



HAL
open science

Rôle de l'Inflammation sur la Rhéologie des Cellules Présentatrices d'Antigène : Perspectives pour l'Activation du Lymphocyte T

Nathalie Bui

► **To cite this version:**

Nathalie Bui. Rôle de l'Inflammation sur la Rhéologie des Cellules Présentatrices d'Antigène : Perspectives pour l'Activation du Lymphocyte T. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris Diderot, 2014. Français. NNT: . tel-01131751

HAL Id: tel-01131751

<https://hal.science/tel-01131751>

Submitted on 15 Mar 2015

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.

UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT
Laboratoire Matière et Systèmes Complexes

THÈSE
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT
Spécialité : Physique
École Doctorale : Matière condensée et interfaces (ED 518)

Rôle de l'Inflammation sur la Rhéologie des Cellules Présentatrices d'Antigène : Perspectives pour l'Activation du Lymphocyte T

Présentée par
NATHALIE BUFI

Soutenue le 24 Septembre 2014 devant le Jury composé de :

Marie-Pierre VALIGNAT	Rapportrice
Jérôme DELON	Rapporteur
Michael DUSTIN	Examineur
Abdul BARAKAT	Examineur
Atef ASNACIOS	Directeur
Claire HIVROZ	Co-directrice

Inch'allah

- Proverbe Universel -

Remerciements

Ces trois années, c'était avant tout une histoire humaine fondatrice, intense et foisonnante, d'une richesse sans égal.

Parce que l'infini Professeur Atef Asnacios et l'immense Claire Hivroz : leur temps, leur présence, leur soutien, leurs conseils, leur bienveillance, leur écoute, leur patience, leur intelligence, leur infaillible intégrité, leur implacable rigueur, parce que toute cette éblouissante science qu'ils m'ont transmise. Parce que tous les jours leur existence m'aide à être un meilleur moi, parce que ce qu'ils sont restera toujours une source d'inspiration.

Parce que Michael Saïtakis, le partage des longues heures de fabrication des gels, et son implication dans ce projet commun.

Parce que l'illustre Alain Richert et sa bienheureuse maniaquerie, sa bouffonnerie délicate, ses livres que l'on retrouve un matin sur son bureau et qui tombent si juste, parce que ses peintures, parce que sa prose et sa poésie. Parce qu'Alain Richert, c'est comme de la savonnette mouillée : ça sent bon mais c'est très difficile à attraper.

Parce qu'Oscar Buschinger, armé de sa fraîcheur candide et de son application obstinée, a consacré la fin de son stage aux mesures sur les cellules Jurkat. Parce que l'Institut Curie aussi, parce que Stéphanie Dogniaux, et Armelle Bohineust ont toujours été disponibles pour combler mes immenses lacunes en biologie, et ont si généreusement donné de leur temps pour la préparation des cellules.

Parce que Pauline Durand-Smet, Elisabeth Charrier, Lorraine Montel, Luc Deike, Kelly Aubertin, Clément Vulin, Sham Tlili, et David Pereira, avec qui les échanges, discussions, repas et autres petits bouts de quotidien ont été le ciment de ces trois années. Parce que Nicolas Chevalier aura bientôt élucidé les mystères de l'AFM.

Parce que la généreuse Sophie Asnacios, son rhéomètre à air comprimé, son savoir-faire et ses conseils précieux. Parce que Cyprien Gay, le fédérateur, qui accueille au grand sourire une petite discussion autour d'un petit modèle. Parce que l'irremplaçable Booboo et son inépuisable bonne humeur, ses chansons, sa science et sa caverne d'Ali-Baba. Parce qu'Olivier Cardoso, son flegme curieux et ses collants de vélo. Parce que Sandra Lerouge et son indignation féconde.

Parce que Julien Browaey, Olivier Morisseau et Charlotte Py, avec qui enseigner fut une délicieuse friandise. Parce que Professeur Sylvie Hénon, son sourire espiègle et

ses espiègeries. Parce que Professeur François Gallet, et ses efforts considérables pour faire de l'UFR de physique un endroit où il fait bon travailler.

Parce que Laurent Réa, toujours disponible pour un petit bricolage improvisé, toujours le grand sourire. Parce que Carole Barrache, Nadine Beyer, Sarah Seymoun et Lucie Bouchu, et leur administrariat remarquable.

Parce qu'Amscha Proag, et ses discussions inépuisables, infinies et éternelles. Parce que Maruxa Estevez, sa retenue pudique débordant de gentillesse. Parce que Raul Celestrino-Teixeira, son ouverture d'esprit sans limites, son unicité, et surtout sa patience dans le partage du quotidien. Parce que Caroline Wilson cette insatiable curieuse, éternelle émerveillée, inépuisable vivante.

Parce que Jonathan Fouchard.

