
Etude de l'influence du temps de polymérisation de l'actine sur les forces de traction cellulaire

Mathieu de Goër de Herve

30 Juin 2013

Table des matières

1 Informations générales	1
2 Sujet du stage	2
3 Travail effectué	4
4 Bilan personnel et conclusion	6

1 Informations générales

Le laboratoire MSC, rattaché au CNRS et à l'université Paris VII Denis Diderot, est un laboratoire de physique se voulant transdisciplinaire ; les chercheurs y travaillent sur trois axes de recherche : la physique non linéaire, la physique de la matière molle, et l'interface physique-biologie. Le laboratoire s'intéresse particulièrement à l'aspect sciences naturelles de la physique, et étudie des phénomènes de dimensions « humaines » plutôt que l'infiniment grand ou l'infiniment petit.

L'équipe dans laquelle j'ai fait mon stage est rattachée à l'axe physique-biologie, et s'intéresse à la physique de la mécano-sensibilité à l'échelle de cellules isolées : il s'agit de se demander comment les cellules perçoivent leur environnement mécanique, par une approche physique plutôt que par l'approche biochimique « usuelle ». Elle est actuellement composée d'un permanent (Atef Asnacios, professeur d'université en physique) et deux doctorantes en physique (Nathalie Bui et Pauline Durand). J'ai également bénéficié de l'aide d'Alain Richert, de l'équipe d'accompagnement à la recherche du laboratoire, pour mes cultures de cellules.

2 Sujet du stage

L'origine des recherches sur les mécanismes de sensibilité des cellules vient de tentatives de greffes de cellules souches : il s'agissait de greffer des cellules souches sur des tissus nécrosés, l'objectif étant que les cellules souches saines se développent en remplaçant les cellules mortes.

Ces tentatives ont échoué, car il s'est avéré que les cellules greffées subissaient le processus d'apoptose, c'est-à-dire mouraient plutôt que de se développer. L'une des hypothèses expliquant cela était que les cellules ressentaient la rigidité de leur environnement, et donc ne se développaient pas sur des tissus morts, dont la rigidité est bien plus élevée que pour les tissus vivants.

Des expériences sont venues conforter cette hypothèse. D'abord, une équipe a montré que les cellules se déplaçaient préférentiellement vers les milieux durs plutôt que vers les milieux mous. Plus spectaculaire encore, une équipe a cultivé des cellules souches sur des substrats mimant la rigidité de certains milieux (cerveau, os, muscles,...). Il s'est avéré que les cellules se développaient différemment en fonction de la rigidité du milieu observé : sur un substrat mimant la rigidité du cerveau, elles devenaient des neurones, sur un substrat mimant un muscle, elles se sont développées en myoblastes,...!^{1 2} Par conséquent, il est devenu clair que les cellules percevaient la rigidité. La question qui s'est alors posée est : comment ?

L'explication dominante est actuellement biochimique : les cellules adhèrent à leur milieu par le biais de gros complexes protéiques appelés "complexes d'adhésion", auxquelles sont rattachés les filaments d'actine qui véhiculent la force dans la cellule. Lorsque le substrat sur lequel est placée la cellule est dur, donc indéformable, la tension des filaments d'actine tire sur les complexes et « débobine » certaines des protéines qui les composent, libérant ainsi des sites réactionnels qui étaient jusqu'alors inaccessibles. Lorsque le substrat est mou, la tension des filaments d'actine déforme le substrat plutôt que les complexes, et les sites restent inaccessibles. Les réactions chimiques qui déroulent de l'accessibilité ou non à ce site détermineraient alors la réaction de la cellule et son activité, notamment mécanique : les réactions en chaîne causeraient une augmentation de la tension générée dans le cytosquelette cellulaire.^{3 4}

Plutôt que de faire appel à des processus chimiques extrêmement complexes, l'équipe dans laquelle j'ai fait mon stage a essayé de décrire le phénomène de mécano-sensibilité d'un point de vue purement mécanique, comme une adaptation de charge de la machinerie cellulaire :

