C). Les points noirs et la courbe rouge représentent respectivement les données expérimentales et l'ajustement numérique selon le modèle de Cauchy : $A = 1,4583$; $B = 4796$; $C = -1,5797.10^8$; $D = 1,0594.10^{13}$. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types expérimentaux.

RÉFÉRENCES

1. Hynes, R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **2002**, *110*, 673–87.
2. Kanchanawong, P.; Shtengel, G.; Pasapera, A.M.; Ramko, E.B.; Davidson, M.W.; Hess, H.F.; Waterman, C.M. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* **2010**, *468*, 580–584.
3. Kechagia, J.Z.; Ivaska, J.; Roca-Cusachs, P. Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 457–473.
4. Cardoso Dos Santos, M.; Déturche, R.; Vézy, C.; Jaffiol, R. Topography of Cells Revealed by Variable-Angle Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. *Biophys. J.* **2016**, *111*, 1316–1327.
5. Cardoso Dos Santos, M.; Vézy, C.; Morjani, H.; Jaffol, R. Single cell adhesion strength assessed with variable-angle total internal reflection fluorescence microscopy. *AIMS Biophys.* **2017**, *4*, 438–450.
6. Abercrombie, M. The Croonian Lecture, 1978 - The crawling movement of metazoan cells. *Proc. R. Soc. London. Ser. B. Biol. Sci.* **1980**, *207*, 129–147.
7. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular biology of the cell*; Garland Science, Taylor & Francis Group, 2014; ISBN 978-0-8153-4432-2.
8. Hynes, R.O.; Naba, A. Overview of the Matrisome--An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, 1–17.
9. Couchman, J.R. Transmembrane Signaling Proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2010**, *26*, 89–114.
10. Ricard-Blum, S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, 1–19.
11. Campbell, I.D.; Humphries, M.J. Integrin Structure, Activation, and Interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, 1–14.
12. Ruoslahti, E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, *12*, 697–715.
13. Feige, J.J.; Baird, A. La crinopexie: un modèle décrivant les mécanismes qui régissent la biodisponibilité des facteurs de croissance. *médecine/sciences* **1992**, *8*, 805–810.
14. Geiger, B.; Spatz, J.P.; Bershadsky, A.D. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 21–33.
15. Hamidi, H.; Ivaska, J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 533–548.
16. Lehenkari, P.P.; Horton, M.A. Single Integrin Molecule Adhesion Forces in Intact Cells Measured by Atomic Force Microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *259*, 645–650.
17. Vitte, J.; Benoliel, A.-M.; Eymeric, P.; Bongrand, P.; Pierres, A. β -1 Integrin-Mediated Adhesion May Be Initiated by Multiple Incomplete Bonds, Thus Accounting for the Functional Importance of Receptor Clustering. *Biophys. J.* **2004**, *86*, 4059–4074.
18. Malinski, J.A.; Zera, E.M.; Angleson, J.K.; Wensel, T.G. High Affinity Interactions of GTP γ S with the Heterotrimeric G Protein, Transducin. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 12919–12924.
19. Kanchanawong, P.; Shtengel, G.; Pasapera, A.M.; Ramko, E.B.; Davidson, M.W.; Hess, H.F.; Waterman, C.M. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* **2010**, *468*, 580–584.

20. Choi, C.K.; Vicente-Manzanares, M.; Zareno, J.; Whitmore, L.A.; Mogilner, A.; Horwitz, A.R. Actin and α -actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 1039–1050.
21. Zaidel-Bar, R. Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 4605–4613.
22. Gardel, M.L.; Schneider, I.C.; Aratyn-Schaus, Y.; Waterman, C.M. Mechanical Integration of Actin and Adhesion Dynamics in Cell Migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2010**, *26*, 315–333.
23. Pelham, R.J.; Wang, Y. -I. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 13661–13665.
24. Juanes, M.A.; Isnardon, D.; Badache, A.; Basselet, S.; Mavrakakis, M.; Goode, B.L. The role of APC-mediated actin assembly in microtubule capture and focal adhesion turnover. *J. Cell Biol.* **2019**, *218*, 3415–3435.
25. Medalia, O.; Geiger, B. Frontiers of microscopy-based research into cell–matrix adhesions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2010**, *22*, 659–668.
26. Hu, S.; Tee, Y.-H.; Kabla, A.; Zaidel-Bar, R.; Bershadsky, A.; Hersen, P. Structured illumination microscopy reveals focal adhesions are composed of linear subunits. *Cytoskeleton* **2015**, *72*, 235–245.
27. Le Clainche, C.; Carlier, M.-F. Regulation of Actin Assembly Associated With Protrusion and Adhesion in Cell Migration. *Physiol. Rev.* **2008**, *88*, 489–513.
28. Revenu, C.; Athman, R.; Robine, S.; Louvard, D. The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 635–646.
29. Euteneuer, U.; Schliwa, M. Persistent, directional motility of cells and cytoplasmic fragments in the absence of microtubules. *Nature* **1984**, *310*, 58–61.
30. Horwitz, A.R.; Parsons, J.T. Cell migration--movin' on. *Science* **1999**, *286*, 1102–1103.
31. Theriot, J.A.; Mitchison, T.J. Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature* **1991**, *352*, 126–131.
32. Watanabe, N.; Mitchison, T.J. Single-molecule speckle analysis of actin filament turnover in lamellipodia. *Science* **2002**, *295*, 1083–1086.
33. Salmon, W.C.; Adams, M.C.; Waterman-Storer, C.M. Dual-wavelength fluorescent speckle microscopy reveals coupling of microtubule and actin movements in migrating cells. *J. Cell Biol.* **2002**, *158*, 31–37.
34. White, D.P.; Caswell, P.T.; Norman, J.C. $\alpha\beta3$ and $\alpha5\beta1$ integrin recycling pathways dictate downstream Rho kinase signaling to regulate persistent cell migration. *J. Cell Biol.* **2007**, *177*, 515–525.
35. Laukaitis, C.M.; Webb, D.J.; Donais, K.; Horwitz, A.F. Differential Dynamics of $\alpha5$ Integrin, Paxillin, and α -Actinin during Formation and Disassembly of Adhesions in Migrating Cells. *J. Cell Biol.* **2001**, *153*, 1427–1440.
36. Cardoso Dos Santos, M. Etude de l'adhésion de vésicules géantes et de cellules vivantes par nanoscopie de fluorescence, thèse de doctorat de l'Université Technologie de Troyes, 2015.
37. Blanchoin, L.; Boujemaa-Paterski, R.; Sykes, C.; Plastino, J. Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility. *Physiol. Rev.* **2014**, *94*, 235–263.
38. Huxley, H.E. Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. *J. Mol. Biol.* **1963**, *7*, 281–308.
39. Pollard, T.D.; Borisy, G.G. Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. *Cell* **2003**, *112*, 453–465.
40. Hall, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **1998**, *279*, 509–514.
41. Senbanjo, L.T.; Chellaiah, M.A. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion

- Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front. cell Dev. Biol.* **2017**, *5*, 18.
42. Singer, S.J.; Nicolson, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **1972**, *175*, 720–731.
 43. Simons, K.; Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **1997**, *387*, 569–572.
 44. He, H.-T.; Marguet, D. Detecting Nanodomains in Living Cell Membrane by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2011**, *62*, 417–436.
 45. Lieber, A.D.; Yehudai-Resheff, S.; Barnhart, E.L.; Theriot, J.A.; Keren, K. Membrane tension in rapidly moving cells is determined by cytoskeletal forces. *Curr. Biol.* **2013**, *23*, 1409–1417.
 46. Gauthier, N.C.; Fardin, M.A.; Roca-Cusachs, P.; Sheetz, M.P. Temporary increase in plasma membrane tension coordinates the activation of exocytosis and contraction during cell spreading. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 14467–14472.
 47. Keren, K. Cell motility: the integrating role of the plasma membrane. *Eur. Biophys. J.* **2011**, *40*, 1013–1027.
 48. Bereiter-Hahn, J. Quantitative reflection contrast microscopy of living cells. *J. Cell Biol.* **1979**, *82*, 767–779.
 49. Lanni, F. Structural organization of interphase 3T3 fibroblasts studied by total internal reflection fluorescence microscopy. *J. Cell Biol.* **1985**, *100*, 1091–1102.
 50. Sackmann, E.; Bruinsma, R.F. Cell Adhesion as Wetting Transition? *ChemPhysChem* **2002**, *3*, 262.
 51. BENNETT, H.S. Morphological aspects of extracellular polysaccharides. *J. Histochem. Cytochem.* **1963**, *11*, 14–23.
 52. Reitsma, S.; Slaaf, D.W.; Vink, H.; van Zandvoort, M.A.M.J.; oude Egbrink, M.G.A. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch.* **2007**, *454*, 345–359.
 53. Paszek, M.J.; Boettiger, D.; Weaver, V.M.; Hammer, D.A. Integrin Clustering Is Driven by Mechanical Resistance from the Glycocalyx and the Substrate. *PLoS Comput. Biol.* **2009**, *5*, 1–14.
 54. Paszek, M.J.; DuFort, C.C.; Rossier, O.; Bainer, R.; Mouw, J.K.; Godula, K.; Hudak, J.E.; Lakins, J.N.; Wijekoon, A.C.; Cassereau, L.; et al. The cancer glycocalyx mechanically primes integrin-mediated growth and survival. *Nature* **2014**, *511*, 319–325.
 55. Dos Santos, M.C.; D eturche, R.; V ezy, C.; Jaffiol, R. Axial nanoscale localization by normalized total internal reflection fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* **2014**, *39*, 869–872.
 56. Baronsky, T.; Ruhlandt, D.; Br uckner, B.R.; Sch afer, J.; Karedla, N.; Isbaner, S.; H ahnel, D.; Gregor, I.; Enderlein, J.; Janshoff, A.; et al. Cell–Substrate Dynamics of the Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Nano Lett.* **2017**, *17*, 3320–3326.
 57. Dejardin, M.-J.; Hemmerle, A.; Sadoun, A.; Hamon, Y.; Puech, P.-H.; Sengupta, K.; Limozin, L. Lamellipod Reconstruction by Three-Dimensional Reflection Interference Contrast Nanoscopy (3D-RICN). *Nano Lett.* **2018**, *18*, 6544–6550.
 58. Israelachvili, J. *Intermolecular and Surface Forces*; Elsevier, 2011; ISBN 9780123751829.
 59. McEvoy, L.M.; Sun, H.; Frelinger, J.G.; Butcher, E.C. Anti-CD43 Inhibition of T Cell Homing. *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 1493–1498.
 60. Khalili, A.; Ahmad, M. A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 18149–18184.
 61. Pierres, A.; Vitte, J.; Benoliel, A.-M.; Bongrand, P. Dissecting Individual Ligand-Receptor Bonds with a Laminar Flow Chamber. *Biophys. Rev. Lett.* **2008**, *01*, 231–257.