Table des matières

Remerciements	I
Avant-propos	1
1 Mise en situation	5
1.1 Contexte immunologique	9
1.1.1 Immunologie générale	9
1.1.2 Supports cellulaires de la réponse immunitaire	16
1.1.3 Activation du lymphocyte T : un échange intense de cellule à cellule	20
1.1.4 Le lymphocyte T : l'orchestrateur de la réponse immunitaire adaptative	27
1.2 Mécanique cellulaire	31
1.2.1 Forme, force, raideur, adhésion : définitions	31
1.2.2 Éléments d'architecture cellulaire	34
1.2.3 Éléments de rhéologie cellulaire	44
1.2.4 Mécano-sensibilité cellulaire	50
1.3 Mécanique cellulaire et immunité, du dialogue entre mécanique et biologie	63
1.3.1 Activation du LT et mécanique cellulaire	63
1.3.2 Mécanique cellulaire, pathologie et immunité	73
1.4 Conclusions et objectifs de la thèse	77
2 Mesure des propriétés mécaniques de cellules présentatrices d'antigène et lymphocytes T	81
2.1 Le rhéomètre à cellule unique (ou dispositif à microplaques)	85
2.1.1 Dispositif expérimental	85
2.1.2 Les différents tests effectués	86
2.2 Mesure des propriétés mécaniques de différentes cellules présentatrices d'antigène	92
2.2.1 Préparatifs à l'expérience	92
2.2.2 Résultats expérimentaux	93
2.3 Propriétés mécaniques du lymphocyte T	100
2.4 Macrophages : de faibles propriétés contractiles	106
2.5 Conclusions du chapitre et perspectives	109
3 L'inflammation modifie les propriétés mécaniques des cellules présentatrices d'antigène	111
3.1 $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$ diminue la rigidité cellulaire	115

3.1.1	Effet sur les cellules dendritiques	115
3.1.2	Effet sur les macrophages	118
3.1.3	Discussion	121
3.2	l'IFN γ induit une rigidification globale	123
3.2.1	Effet sur les macrophages	123
3.2.2	Effet sur les cellules dendritiques	126
3.2.3	Discussion	127
3.3	Le LPS affecte peu la rigidité cellulaire	131
3.3.1	Effet sur les macrophages	132
3.3.2	Effet sur les cellules dendritiques	133
3.3.3	Discussion	136
3.4	Effet des cytokines sur le comportement adhésif des macrophages . . .	137
3.5	Conclusions du chapitre et perspectives	139
4	Tentatives d'interprétation	147
4.1	Rôle de la myosine II dans les propriétés mécaniques des cellules dendritiques et macrophages	151
4.1.1	L'inhibition de la myosine II diminue la rigidité cellulaire	151
4.1.2	Quantification de l'expression de la myosine et de son activité dans les cellules présentatrices d'antigène	157
4.2	Rôle de l'actine dans les propriétés mécaniques des cellules présentatrices d'antigène	162
4.2.1	Densité d'actine corticale	162
4.2.2	Densité d'actine corticale et rigidité cellulaire	164
4.2.3	Densité d'actine corticale et volume cellulaire	168
4.3	Conclusions du chapitre et perspectives	171
5	Influence de la rigidité du substrat sur l'activation du lymphocyte T	175
5.1	Fabrication de gels de polyacrylamide	179
5.1.1	Polyacrylamide : généralités	179
5.1.2	Etapes critiques de la fabrication	180
5.1.3	Mesure des propriétés mécaniques des gels	181
5.2	Résultats préliminaires	186
5.3	Discussion et perspectives	191
5.3.1	Commentaires sur le protocole de fabrication et la méthode de mesure	191
5.3.2	Commentaires sur les résultats préliminaires	193
	Conclusion	197
	A Calibration des lamelles	203
	B Analyse mécanique dynamique	205
B.1	Principe	205
B.2	Implémentation	206
B.2.1	Etalonnage du capteur	206
B.2.2	Extraction de données à partir des images	207
B.2.3	Analyse des signaux sinusoïdaux	208

C	Densité d'actine corticale et volume cellulaire	209
C.1	Densité d'actine corticale	209
C.2	Volume cellulaire	210
D	Protocole de fabrication des gels de polyacrylamide	211
Index	217
Bibliographie	219

Avant-propos

Ce manuscrit rassemble les travaux d'une thèse ayant pour ambition de jeter un pont entre physique et immunologie. Nous parlons ici d'une physique particulière, la biophysique, ou plus précisément sa sous-discipline, la biomécanique cellulaire, qui s'attache à caractériser la matière sur laquelle repose la biologie. Cette science, qui s'est développée au cours des dernières années, et qui est en partie inspirée de la physique de la matière molle, de la physico-chimie et de la physique de systèmes complexes, apporte un éclairage complémentaire aux perspectives habituelles de la biologie.

En effet, les questionnements de ces physiciens autour de la matière vivante ont permis de montrer que la nature mécanique de l'environnement, ou un stimulus mécanique, peuvent infléchir les processus métaboliques des cellules aussi cruciaux que la différenciation ou la mort cellulaire programmée. En immunologie, un phénomène particulier semble mettre en jeu de tels mécanismes que l'on appelle mécano-sensibilité : l'activation du lymphocyte T. Il s'agit de l'étape initiale au cours de laquelle une catégorie particulière de cellules, les lymphocytes T, reçoivent un certain nombre de signaux de la part de cellules que l'on appelle cellules présentatrices d'antigène, contenant une information très précise au sujet de l'agent pathogène à éliminer. Suite à ce dialogue, les lymphocytes T vont se différencier massivement pour mettre en place la réponse immunitaire adaptative, c'est à dire des actions (cellulaires et/ou moléculaires) visant à éliminer l'agent pathogène précisément désigné par les cellules présentatrices.