- Tout d'abord, elle a construit un appareil permettant d'étudier la façon dont une cellule unique réagit à une variation de rigidité en temps réel. Elle a ainsi montré que les cellules réagissent à une variation de rigidité de façon quasi-instantanée (temps de réponse inférieur à 0,1s), sur des temps très inférieurs à ceux des processus chimiques (de l'ordre de la minute) pouvant intervenir dans la cellule.
- En étudiant l'étalement de cellules sur un substrat rigide, et plus particulièrement l'apparition des complexes d'adhésion qui permettent à la cellule de s'attacher à une surface, l'équipe s'est rendue compte que ces derniers apparaissent à partir d'un angle de contact bien défini, à savoir 90°. Cela tend à montrer que la force exercée par la cellule est en fait la projection de la tension du cortex d'acto-myosine. Cela donne également une explication physique aux deux régimes d'étalement des cellules, « P1 » et « P2 », précédemment identifiés par d'autres équipes.
- Pour vérifier cette hypothèse, la même expérience a été réalisée avec des cellules droguées à la Latrunculine, une drogue qui, à faible dose, ralentit l'étalement de la cellule. L'équipe s'est aperçue que l'apparition des complexes d'adhésion était indépendante de la cinétique d'étalement et ne dépendait que de la géométrie de la cellule. Ces résultats tendent à renforcer les résultats précédents : l'origine de l'adaptation des forces de traction cellulaire est bien mécanique et non chimique (si les processus avaient une origine chimique, la cinétique d'étalement aurait un rôle important dans l'apparition des complexes).

1. Engler A, et al. (2004) Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness : Pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J Cell Biol* 166 :877-887.

2. Engler A, Sen S, Sweeney H, Discher D (2006) Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126 :677-689.

3. Riveline D, et al. (2001) Focal contacts as mechanosensors : Externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol* 153 :1175-1186.

4. Balaban N, et al. (2001) Force and focal adhesion assembly : A close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol* 3 :466-472.

- Elle a également drogué les cellules à la blebbistatine, une drogue qui bloque les moteurs de myosine. Dans cette situation, les complexes d'adhésion s'avèrent moins développés que dans la situation normale : ainsi, c'est la force développée par le mécanisme acto-myosine qui est à l'origine du développement des complexes d'adhésion et non l'inverse.
- L'équipe a également mis en parallèle la mesure des forces exercées par des cellules prises entre deux plaques avec l'étude géométrique de la forme de la cellule. Elle a montré que les forces commencent à être exercées lorsque l'angle de contact entre les cellules et les lamelles dépasse 90° . Ces résultats vont, encore une fois, dans le sens des précédents.
- Enfin, elle a mis en parallèle ces mesures de force avec l'observation de l'apparition des complexes. Elle s'est rendu compte que la cellule commence à exercer des forces avant que les complexes d'adhésion ne se développent.

Tous ces résultats sont cohérents entre eux, et tendent à montrer que ce sont les processus mécaniques et géométriques (déformation du cortex d'acto-myosine) qui contrôlent la réaction de la cellule à son environnement et sont à l'origine des processus chimiques internes, plutôt que les processus chimiques locaux qui influent sur la forme de la cellule et les forces qu'elle exerce : la forme globale de la cellule détermine les processus locaux et non l'inverse. Les phénomènes biochimiques interviennent à cause de et après les phénomènes mécaniques.

Dans ce contexte, l'objectif de mon stage était d'étudier l'influence de la vitesse d'étalement de la cellule sur les forces exercées. Si, comme supposé, c'est bien la géométrie de la cellule qui détermine les forces qu'elle exerce sur son environnement, alors on devrait trouver la même force maximale développée par la cellule quelle que soit cette vitesse, tandis l'augmentation de la force devrait y être proportionnelle (elle diminuerait en même temps que la vitesse d'étalement).

Pour étudier cela, l'idée est de mesurer les forces exercées par une cellule droguée à la Latrunculine (qui perturbe la polymérisation de l'actine donc fait diminuer la vitesse d'étalement de la cellule).

3 Travail effectué

L'idée générale de mon travail était d'utiliser un système de mesure de forces déjà existant et de comparer les mesures de forces faites sur des cellules de rats (fibroblastes ref52) aux mesures faites sur ces mêmes cellules mais ayant baigné dans une solution de Latrunculine A avant manipulation. Des travaux sur l'étalement de cellules précédemment réalisés au laboratoire ont montré que pour des valeurs suffisamment faibles de concentration en Latrunculine A, l'étalement des cellules est ralenti sans que leur structure ne soit altérée.

Le principe de l'appareil est extrêmement simple : une cellule est placée entre deux lames de verre, l'une étant souple et l'autre rigide. La cellule, en s'étalant sur les lamelles, va tirer dessus : la rigide ne se déforme pas, tandis que la souple est défléchie vers la lamelle rigide. La déformation de la lamelle souple est proportionnelle à la force de traction exercée par la cellule (la lamelle se comporte comme un ressort – dont on aura auparavant mesuré la raideur).

En réalité, l'appareil utilisé est un peu plus compliqué et réalise un double asservissement sur les positions des deux lamelles, permettant de mimer n'importe quelle raideur, allant d'une raideur nulle à l'infini (figure 1).