62. Christ, K. V.; Turner, K.T. Methods to Measure the Strength of Cell Adhesion to Substrates. *J. Adhes. Sci. Technol.* **2010**, *24*, 2027–2058.
63. Kress, A.; Wang, X.; Ranchon, H.; Savatier, J.; Rigneault, H.; Ferrand, P.; Brasselet, S. Mapping the Local Organization of Cell Membranes Using Excitation-Polarization-Resolved Confocal Fluorescence Microscopy. *Biophys. J.* **2013**, *105*, 127–136.
64. Valades Cruz, C.A.; Shaban, H.A.; Kress, A.; Bertaux, N.; Monneret, S.; Mavrikakis, M.; Savatier, J.; Brasselet, S. Quantitative nanoscale imaging of orientational order in biological filaments by polarized superresolution microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113*, E820–E828.
65. Hu, S.; Dasbiswas, K.; Guo, Z.; Tee, Y.-H.; Thiagarajan, V.; Hersen, P.; Chew, T.-L.; Safran, S.A.; Zaidel-Bar, R.; Bershadsky, A.D. Long-range self-organization of cytoskeletal myosin II filament stacks. *Nat. Cell Biol.* **2017**, *19*, 133–141.
66. Cretel, E.; Pierres, A.; Benoliel, A.-M.; Bongrand, P. How Cells Feel Their Environment: A Focus on Early Dynamic Events. *Cell. Mol. Bioeng.* **2008**, *1*, 5–14.
67. Limozin, L.; Sengupta, K. Quantitative Reflection Interference Contrast Microscopy (RICM) in Soft Matter and Cell Adhesion. *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 2752–2768.
68. Plotnikov, S. V.; Sabass, B.; Schwarz, U.S.; Waterman, C.M. High-Resolution Traction Force Microscopy. In *Methods in Cell Biology*; 2014; pp. 367–394.
69. Tan, J.L.; Tien, J.; Pirone, D.M.; Gray, D.S.; Bhadriraju, K.; Chen, C.S. Cells lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 1484–1489.
70. Palmer, C.P.; Mycielska, M.E.; Burcu, H.; Osman, K.; Collins, T.; Beckerman, R.; Perrett, R.; Johnson, H.; Aydar, E.; Djamgoz, M.B.A. Single cell adhesion measuring apparatus (SCAMA): application to cancer cell lines of different metastatic potential and voltage-gated Na⁺ channel expression. *Eur. Biophys. J.* **2008**, *37*, 359–368.
71. Taubenberger, A.; Cisneros, D.A.; Friedrichs, J.; Puech, P.-H.; Muller, D.J.; Franz, C.M. Revealing Early Steps of $\alpha 2 \beta 1$ Integrin-mediated Adhesion to Collagen Type I by Using Single-Cell Force Spectroscopy. *Mol. Biol. Cell* **2007**, *18*, 1634–1644.
72. Franz, C.M.; Taubenberger, A.; Puech, P.-H.; Muller, D.J. Studying integrin-mediated cell adhesion at the single-molecule level using AFM force spectroscopy. *Sci. STKE* **2007**, *2007*, p15.
73. Thoumine, O.; Kocian, P.; Kottelat, A.; Meister, J.J. Short-term binding of fibroblasts to fibronectin: optical tweezers experiments and probabilistic analysis. *Eur. Biophys. J.* **2000**, *29*, 398–408.
74. Jablonski, A. Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. *Nature* **1933**, *131*, 839–840.
75. Wolf, D.E. Fundamentals of Fluorescence and Fluorescence Microscopy. In *Methods in Cell Biology*; 2013; pp. 69–97.
76. Toseland, C.P. Fluorescent labeling and modification of proteins. *J. Chem. Biol.* **2013**, *6*, 85–95.
77. Kempe, D.; Schöne, A.; Fitter, J.; Gabba, M. Accurate Fluorescence Quantum Yield Determination by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 4668–4672.
78. Wennmalm, S.; Rigler, R. On Death Numbers and Survival Times of Single Dye Molecules. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 2516–2519.
79. Axelrod, D. Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization. *Biophys. J.* **1979**, *26*, 557–573.
80. Parish, C.R. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol. Cell Biol.* **1999**, *77*, 499–508.
81. Shimomura, O.; Johnson, F.H.; Saiga, Y. Extraction, Purification and Properties of

- Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, *59*, 223–239.
82. Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W.W.; Prasher, D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **1994**, *263*, 802–805.
 83. Goedhart, J.; von Stetten, D.; Noirclerc-Savoye, M.; Lelimousin, M.; Joosen, L.; Hink, M.A.; van Weeren, L.; Gadella, T.W.J.; Royant, A. Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 751.
 84. Weissman, T.A.; Pan, Y.A. Brainbow: New Resources and Emerging Biological Applications for Multicolor Genetic Labeling and Analysis. *Genetics* **2015**, *199*, 293–306.
 85. Shaner, N.C.; Steinbach, P.A.; Tsien, R.Y. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods* **2005**, *2*, 905–909.
 86. Kubitscheck, U. *Fluorescence Microscopy*; Kubitscheck, U., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2017; ISBN 9783527687732.
 87. Liu, W.; Toussaint, K.C.; Okoro, C.; Zhu, D.; Chen, Y.; Kuang, C.; Liu, X. Breaking the Axial Diffraction Limit: A Guide to Axial Super-Resolution Fluorescence Microscopy. *Laser Photon. Rev.* **2018**, *12*, 1700333.
 88. Hell, S.W.; Wichmann, J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* **1994**, *19*, 780–782.
 89. Klar, T.A.; Jakobs, S.; Dyba, M.; Egner, A.; Hell, S.W. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 8206–8210.
 90. Hein, B.; Willig, K.I.; Hell, S.W. Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 14271–14276.
 91. Wäldchen, S.; Lehmann, J.; Klein, T.; van de Linde, S.; Sauer, M. Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 15348.
 92. Laissue, P.P.; Alghamdi, R.A.; Tomancak, P.; Reynaud, E.G.; Shroff, H. Assessing phototoxicity in live fluorescence imaging. *Nat. Methods* **2017**, *14*, 657–661.
 93. Betzig, E.; Patterson, G.H.; Sougrat, R.; Lindwasser, O.W.; Olenych, S.; Bonifacino, J.S.; Davidson, M.W.; Lippincott-Schwartz, J.; Hess, H.F. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science (80-.)*. **2006**, *313*, 1642–1645.
 94. Rust, M.J.; Bates, M.; Zhuang, X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods* **2006**, *3*, 793–796.
 95. Paszek, M.J.; DuFort, C.C.; Rubashkin, M.G.; Davidson, M.W.; Thorn, K.S.; Liphardt, J.T.; Weaver, V.M. Scanning angle interference microscopy reveals cell dynamics at the nanoscale. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 825–827.
 96. Chizhik, A.I.; Rother, J.; Gregor, I.; Janshoff, A.; Enderlein, J. Metal-induced energy transfer for live cell nanoscopy. *Nat. Photonics* **2014**, *8*, 124–127.
 97. Ruckstuhl, T.; Verdes, D. Supercritical angle fluorescence (SAF) microscopy. *Opt. Express* **2004**, *12*, 4246.
 98. Bourg, N.; Mayet, C.; Dupuis, G.; Barroca, T.; Bon, P.; Lécart, S.; Fort, E.; Lévêque-Fort, S. Direct optical nanoscopy with axially localized detection. *Nat. Photonics* **2015**, *9*, 587–593.
 99. Axelrod, D. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *J. Cell Biol.* **1981**, *89*, 141–145.
 100. Cotton, A.; Mouton, H. Les Objets Ultramicroscopiques. *Rev. Gen. des Sci. pures Appl.* **1903**, *14*, 1184–1191.
 101. AMBROSE, E.J. A Surface Contact Microscope for the study of Cell Movements.

- Nature* **1956**, *178*, 1194–1194.
102. Stout, A.L.; Axelrod, D. Evanescent field excitation of fluorescence by epi-illumination microscopy. *Appl. Opt.* **1989**, *28*, 5237.
 103. Truskey, G.A.; Burmeister, J.S.; Grapa, E.; Reichert, W.M. Total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). II. Topographical mapping of relative cell/substratum separation distances. *J. Cell Sci.* **1992**, *103* (Pt 2), 491–9.
 104. Burmeister, J.S.; Truskey, G.A.; Yarbrough, J.L.; Reichert, W.M. Imaging of cell/substrate contacts on polymers by total internal reflection fluorescence microscopy. *Biotechnol. Prog.* **1994**, *10*, 26–31.
 105. Mattheyses, A.L.; Simon, S.M.; Rappoport, J.Z. Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 3621–3628.
 106. Renard, R.H. Total Reflection: A New Evaluation of the Goos–Hänchen Shift. *J. Opt. Soc. Am.* **1964**, *54*, 1190.
 107. Brunstein, M.; Teremetz, M.; Héroult, K.; Tourain, C.; Oheim, M. Eliminating Unwanted Far-Field Excitation in Objective-Type TIRF. Part I. Identifying Sources of Nonevanescent Excitation Light. *Biophys. J.* **2014**, *106*, 1020–1032.
 108. Brunstein, M.; Héroult, K.; Oheim, M. Eliminating Unwanted Far-Field Excitation in Objective-Type TIRF. Part II. Combined Evanescent-Wave Excitation and Supercritical-Angle Fluorescence Detection Improves Optical Sectioning. *Biophys. J.* **2014**, *106*, 1044–1056.
 109. Axelrod, D. Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy in Cell Biology. *Traffic* **2001**, *2*, 764–774.
 110. Mattheyses, A.L.; Axelrod, D. Direct measurement of the evanescent field profile produced by objective-based total internal reflection fluorescence. *J. Biomed. Opt.* **2006**, *11*, 014006.
 111. Oheim, M.; Salomon, A.; Weissman, A.; Brunstein, M.; Becherer, U. Calibrating Evanescent-Wave Penetration Depths for Biological TIRF Microscopy. *Biophys. J.* **2019**, *117*, 795–809.
 112. Niederauer, C.; Blumhardt, P.; Mücksch, J.; Heymann, M.; Lambacher, A.; Schwille, P. Direct characterization of the evanescent field in objective-type total internal reflection fluorescence microscopy. *Opt. Express* **2018**, *26*, 20492.
 113. Axelrod, D. Chapter 9 Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. In *Methods in Cell Biology*; 1989; pp. 245–270 ISBN 9780123944474.
 114. Axelrod, D. Chapter 7 Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. In *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*; 2008; pp. 169–221.
 115. Roman-Vendrell, C.; Chevalier, M.; Acevedo-Canabal, A.M.; Delgado-Peraza, F.; Flores-Otero, J.; Yudowski, G.A. Imaging of kiss-and-run exocytosis of surface receptors in neuronal cultures. *Front. Cell. Neurosci.* **2014**, *8*.
 116. Chudinova, E.M.; Brodsky, I.B.; Nadezhdina, E.S. On the interaction of ribosomal protein RPL22e with microtubules. *Cell Biol. Int.* **2019**, cbin.11141.
 117. Reichert, W.M.; Truskey, G.A. Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. I. Modelling cell contact region fluorescence. *J. Cell Sci.* **1990**, *96* (Pt 2), 219–30.
 118. Gingell, D. Topography of cell-glass apposition revealed by total internal reflection fluorescence of volume markers. *J. Cell Biol.* **1985**, *100*, 1334–1338.
 119. Stock, K.; Sailer, R.; Strauss, W.S.L.; Lyttek, M.; Steiner, R.; Schneckenburger, H. Variable-angle total internal reflection fluorescence microscopy (VA-TIRFM): realization and application of a compact illumination device. *J. Microsc.* **2003**, *211*, 19–29.
 120. Mattheyses, A.L.; Shaw, K.; Axelrod, D. Effective elimination of laser interference