Le dialogue entre lymphocyte T et cellule présentatrice myéloïde permettant l'activation nécessite un contact cellulaire stable et prolongé entre les deux cellules, au cours duquel se forme ce qu'on appelle la synapse immune : un agencement de protéines de surface particulier, support d'une signalisation intense, qui provoque des changements très profonds des lymphocytes T. La formation de cette synapse dépend très fortement des molécules impliquées dans la mécanique cellulaire, et nous savons désormais que le lymphocyte T est capable d'exercer des forces lors du processus d'activation. Au début de cette étude, nous avons donc pour ambition de comprendre les modalités de cette mécano-sensibilité du lymphocyte T, et de ses implications lors de l'activation. Nous avons cherché à apporter des réponses aux questions suivantes : les cellules présentatrices d'antigène myéloïdes ont-elles des propriétés mécaniques différentes ? Si oui, la rigidité de la cellule présentatrice influence-t-elle la formation de la synapse immune, et le dialogue cellulaire qui en découle ?

Pour répondre à la première question, nous avons mesuré les propriétés mécaniques des cellules présentatrices d'antigène, après ou sans traitements par certains facteurs inflammatoires, à l'aide d'un dispositif permettant d'effectuer des mesures mécaniques

(ce qu'on appelle rhéologie) à échelle de la cellule unique, développé il y a quelques années par l'équipe d'Atef Asnacios. Suite à cela, un chercheur post-doctorant, Michael Saïtakis, a rejoint le projet, et grâce à lui nous avons pu tenter d'identifier les supports structurels moléculaires à l'origine des variations de rigidité que nous avons identifiées. C'est ensuite dans un effort commun que Michael Saïtakis et moi avons tenté de répondre à la seconde question. Nous avons travaillé ensemble à la mise au point d'un protocole expérimental permettant la fabrication d'hydrogels mous, mimant les rigidités des cellules présentatrices d'antigène, en associant mes compétences en rhéologie à celles de Michael en biologie cellulaire. La mise en oeuvre de ces gels pour étudier la mécano-sensibilité du lymphocyte T à l'activation est en cours, et nous en présenterons les premiers résultats préliminaires.

Le manuscrit est donc organisé en cinq parties. Tout d'abord, nous présenterons le contexte général de l'étude, en s'attachant à fournir au lecteur de chaque communauté (physicien ou immunologiste) les clés nécessaires pour comprendre les enjeux et les perspectives de la discipline complémentaire à la sienne pour cette étude. Nous exposerons ensuite les arguments issus de la littérature permettant de supposer la mécano-sensibilité du lymphocyte T.

Une deuxième partie sera consacrée à la description du dispositif expérimental, et à la présentation des résultats des mesures de mécanique cellulaire sur trois types de cellules présentatrices myéloïdes : monocytes, cellules dendritiques et macrophages ; ainsi que deux types de lymphocytes T : des lymphocytes T primaires directement issus de sang humain ($CD4^+$), et une lignée cellulaire communément utilisée comme modèle de laboratoire des lymphocytes T primaires : les cellules Jurkat. Nous nous attarderons ensuite un peu sur les propriétés contractiles des macrophages, que nous tenterons de mettre en rapport avec leur fonction phagocytaire.

Dans le troisième chapitre, nous présenterons comment trois facteurs inflammatoires : $TNF\alpha+PGE_2$, $IFN\gamma$ et le LPS, peuvent influencer les propriétés mécaniques des cellules présentatrices d'antigène. Nous verrons à quel point cette information est importante, car elle dévoile une propriété cellulaire supplémentaire susceptible d'évoluer en fonction des conditions inflammatoires.

Nous tenterons d'apporter des explications en terme moléculaire aux différences de rigidité observées dans la quatrième partie, qui comportera de nombreux résultats obtenus par Michael Saïtakis.

Enfin, le cinquième chapitre rapportera la mise au point du protocole expérimental pour la fabrication d'hydrogels mous, ainsi que les résultats préliminaires obtenus après activation des lymphocytes T par culture sur ces gels.

Je vous en souhaite une très bonne lecture.

CHAPITRE 1

Mise en situation

Sommaire

1.1	Contexte immunologique	9
1.1.1	Immunologie générale	9
1.1.2	Supports cellulaires de la réponse immunitaire	16
1.1.3	Activation du lymphocyte T : un échange intense de cellule à cellule	20
1.1.4	Le lymphocyte T : l'orchestrateur de la réponse immunitaire adaptative	27
1.2	Mécanique cellulaire	31
1.2.1	Forme, force, raideur, adhésion : définitions	31
1.2.2	Éléments d'architecture cellulaire	34
1.2.3	Éléments de rhéologie cellulaire	44
1.2.4	Mécano-sensibilité cellulaire	50
1.3	Mécanique cellulaire et immunité, du dialogue entre mécanique et biologie	63
1.3.1	Activation du LT et mécanique cellulaire	63
1.3.2	Mécanique cellulaire, pathologie et immunité	73
1.4	Conclusions et objectifs de la thèse	77

Ce chapitre s'attache à fournir les connaissances nécessaires à la compréhension du problème posé et des motivations qui ont conduit à la réalisation de cette thèse. Or il s'agit ici de faire dialoguer deux communautés : celles des biologistes spécialisés en immunologie, et celle des physiciens spécialistes du vivant, et plus précisément des phénomènes mécaniques intervenant à l'échelle cellulaire.

Aussi nous a-t-il fallu fournir pour chacune des communautés les bases nécessaires pour comprendre les problématiques de l'autre. C'est pourquoi une première partie est dédiée à une description très globale du système immunitaire humain. Cette partie n'a aucunement l'ambition d'établir un état de l'art précis sur l'activation du lymphocyte T, mais plutôt de présenter le contexte immunologique global dans lequel cette activation a lieu, afin que les physiciens qui liront ce manuscrit puissent appréhender le sens de cette étude, et accéder aux connaissances minimales pour pouvoir replacer les résultats qui suivront dans leur contexte fonctionnel.