- Si l'on décide de maintenir en place la pointe de la lamelle souple, sur laquelle tire la cellule, en déplaçant sa base, la cellule force sur la pointe mais sans parvenir à la déplacer : elle « voit » une raideur infinie. On peut néanmoins mesurer la force qu'elle exerce, qui est proportionnelle à la déflexion de la lamelle (ce qu'on ne pourrait pas faire avec un système de raideur réellement « infinie »)
- à l'inverse, on peut également maintenir la position de la lamelle souple en rapprochant la lamelle rigide lorsque la cellule essaie de tirer. Dans ce cas, la cellule se contracte sans parvenir à exercer de force, et ressent une raideur nulle.
- En combinant les deux asservissements, on parvient à faire ressentir à la cellule n'importe quelle valeur de raideur (figure 3).

Dans la pratique, toutes les mesures que j'ai réalisées ont été faites en situation de raideur infinie : cela permet de s'assurer que les forces exercées par la cellule et la vitesse d'augmentation de ces forces sont maximales.

Le profil de force typique que l'on observe lors de l'étalement d'une cellule sur des lamelles est le suivant (figure 2) :

- Une première phase où la force exercée augmente peu, correspondant à l'étalement rapide de la cellule sur les lamelles, avec changement de courbure.
- Une deuxième phase lors de laquelle la force augmente beaucoup plus rapidement, tandis que l'étalement est plus lent (une fois que les angles de contact avec les lamelles ont dépassé 90°)
- Une troisième phase où l'étalement sature. La valeur de la force exercée atteint alors un plateau. Ce sont les valeurs de vitesse d'augmentation de force (2^e phase) et de force plateau (3^e phase) qui nous intéressent.

La première partie de mon travail a consisté à apprendre à me servir du système permettant de mesurer les forces de traction :

- En apprenant, d'abord, à fabriquer les micro-lamelles souples utilisées pour saisir une cellule et mesurer les forces de traction qu'elle exerce : Il s'agit de lamelles de verre étirées pour les rendre extrêmement minces (de l'ordre de quelques μm), et fixées au bout de capillaires déformés et adaptés au microscope.
- Ensuite, en calibrant ces lamelles : il est nécessaire de connaître la rigidité des lamelles que l'on utilise (de l'ordre de quelques $\text{nN}/\mu\text{m}$). Pour cela, on place contre une lamelle de référence – de rigidité connue – la lamelle que l'on souhaite calibrer, et on déplace la lamelle de référence de façon à ce qu'elle appuie sur la lamelle à calibrer. Le coefficient de proportionnalité entre le déplacement imposé à la lamelle de référence et le déplacement effectif de cette même lamelle donne accès à la raideur de la lamelle à mesurer.

(Tout cela est fait sous microscope, les positions des lamelles étant contrôlées par un vernier et des cristaux piézoélectriques)

- Enfin, en mesurant les forces exercées par les cellules : les cellules sont déposées au fond d'une cuve, il faut donc aller les saisir au fond avant qu'elles ne s'y accrochent, le soulever, et les maintenir ensuite entre deux lamelles, sur lesquelles elles s'étalent. L'étalement des cellules est filmé, et on mesure en continu la déformation de la lamelle souple en situation de raideur infinie. Une fois les acquisitions réalisées, on accède à la force exercée par la cellule en multipliant cette déformation par la raideur de la lamelle souple, et on relève la force plateau ainsi que la vitesse d'augmentation de force en deuxième phase.
- J'ai également appris les manipulations de base de culture de cellules (repiquage des cellules), nécessaires pour avoir des échantillons à tester, et donc l'utilisation des outils associés.

Enfin, une fois l'appareil maîtrisé, j'ai réalisé des séries de mesures de force sur des cellules droguées ou non à la Latrunculine. Néanmoins, faute de temps et suite à des problèmes de culture cellulaire (contamination et/ou mutation de mes cellules – nous n'avons pas vraiment été capables de le savoir précisément), je n'ai pas pu réaliser assez de mesures pour que les résultats soient statistiquement significatifs.

Les résultats que j'ai obtenus sont les suivants :

- Pour des fibroblastes ref52 non drogués, on mesure une force plateau F_p de 126 ± 54 nN et une vitesse d'augmentation de force dF/dt de $0,26 \pm 0,09$ nN.s⁻¹
- Pour des fibroblastes ref52 drogués à la Latrunculine, on mesure une force plateau F_p de 120 ± 89 nN et une vitesse d'augmentation de force dF/dt de $0,13 \pm 0,04$ nN.s⁻¹

On retrouve bien les résultats attendus : la force plateau développée par les cellules est identique dans les deux cas, mais la vitesse d'augmentation des forces est plus faible (elle est divisée par deux, ce qui correspond aux résultats observés sur des étalements) ; cela va dans le sens d'un contrôle géométrique plutôt que chimique de la force exercée par la cellule.