- fringing in fluorescence microscopy by spinning azimuthal incidence angle. *Microsc. Res. Tech.* **2006**, *69*, 642–647.
121. Brunstein, M.; Roy, L.; Oheim, M. Near-Membrane Refractometry Using Supercritical Angle Fluorescence. *Biophys. J.* **2017**, *112*, 1940–1948.
 122. Burmeister, J.S.; Truskey, G.A.; Reichert, W.M. Quantitative analysis of variable-angle total internal reflection fluorescence microscopy (VA-TIRFM) of cell/substrate contacts. *J. Microsc.* **1994**, *173*, 39–51.
 123. Reichert, W.M.; Truskey, G.A. Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. I. Modelling cell contact region fluorescence. *J. Cell Sci.* **1990**, *96* (Pt 2), 219–30.
 124. Gingell, D.; Heavens, O.S.; Mellor, J.S. General electromagnetic theory of total internal reflection fluorescence: the quantitative basis for mapping cell-substratum topography. *J. Cell Sci.* **1987**, *87* (Pt 5), 677–93.
 125. Klein, K.; Rommel, C.E.; Hirschfeld-Warneken, V.C.; Spatz, J.P. Cell membrane topology analysis by RICM enables marker-free adhesion strength quantification. *Biointerphases* **2013**, *8*, 28.
 126. Bohannon, K.P.; Holz, R.W.; Axelrod, D. Refractive Index Imaging of Cells with Variable-Angle Near-Total Internal Reflection (TIR) Microscopy. *Microsc. Microanal.* **2017**, *23*, 978–988.
 127. Takamura, K.; Fischer, H.; Morrow, N.R. Physical properties of aqueous glycerol solutions. *J. Pet. Sci. Eng.* **2012**, *98–99*, 50–60.
 128. Polyanskiy, M. Refractive index database.
 129. Daimon, M.; Masumura, A. Measurement of the refractive index of distilled water from the near-infrared region to the ultraviolet region. *Appl. Opt.* **2007**, *46*, 3811.
 130. El-Kashef, H. The necessary requirements imposed on polar dielectric laser dye solvents—II. *Phys. B Condens. Matter* **2002**, *311*, 376–379.
 131. Birkhoff, R.D.; Painter, L.R.; Heller, J.M. Optical and dielectric functions of liquid glycerol from gas photoionization measurements. *J. Chem. Phys.* **1978**, *69*, 4185–4188.
 132. Axelrod, D. Evanescent Excitation and Emission in Fluorescence Microscopy. *Biophys. J.* **2013**, *104*, 1401–1409.
 133. Deschamps, J.; Mund, M.; Ries, J. 3D superresolution microscopy by supercritical angle detection. *Opt. Express* **2014**, *22*, 29081.
 134. Lukosz, W.; Kunz, R.E. Light emission by magnetic and electric dipoles close to a plane interface. I. Total radiated power. *J. Opt. Soc. Am.* **1977**, *67*, 1607–1615.
 135. Lukosz, W.; Kunz, R.E. Light emission by magnetic and electric dipoles close to a plane dielectric interface. II. Radiation pattern of perpendicular oriented dipoles. *J. Opt. Soc. Am.* **1977**, *67*, 1615–1619.
 136. Lukosz, W. Light emission by magnetic and electric dipoles close to a plane dielectric interface. III. Radiation patterns of dipoles with arbitrary orientation. *J. Opt. Soc. Am.* **1979**, *69*, 1495–1503.
 137. Patla, I.; Volberg, T.; Elad, N.; Hirschfeld-Warneken, V.; Grashoff, C.; Fässler, R.; Spatz, J.P.; Geiger, B.; Medalia, O. Dissecting the molecular architecture of integrin adhesion sites by cryo-electron tomography. *Nat. Cell Biol.* **2010**, *12*, 909–915.
 138. Shroff, H.; Galbraith, C.G.; Galbraith, J.A.; White, H.; Gillette, J.; Olenych, S.; Davidson, M.W.; Betzig, E. Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 20308–20313.
 139. Spiess, M.; Hernandez-Varas, P.; Oddone, A.; Olofsson, H.; Blom, H.; Waithe, D.; Lock, J.G.; Lakadamyali, M.; Strömblad, S. Active and inactive $\beta 1$ integrins segregate into distinct nanoclusters in focal adhesions. *J. Cell Biol.* **2018**.