Nous parlerons ensuite de mécanique cellulaire, et tenterons de décrire les évidences expérimentales de la mécano-sensibilité cellulaire ainsi que l'importance des propriétés mécaniques des cellules elles-mêmes dans le fonctionnement de l'organisme. Tout comme la première partie reprend les bases de l'immunologie, nous reviendrons dans cette seconde partie sur des définitions fondamentales de mécanique, qui, loin de constituer un précis de rhéologie, ont pour objectif de permettre au lecteur d'apprécier les arguments physiques développés tout au long de l'étude.

Enfin, nous passerons en revue les différents indices permettant de supposer une mécano-sensibilité du lymphocyte T lors de son activation par les cellules présentatrices d'antigène. Nous verrons également dans cette dernière partie comment l'inflammation est susceptible de modifier les propriétés mécaniques des cellules présentatrices. Ceci nous conduira aux principaux objectifs de cette thèse : déterminer si les cellules présentatrices d'antigène myéloïdes possèdent des rigidités différentes, modulées ou non par des conditions inflammatoires, et identifier si ces différences mécaniques suffisent à moduler l'activation du lymphocyte T.

1.1 Contexte immunologique

1.1.1 Immunologie générale

Le corps humain est un lieu de villégiature très convoité par de nombreux organismes : les nutriments y sont abondants, et il y règne une température stable et favorable aux échanges biochimiques. Chaque jour, nombre d'entre eux essaient d'y pénétrer, de s'y installer et de détourner la machinerie biologique à leur profit. Au cours des millénaires s'est alors développé un système de défense permettant de trier parmi les intrus et de lutter contre ceux qui compromettent le bon fonctionnement de l'organisme.

Ce système hautement complexe rassemble de nombreux acteurs cellulaires et tissulaires désignés par le terme de système immunitaire, dont les modes d'action sont très variés. L'ensemble de ces mécanismes d'action hautement intégrés sont regroupés sous le terme d'immunité.

L'immunité remplit quatre fonctions principales : la reconnaissance immunologique, c'est à dire la capacité à détecter la présence d'un agent microbien au sein de l'organisme ; la lutte contre l'infection, c'est à dire la limitation ou la destruction des souches infectieuses ; la tolérance immunitaire, qui vise à s'assurer que les modalités de destruction ne se retournent pas contre l'organisme lui-même (ce qui, le cas échéant, est désigné par le terme très médiatisé de maladie auto-immune) ; et la mémoire immunitaire, qui permet à un individu infecté par un pathogène de répondre plus efficacement si une nouvelle infection par ce même pathogène se produit.

Classiquement, on divise les mécanismes permettant de remplir les fonctions immunitaires en deux catégories : l'immunité innée et l'immunité adaptative. Nous allons voir que ces deux types d'immunité sont en fait intimement imbriqués, et menés en parallèle. La multiplicité des modes d'action qui en découlent est telle qu'elle nécessite de nombreux dialogues cellulaires et fait intervenir des processus de régulation très complexes. Loin d'en proposer une description exhaustive, nous allons nous concentrer sur les mécanismes fournissant le cadre contextuel de notre étude : l'inflammation et l'activation du lymphocyte T.

Immunité innée, immunité adaptative

Immunité innée et adaptative séparent de manière conceptuelle des modes d'action semblables selon qu'ils sont dirigés de manière indifférenciée contre tout pathogène, ou ciblés sur un agent pathogène unique et précisément identifié.

L'immunité innée désigne les mécanismes mis en place de façon indifférenciée contre un pathogène lorsqu'il pénètre dans l'organisme. Un des mécanismes les plus spectaculaires en est la phagocytose, c'est à dire l'internalisation de particules ou micro-organismes par des cellules spécialisées - les phagocytes - et leur dégradation dans des vacuoles très acides appelées phagosomes [Aderem & Underhill, 1999] (figure 1.1). On regroupe également sous le terme d'immunité innée l'élimination de cellules infectées ou

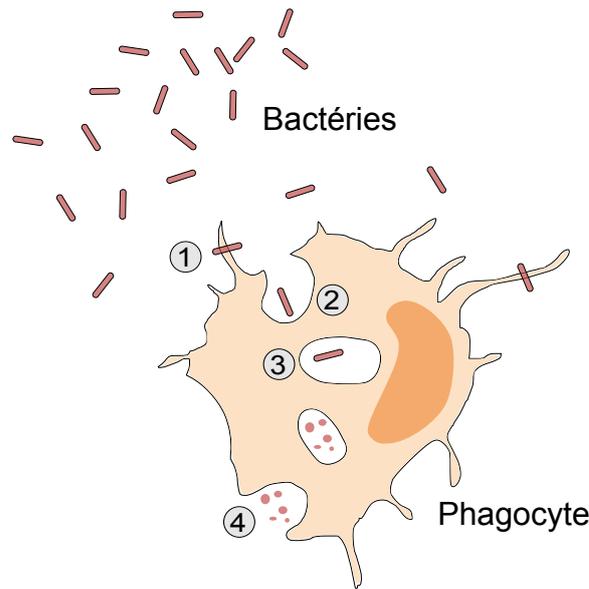


FIGURE 1.1 – **Phagocytose d'une bactérie par un phagocyte** 1) Les récepteurs du phagocyte détectent la bactérie 2) Internalisation de la bactérie 3) Formation du phagosome et dégradation du pathogène 4) Élimination des débris phagocytaires par exocytose.

tumorales par les cellules NK (cellules lymphoïdes responsables de la cytotoxicité non spécifique), et des facteurs moléculaires comme la cascade du complément, qui permet la neutralisation d'agents pathogènes et déclenche leur phagocytose (figure 1.2).