Néanmoins, ces résultats ont été obtenus pour des échantillons statistiques trop faibles (seulement trois cellules droguées, et six non droguées !) pour pouvoir être réellement convaincants : plutôt que de valider l'hypothèse, ils suggèrent plutôt la validité de l'expérience, qui devrait être refaite avec plus d'échantillons. Par ailleurs, il y a également des doutes au sujet de la viabilité des cellules mesurées (qui présentent globalement, en plus d'une apparence étrange, signe de contamination et/ou de mutation, des niveaux de force globalement assez faibles par rapport à ce que l'on pourrait attendre – typiquement, on s'attend à une force plateau plus proche de 300 nN).

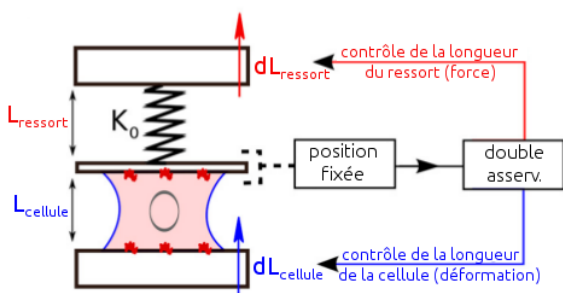


FIGURE 1 – principe de l'appareil

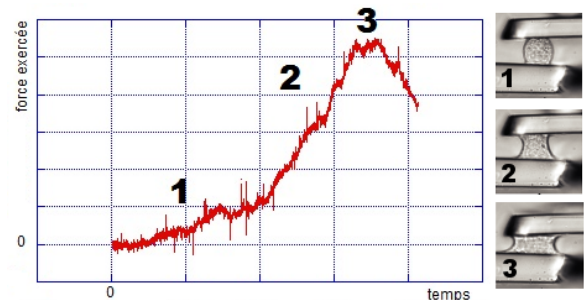


FIGURE 2 – courbe de force type

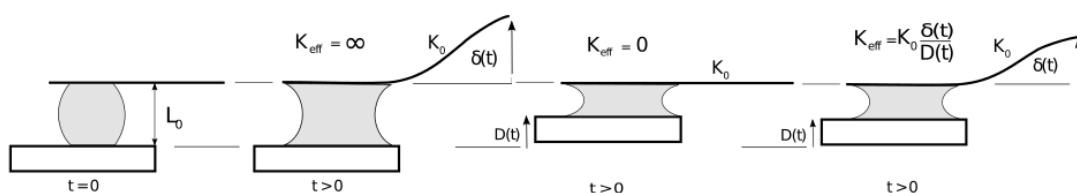


FIGURE 3 – Les différents cas de simulation de raideur

4 Bilan personnel et conclusion

La première conclusion que je peux tirer de ce stage, c'est qu'il m'a permis de voir à quoi ressemble le milieu de la biophysique, auquel je ne connaissais rien, et plus particulièrement de la mécanique cellulaire.

Ce stage m'a également permis de voir de plus près ce qu'est une « vraie » expérience de recherche, sur un appareil de mesure difficile à maîtriser (il m'a fallu deux semaines pour arriver à faire mes premières mesures), ce que je trouve assez stimulant.

J'ai également appris à manipuler sous microscope, ce qui s'avère nettement plus délicat à faire que lorsqu'on voit directement les objets que l'on manipule.

Il m'a également appris qu'une manipulation peut ne pas marcher, et parfois pour des raisons sur lesquelles il est difficile d'avoir un effet : l'une des doctorantes de mon équipe, en voyant les problèmes que j'ai eu avec mes cellules, m'a dit avoir été bloquée pendant six mois pour des raisons similaires, et que ses expériences avaient recommencé à marcher sans qu'elle n'ait réellement compris pourquoi. Le nombre de raisons pour lesquelles une manipulation peut échouer était, ici, assez élevé (cellules qui s'étalent mal, qui décrochent prématurément, débris cellulaires passant devant le capteur et faisant lâcher l'asservissement,...), et il fallait s'attendre à avoir un certain nombre de manipulations inexploitable.

Une autre remarque que je peux faire, c'est que j'aurais difficilement pu avoir une meilleure démonstration de l'importance des incertitudes et des statistiques en recherche : en effet, travailler sur des systèmes biologiques mène à énormément de variance et à des erreurs standards très élevées : ils ne s'agit pas de mesurer une grandeur ayant une « vraie » valeur ici, mais plutôt de voir le comportement global d'une population dans laquelle il existe une énorme variabilité (en taille et en comportement des cellules notamment).

Mon équipe d'accueil étant en train d'essayer de faire publier un article alors que j'étais là, j'ai également pu voir de plus près comment se déroule ce genre de procédures.

Enfin, ce stage m'a permis, plus globalement, de voir comment cela se passe au sein d'un laboratoire et d'une équipe de recherche, où plusieurs projets proches évoluent en parallèle et échangent les uns avec les autres.