140. Legerstee, K.; Geverts, B.; Slotman, J.A.; Houtsmuller, A.B. Dynamics and distribution of paxillin, vinculin, zyxin and VASP depend on focal adhesion location and orientation. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 10460.
141. Gandhi, J.G.; Koch, D.L.; Paszek, M.J. Equilibrium Modeling of the Mechanics and Structure of the Cancer Glycocalyx. *Biophys. J.* **2019**, *116*, 694–708.
142. Janouskova, H.; Maglott, A.; Leger, D.Y.; Bossert, C.; Noulet, F.; Guerin, E.; Guenot, D.; Pinel, S.; Chastagner, P.; Plenat, F.; et al. Integrin $\alpha 5\beta 1$ plays a critical role in resistance to temozolomide by interfering with the p53 pathway in high-grade glioma. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 3463–70.
143. Ray, A.-M.; Schaffner, F.; Janouskova, H.; Noulet, F.; Rognan, D.; Lelong-Rebel, I.; Choulier, L.; Blandin, A.-F.; Lehmann, M.; Martin, S.; et al. Single cell tracking assay reveals an opposite effect of selective small non-peptidic $\alpha 5\beta 1$ or $\alpha v\beta 3/\beta 5$ integrin antagonists in U87MG glioma cells. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2014**, *1840*, 2978–2987.
144. Wu, L.K.; Chen, K.Y.; Cheng, S.Y.; Lee, B.S.; Shu, C.M. Thermal decomposition of hydrogen peroxide in the presence of sulfuric acid. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2008**, *93*, 115–120.
145. Heil, N.; Maier, D. Optical contact angle measuring and contour analysis systems product series Available online: https://www.dataphysics-instruments.com/Downloads/OCA_V1.3_EN.
146. Lassalle, H.-P.; Baumann, H.; Strauss, W.S.L.; Schneckenburger, H. Cell-Substrate Topology upon ALA-PDT Using Variable-Angle Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (VA-TIRFM). *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **2007**, *26*, 83–88.
147. Holmqvist, B.I.; Ostholt, T.; Ekström, P. Dil tracing in combination with immunocytochemistry for analysis of connectivities and chemoarchitectonics of specific neural systems in a teleost, the atlantic salmon. *J. Neurosci. Methods* **1992**, *42*, 45–63.
148. Wang, H.-Y.; Sun, J.; Xia, L.-Y.; Li, Y.-H.; Chen, Z.; Wu, F.-G. Permeabilization-Tolerant Plasma Membrane Imaging Reagent Based on Amine-Rich Glycol Chitosan Derivatives. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2017**, *3*, 2570–2578.
149. Turner, C.E. Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, E231–E236.
150. Zamir, E.; Katz, B.Z.; Aota, S.; Yamada, K.M.; Geiger, B.; Kam, Z. Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* **1999**, *112* (Pt 1), 1655–69.
151. Geiger, B.; Bershadsky, A.; Pankov, R.; Yamada, K.M. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 793–805.
152. Hu, K.; Ji, L.; Applegate, K.T.; Danuser, G.; Waterman-Storer, C.M. Differential transmission of actin motion within focal adhesions. *Science* **2007**, *315*, 111–5.
153. Hotulainen, P.; Lappalainen, P. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J. Cell Biol.* **2006**, *173*, 383–94.
154. Maiuri, P.; Rupprecht, J.-F.; Wieser, S.; Rupprecht, V.; Bénichou, O.; Carpi, N.; Coppey, M.; De Beco, S.; Gov, N.; Heisenberg, C.-P.; et al. Actin Flows Mediate a Universal Coupling between Cell Speed and Cell Persistence. *Cell* **2015**, *161*, 374–386.
155. Ivaska, J.; Heino, J. Cooperation Between Integrins and Growth Factor Receptors in Signaling and Endocytosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2011**, *27*, 291–320.
156. Gasparski, A.N.; Beningo, K.A. Mechanoreception at the cell membrane: More than the integrins. *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, *586*, 20–6.
157. Prieve, D.C.; Alexander, B.M. Hydrodynamic measurement of double-layer repulsion between colloidal particle and flat plate. *Science* **1986**, *231*, 1269–70.
158. Raedler, J.; Sackmann, E. On the measurement of weak repulsive and frictional colloidal forces by reflection interference contrast microscopy. *Langmuir* **1992**, *8*, 848–853.