On ne retrouve **L'immunité adaptative** que chez les vertébrés. Elle consiste en une action spécifiquement ciblée contre une infection par un pathogène préalablement identifié. Elle permet de concentrer les ressources de l'organisme sur l'élimination d'un type de pathogène particulier et d'apporter ainsi une réponse plus efficace contre l'agent pathogène.

L'immunité adaptative repose sur des interactions moléculaires permettant la reconnaissance spécifique d'un antigène, soit par les récepteurs des lymphocytes T et B (que l'on appelle TCR et BCR pour T et B Cell Receptor respectivement), soit par un anticorps. Les anticorps, également appelés immunoglobulines, ont la propriété remarquable de se lier de façon très spécifique à une molécule complémentaire, l'antigène, présente à la surface des cellules infectées ou des agents microbiens. Leur structure très particulière permet une fonction duale. Une région variable constitue le lieu de fixation et d'identification de l'antigène, tandis qu'une région est commune à tous les anticorps (région constante), ce qui permet aux agents du système immunitaire de les reconnaître et leur confère leurs fonctions effectrices [Helm *et al.*, 1996] (figure 1.3). Ainsi, un anticorps soluble peut servir d'opsonine spécifique pour un antigène donné et déclencher sa phagocytose par des cellules de l'immunité innée ; tandis que les anticorps transmembranaires (ou le récepteur du lymphocyte B, BCR) permettent aux cellules effectrices de la réponse adaptative de reconnaître leur cible. Chaque anticorps est capable de se lier à un nombre très restreint d'antigènes : cette propriété remarquable

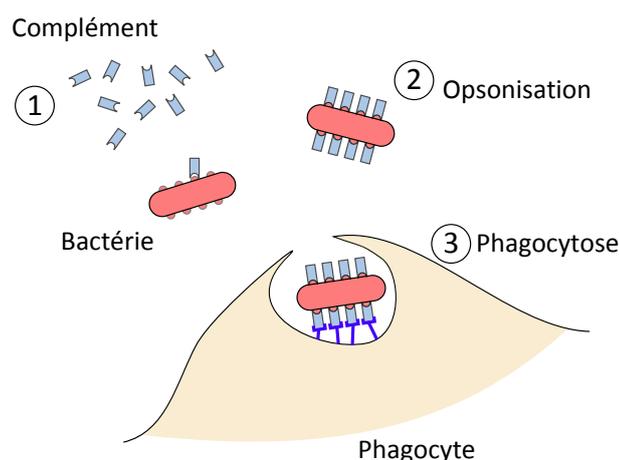


FIGURE 1.2 – **Exemple d’opsonisation** : une bactérie est recouverte par des molécules solubles (ici le complément), ce qui la neutralise. Un phagocyte reconnaît les molécules du complément à la surface de la bactérie, ce qui permet de déclencher la phagocytose du microbe.

d’affinité sélective est la base sur laquelle se construit l’immunité adaptative.

Réponse inflammatoire

Le terme d’inflammation reviendra souvent dans ce manuscrit. Il désigne un ensemble de réactions locales mises en place pour contenir une infection ou une lésion [Medzhitov, 2008]. Lorsqu’un micro-organisme parvient à traverser une des parois épithéliales (peau, intestin, parois alvéolaires), sa présence est détectée par des cellules "sentinelles" d’origine myéloïde [Mekori & Metcalfe, 2000]. Ces cellules vont sécréter des protéines particulières, des cytokines et des chimiokines, pour recruter du renfort et organiser la réponse : c’est la phase d’alerte [Svanborg *et al.* , 1999].

Cytokines et chimiokines sont des petites protéines qui se ressemblent. Cependant, leur rôle diffère : les cytokines sont des messagers en charge d’orchestrer l’action cellulaire locale ; tandis que les chimiokines sont pourvues d’un rôle chemo-attractant permettant un recrutement efficace des cellules et molécules du système immunitaire sur le lieu de l’infection [Kunkel & Butcher, 2002], [Ono *et al.* , 2003].

La sécrétion des cytokines et chimiokines a par ailleurs un effet vasoactif : elle induit une augmentation du volume sanguin, une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité capillaire. C’est la phase vasculaire. Ce sont ces effets qui sont responsables des rougeurs, gonflement et échauffements que l’on observe sur une plaie ou une piqûre (figure 1.4). Ces perturbations vasculaires facilitent l’arrivée des molécules et cellules de l’immunité responsables de la phase effectrice : elles appliquent alors leurs mécanismes de défense moléculaires et cellulaires pour éliminer l’infection (opsonisation, phagocytose, cytotoxicité).