159. Schmidt, D.; Monzel, C.; Bihl, T.; Merkel, R.; Seifert, U.; Sengupta, K.; Smith, A.-S. Signature of a Nonharmonic Potential as Revealed from a Consistent Shape and Fluctuation Analysis of an Adherent Membrane. *Phys. Rev. X* **2014**, *4*, 021023.
160. Morse, P.M. Diatomic Molecules According to the Wave Mechanics. II. Vibrational Levels. *Phys. Rev.* **1929**, *34*, 57–64.
161. Chizhik, A.M.; Wollnik, C.; Ruhlandt, D.; Karedla, N.; Chizhik, A.I.; Hauke, L.; Hähnel, D.; Gregor, I.; Enderlein, J.; Rehfeldt, F. Dual-color metal-induced and Förster resonance energy transfer for cell nanoscopy. *Mol. Biol. Cell* **2018**, *29*, 846–851.
162. They, M. Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 4201–4213.
163. Azioune, A.; Carpi, N.; Tseng, Q.; Théry, M.; Piel, M. Protein micropatterns: A direct printing protocol using deep UVs. *Methods Cell Biol.* **2010**, *97*, 133–46.
164. Liu, Y.-J.; Le Berre, M.; Lautenschlaeger, F.; Maiuri, P.; Callan-Jones, A.; Heuzé, M.; Takaki, T.; Voituriez, R.; Piel, M. Confinement and Low Adhesion Induce Fast Amoeboid Migration of Slow Mesenchymal Cells. *Cell* **2015**, *160*, 659–672.
165. Vargas, P.; Maiuri, P.; Bretou, M.; Sáez, P.J.; Pierobon, P.; Maurin, M.; Chabaud, M.; Lankar, D.; Obino, D.; Terriac, E.; et al. Innate control of actin nucleation determines two distinct migration behaviours in dendritic cells. *Nat. Cell Biol.* **2016**, *18*, 43–53.
166. Streuli, C.H. Integrins and cell-fate determination. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 171–177.
167. Dzamba, B.J.; DeSimone, D.W. Extracellular Matrix (ECM) and the Sculpting of Embryonic Tissues. *Curr. Top. Dev. Biol.* **2018**, *130*, 245–274.
168. Carlo Marchisio, P. Integrins and tissue organization. *Adv. Neuroimmunol.* **1991**, *1*, 214–234.
169. Wickström, S.A.; Niessen, C.M. Cell adhesion and mechanics as drivers of tissue organization and differentiation: local cues for large scale organization. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2018**, *54*, 89–97.
170. Dotan, I.; Allez, M.; Danese, S.; Keir, M.; Tole, S.; McBride, J. The role of integrins in the pathogenesis of inflammatory bowel disease: Approved and investigational anti-integrin therapies. *Med. Res. Rev.* **2019**, med.21601.
171. Fujita, M.; Yamamoto, T.; Iyoda, T.; Fujisawa, T.; Sasada, M.; Nagai, R.; Kudo, C.; Otsuka, K.; Kamiya, S.; Kodama, H.; et al. Aggressive Progression in Glioblastoma Cells through Potentiated Activation of Integrin $\alpha 5 \beta 1$ by the Tenascin-C-Derived Peptide TNIIIA2. *Mol. Cancer Ther.* **2019**, *18*, 1649–1658.
172. Avraamides, C.J.; Garmy-Susini, B.; Varner, J.A. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 604–617.
173. Huang, Y.W.; Baluna, R.; Vitetta, E.S. Adhesion molecules as targets for cancer therapy. *Histol. Histopathol.* **1997**, *12*, 467–77.
174. Buckley, C.D.; Simmons, D.L. Cell adhesion: a new target for therapy. *Mol. Med. Today* **1997**, *3*, 449–456.
175. Schaffner, F.; Ray, A.; Dontenwill, M. Integrin $\alpha 5 \beta 1$, the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors. *Cancers (Basel)*. **2013**, *5*, 27–47.
176. Chamberlain, M.C.; Cloughsey, T.; Reardon, D.A.; Wen, P.Y. A novel treatment for glioblastoma: integrin inhibition. *Expert Rev. Neurother.* **2012**, *12*, 421–435.
177. Bhaskar, V.; Zhang, D.; Fox, M.; Seto, P.; Wong, M.H.L.; Wales, P.E.; Powers, D.; Chao, D.T.; DuBridg, R.B.; Ramakrishnan, V. A function blocking anti-mouse integrin $\alpha 5 \beta 1$ antibody inhibits angiogenesis and impedes tumor growth in vivo. *J. Transl. Med.* **2007**, *5*, 61.
178. Martinkova, E.; Maglott, A.; Leger, D.Y.; Bonnet, D.; Stiborova, M.; Takeda, K.; Martin, S.; Dontenwill, M. $\alpha 5 \beta 1$ integrin antagonists reduce chemotherapy-induced premature senescence and facilitate apoptosis in human glioblastoma cells. *Int. J. Cancer*

- 2010**, *127*, 1240–1248.
179. Uehata, M.; Ishizaki, T.; Satoh, H.; Ono, T.; Kawahara, T.; Morishita, T.; Tamakawa, H.; Yamagami, K.; Inui, J.; Maekawa, M.; et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* **1997**.
 180. Yang, Q.; Zhang, X.-F.; Pollard, T.D.; Forscher, P. Arp2/3 complex–dependent actin networks constrain myosin II function in driving retrograde actin flow. *J. Cell Biol.* **2012**, *197*, 939–956.
 181. Leckband, D.; Israelachvili, J. Intermolecular forces in biology. *Q. Rev. Biophys.* **2001**, *34*, 105–267.
 182. Bruinsma, R. Les liaisons dangereuses: Adhesion molecules do it statistically. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 375–376.
 183. Sabri, S.; Soler, M.; Foa, C.; Pierres, A.; Benoliel, A.; Bongrand, P. Glycocalyx modulation is a physiological means of regulating cell adhesion. *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 1589–600.
 184. Roca-Cusachs, P.; Gauthier, N.C.; Del Rio, A.; Sheetz, M.P. Clustering of alpha(5)beta(1) integrins determines adhesion strength whereas alpha(v)beta(3) and talin enable mechanotransduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 16245–50.
 185. Rotty, J.D.; Bear, J.E. Competition and collaboration between different actin assembly pathways allows for homeostatic control of the actin cytoskeleton. *Bioarchitecture* **2015**, *5*, 27–34.
 186. Suarez, C.; Kovar, D.R. Internetwork competition for monomers governs actin cytoskeleton organization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2016**, *17*, 799–810.
 187. Narumiya, S.; Ishizaki, T.; Uehata, M. Use and properties of ROCK-specific inhibitor Y-27632. *Methods Enzymol.* **2000**, *325*, 273–84.
 188. Blakely, B.L.; Dumelin, C.E.; Trappmann, B.; McGregor, L.M.; Choi, C.K.; Anthony, P.C.; Duesterberg, V.K.; Baker, B.M.; Block, S.M.; Liu, D.R.; et al. A DNA-based molecular probe for optically reporting cellular traction forces. *Nat. Methods* **2014**, *11*, 1229–1232.
 189. van Dongen, S.F.M.; Maiuri, P.; Marie, E.; Tribet, C.; Piel, M. Triggering Cell Adhesion, Migration or Shape Change with a Dynamic Surface Coating. *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 1687–1691.
 190. Fechter, P.; Cruz Da Silva, E.; Mercier, M.-C.; Noulet, F.; Etienne-Seloum, N.; Guenot, D.; Lehmann, M.; Vauchelles, R.; Martin, S.; Lelong-Rebel, I.; et al. RNA Aptamers Targeting Integrin $\alpha 5 \beta 1$ as Probes for Cyto- and Histofluorescence in Glioblastoma. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2019**, *17*, 63–77.

Dalia EL ARAWI

Doctorat : Matériaux, Mécanique, Optique, Nanotechnologie

Année 2019

Étude de l'adhérence de cellules individuelles par nanoscopie de fluorescence

Les nouvelles techniques d'imagerie super-résolue ont considérablement facilité l'étude des interactions cellule/substrat. L'obtention d'une résolution axiale nanométrique est un paramètre clé pour analyser l'adhérence. Ainsi, j'ai développé un nouveau dispositif va-TIRFM (microscopie de fluorescence par réflexion totale interne à angle variable) à deux longueurs d'onde. Cette technique consiste à enregistrer une série d'images TIRF en augmentant l'angle d'incidence. Pour déterminer avec précision cet angle, j'ai développé une procédure de calibration simple et robuste. Un rapide traitement d'image permet de reconstruire la topographie de la membrane cellulaire avec une résolution axiale nanométrique et d'extraire la distribution spatiale de l'indice effectif du cortex cellulaire. Pour caractériser l'adhérence j'ai fait un double seuillage sur la hauteur et l'indice afin d'identifier les zones d'interactions spécifiques et non-spécifiques. Le va-TIRF peut également être utilisé pour extraire le potentiel d'interaction membrane/substrat. J'ai ainsi étudié l'adhérence des cellules gliales sur la fibronectine. J'ai montré un changement d'organisation de leurs points focaux d'adhérence et une modification de leur énergie de liaison, sous l'action d'antagonistes connus des intégrines $\alpha 5 \beta 1$ et $\alpha v \beta 3$ et d'inhibiteurs du cytosquelette. Ces résultats montrent que l'énergie est un paramètre clé pour quantifier l'adhérence des cellules et l'action de différentes molécules.

Mots clés : biophysique – nanophotonique – microscopie de fluorescence – cellules, adhésivité – molécules d'adhésivité cellulaire – intégrines – intégrines, antagonistes.

Single Cell Adhesion Explored by Quantitative Fluorescence Nanoscopy

Understanding how cells interact with surfaces has been considerably facilitated by innovative super-resolution imaging. Achieving a nanometric axial resolution is the keystone to decipher adhesion process. For this purpose, I developed a new setup of variable-angle Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (va-TIRFM) including two excitation wavelengths. va-TIRFM involves the recording of several TIRF images at different incident angles. A simple yet robust calibration method is used to accurately evaluate the incident angle. A straight forward data processing can restore cell topography with a nanometric axial resolution. Moreover, I can extract the effective refractive index distribution of the cellular cortex. By combining cell membrane topography and refractive index distribution, I was able to identify areas of specific and non-specific interactions. va-TIRFM can also be used to extract the potential energy profile related to membrane/substrate interactions, which reflects an adhesion energy. I used this technique to study glioblastoma cells in adhesion on fibronectin. By blocking the adhesion signaling pathways using well-known $\alpha 5 \beta 1$ and $\alpha v \beta 3$ integrin antagonists and cytoskeleton inhibitors, I showed a change in focal adhesion organization, followed by a change in adhesion energy. These results prove that this energy is the key parameter to quantify cellular adhesion and the influence of different molecules.

Keywords: biophysics – nanophotonics – fluorescence microscopy – cell adhesion – cell adhesion molecules – integrins – integrins antagonists.

Thèse réalisée en partenariat entre :