Si l’infection persiste, une réponse inflammatoire chronique se met en place. Cer-

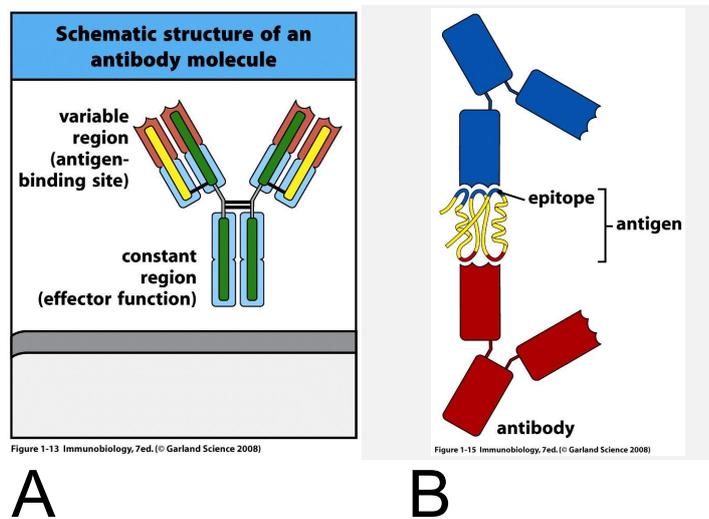


FIGURE 1.3 – Les Anticorps possèdent une structure très particulière, intimement liée à leur fonction. A) Le fragment variable permet la reconnaissance spécifique de l'antigène, tandis que le fragment constant confère toutes les propriétés effectrices : il est reconnu par les cellules du système immunitaire, qui déclenchent ensuite phagocytose ou cytotoxicité. B) Un anticorps possède un épitope unique, c'est à dire qu'il n'est capable de reconnaître qu'un motif précis qu'il peut rencontrer parmi un nombre très restreint d'antigènes. Cependant un antigène présente généralement plusieurs épitopes : il est possible que plusieurs anticorps soient capables de s'y lier. Image tirée de [Janeway *et al.*, 2009]

taines cytokines, comme le $\text{TNF}\alpha$ dont nous parlerons plus loin, sont susceptibles d'acquies une fonction endocrine lorsqu'elles sont produites à une concentration suffisante, ce qui leur permet d'agir sur plusieurs organes différents : on parle alors de réponse systémique. La moelle osseuse et le foie, respectivement responsables de la fabrication des cellules et des molécules de l'immunité, sont alors sollicités, et le système nerveux central provoque des réponses globales : fièvre, tachycardie, hyperventilation [Tracey, 2002]. Lorsque le danger est écarté, suit enfin une phase de réparation où les lésions et les dommages tissulaires sont résorbés, passant par l'intervention de signaux anti-inflammatoires.

Quelques cytokines particulières

Lors de ce travail de thèse, nous avons étudié l'effet de quelques uns de ces messagers inflammatoires sur les propriétés mécaniques globales de certaines cellules myéloïdes. En voici la liste accompagnée de leurs propriétés principales :

- **L'interféron gamma ($\text{IFN}\gamma$)** est une cytokine sécrétée majoritairement par certains lymphocytes T et les cellules NK, et dans une moindre mesure par les lymphocytes B et les cellules présentatrices d'antigène (monocytes, macrophages, cellules dendritiques, cf paragraphe 1.1.2). Son action principale est la stimulation des macrophages, qui accroissent alors leurs facultés de présentation d'antigène, leur activité lytique et leur sécrétion cytokinique. L' $\text{IFN}\gamma$ est aussi impliqué dans le recrutement cellulaire de la réponse inflammatoire, en stimulant la sécrétion de chemo-attractants des cellules de la réponse adaptative, ainsi que la production de molécules d'adhésion nécessaires au recrutement des lymphocytes [Schroder *et al.* , 2004a]. Par ses fonctions multiples, l' $\text{IFN}\gamma$ est un véritable orchestrateur moléculaire de la réponse inflammatoire.
- **Le facteur de nécrose tumorale alpha ($\text{TNF}\alpha$)** est initialement sécrété par les macrophages et mastocytes primo-arrivants sur le site infectieux. Le signal est ensuite amplifié par certains lymphocytes T. Ses effets sont multiples, et dose-dépendants [Pfeffer, 2003]. A faible dose, il permet l'adhésion des leucocytes sur l'endothélium, et la sécrétion de chimokines par les macrophages et les cellules endothéliales. Lorsque sa concentration devient suffisamment élevée, il agit au niveau systémique. Il stimule la production de certaines protéines inflammatoires par le foie, comme la protéine C réactive qui apparaît dans les bilans sanguins. Il accélère également l'hématopoïèse¹ et joue sur le système nerveux central. Cependant, si sa concentration devient trop importante, il est responsable du choc septique. Celui-ci peut aller jusqu'à provoquer une chute brutale de la pression artérielle, le plus souvent suivie de la mort de l'individu [Levine *et al.* , 1990].
- **La prostaglandine E2 (PGE2)** est une petite molécule dérivée de l'acide arachidonique. Elle promeut la vasodilatation et le recrutement massif de neu-

1. L'hématopoïèse est le processus de fabrication de leucocytes à partir de cellules souches dans la moelle osseuse. Ce processus est détaillé au chapitre 1.1.2.

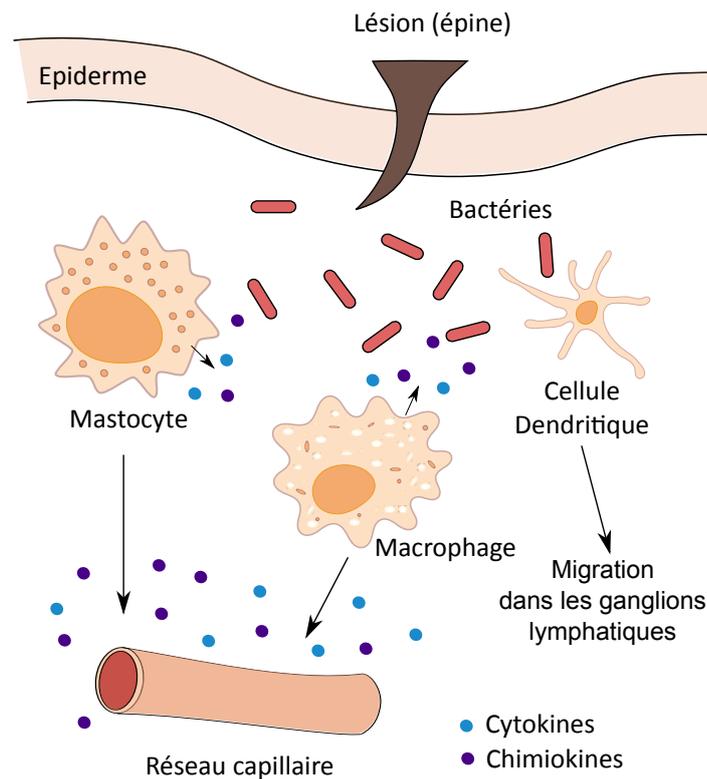


FIGURE 1.4 – **Réaction inflammatoire précoce.** Lorsqu’une partie de la paroi épithéliale est lésée, les neutrophiles, mastocytes, macrophages et cellules dendritiques sont les premiers arrivés sur le lieu de l’infection. Dès la détection de présence de bactéries, les mastocytes sécrètent des cytokines et chimiokines, qui ont un effet sur le réseau capillaire : vasodilatation, ralentissement de l’écoulement sanguin, augmentation de la perméabilité capillaire. Ces conditions sont nécessaires pour permettre le recrutement de renforts. Les macrophages les assistent dans cette opération, tout en exerçant une activité phagocytaire ; tandis que les cellules dendritiques migrent vers les ganglions lymphatiques pour activer l’immunité adaptative. Cytokines et chimiokines inflammatoires sont ainsi au coeur de l’orchestration des réponses immunitaires innées et adaptatives. Image adaptée de [Espinosa & Chillet, 2010].

trophiles, de redoutables phagocytes à la durée de vie très courte, arrivant massivement dès les premières minutes d'une infection. Mais elle est surtout connue pour son action sur les cellules dendritiques : en présence d'IL1 et de $\text{TNF}\alpha$, elle promeut la maturation des cellules dendritiques et leur migration aux ganglions lymphatiques [Kalinski, 2012], [Guermontprez *et al.*, 2002]. Son rôle est néanmoins controversé, car elle est capable d'actions immuno-stimulatrices comme inhibitrices, et la compréhension des mécanismes sous-jacents n'est pas encore totale à ce jour.

- Enfin, nous nous sommes intéressés au **lipopolysaccharide (LPS)**, une longue molécule se trouvant sur la paroi des bactéries gram-négatives. Ce n'est pas une cytokine, dans le sens où ce n'est pas une molécule sécrétée par une cellule du corps humain dans un but de signalisation, mais elle revêt néanmoins un rôle de messenger. Sa présence est directement reconnue par les phagocytes et déclenche immédiatement la phagocytose. Le LPS peut également être présenté par les cellules endothéliales tapissant les vaisseaux sanguins pour signaler un problème dans un tissu sous-jacent et contribuer ainsi au recrutement leucocytaire.

Nous sommes loin d'avoir énuméré toutes les cytokines mises en jeu lors d'une réponse inflammatoire, qu'elle soit aiguë ou chronique. Mais cet aperçu laisse à voir que la voie cytokinique inflammatoire permet de réguler des effets très divers, à la fois localement et à l'échelle de l'organisme : elle est un des piliers du dialogue entre réponse innée et réponse adaptative [Luster, 2002].

Initation de la réponse adaptative

La réponse adaptative, nous l'avons vu, est une arme extrêmement efficace contre l'invasion d'un pathogène. Mais comme toute arme puissante, il convient d'en sécuriser l'accès. Dans le corps humain, la réponse adaptative n'est déclenchée qu'après l'activation du lymphocyte T. Cette cellule, autour de laquelle gravite notre étude, peut être définie comme le véritable chef d'orchestre de l'immunité adaptative. Comme nous le verrons dans le paragraphe 1.1.4, il organise les réponses cellulaires pour mettre en place des stratégies homologues à celles de l'immunité innée - opsonisation, cytotoxicité, phagocytose - mais mettant en jeu cette fois des cellules lymphoïdes exprimant des récepteurs très spécifiques, agissant par conséquent de façon circonscrite contre des cibles bien déterminées.

L'activation du lymphocyte T s'effectue par l'intermédiaire de cellules présentatrices d'antigène d'origine myéloïde. Ce sont des cellules qui sont capables de digérer un pathogène et d'en présenter des fragments - les antigènes - à leur surface. Lorsqu'elles rencontrent le lymphocyte T possédant le TCR complémentaire², un dialogue intense s'établit, qui influence le devenir du lymphocyte T (voir paragraphe 1.1.3.). Certaines, comme les cellules dendritiques, sont capables de migrer jusqu'aux organes lymphoïdes et patrouiller parmi les cellules présentes jusqu'à la rencontre avec le bon lymphocyte T! Dans cette étude, et nous verrons plus loin pourquoi, nous nous sommes penchés

2. Nous reviendrons sur les détails moléculaires de la présentation antigénique au paragraphe 1.1.3

sur les modifications des propriétés mécaniques des cellules présentatrices d'antigène myéloïdes en milieu inflammatoire. Prenons donc le temps de faire plus ample connaissance avec celles qui vont nous accompagner tout au long de ce manuscrit.

1.1.2 Supports cellulaires de la réponse immunitaire

Hématopoïèse : généalogie des cellules présentatrices d'antigène

Toutes les cellules du système immunitaire, que l'on regroupe sous le terme de leucocytes, prennent naissance dans la moelle osseuse. Elles dérivent toutes d'une cellule souche particulière, la cellule souche hématopoïétique. La différenciation de cette cellule souche, que l'on appelle hématopoïèse, donne lieu à deux lignées distinctes : la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde (figure 1.5).

La lignée myéloïde se divise à son tour en deux sous-lignées : la lignée monocyttaire, dans laquelle figurent les monocytes, macrophages et cellules dendritiques, sur laquelle porte notre étude ; et la lignée granulocytaire, comprenant neutrophiles, éosinophiles et basophiles, que nous ne mentionnerons pas davantage. Quand à la lignée lymphoïde, elle contient comme son nom laisse le deviner tous les lymphocytes : lymphocytes T, lymphocytes B et cellules NK [Espinosa & Chillet, 2010].

L'emprunt de telle ou telle voie de différenciation dépend de signaux dispensés par des cellules de la moelle osseuse, les cellules stromales, qui sont transmis soit *via* des interactions membranaires, soit *via* des facteurs solubles [Zhu & Emerson, 2002]. Il est possible de reproduire certaines de ces voies de différenciation par l'ajout *in vitro* de ces facteurs, pourvu que la dose et le moment soient bien choisis. C'est cette technique qui nous a permis d'obtenir des cellules présentatrices d'antigène myéloïdes à partir de progéniteurs extraits de sang humain (cf chapitre 2.2.1). Cependant, parmi toutes les cellules obtenues par hématopoïèse, seules certaines ont des fonctions présentatrices d'antigène, et nous allons maintenant détailler les caractéristiques de celles qui nous ont occupés pendant cette étude.

Monocytes

Les monocytes sont des leucocytes d'assez petite taille (environ $7\mu\text{m}$ de diamètre) que l'on trouve essentiellement dans le sang. Ils sont principalement phagocytaires, mais sont également capables de présentation d'antigène. En laboratoire, il est facile de les isoler à partir de sang humain car ils présentent à leur surface un marqueur spécifique, le CD14. Très mobiles, ils migrent rapidement vers les tissus où ils se différencient en macrophages ou en cellules dendritiques selon les cytokines présentes [Espinosa & Chillet, 2010]. Ils constituent donc une réserve de cellules dendritiques et macrophages neufs, se tenant à disposition pour rejoindre n'importe quel lieu d'infection le plus rapidement possible. Ainsi, en extrayant des monocytes directement à partir de sang de donneurs sains, sommes-nous capables de produire, *in vitro* au laboratoire, des cellules dendritiques et macrophages aux caractéristiques semblables aux cellules différenciées *in vivo* à partir des mêmes monocytes [Ancuta *et al.*, 2000; Andreesen & Kreutz, 1994] (voir paragraphe 2.2.1).

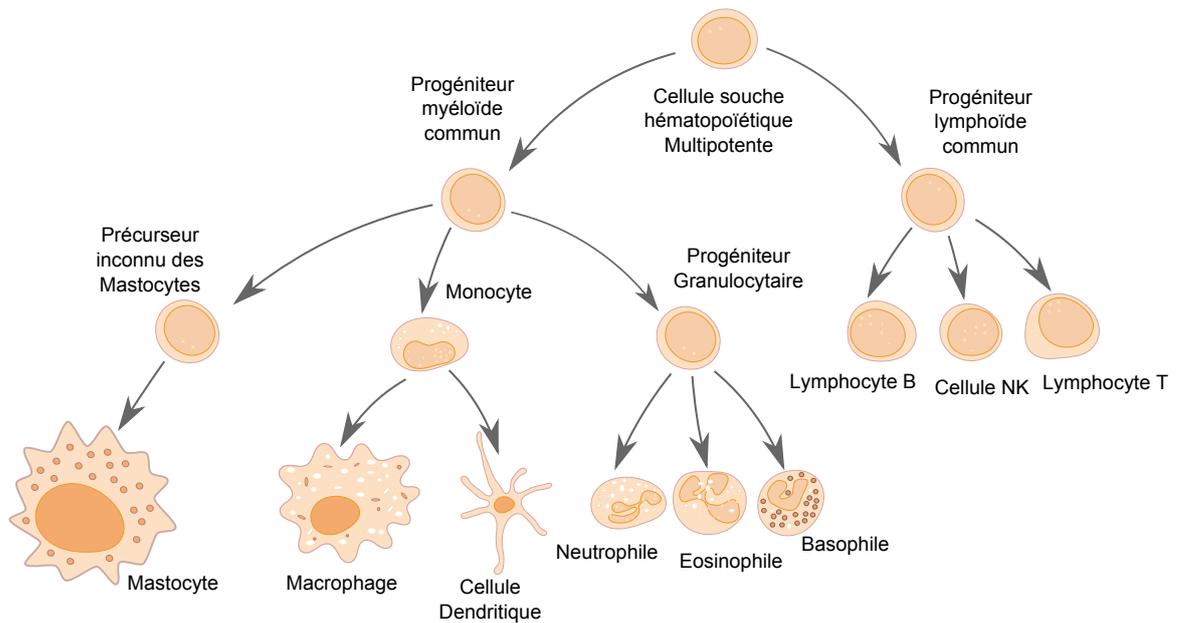


FIGURE 1.5 – **Hématopoïèse**. Toutes les cellules du système immunitaire sont issues d'une cellule souche résidant dans la moelle osseuse : la cellule souche hématopoïétique. Deux voies de différenciation principales peuvent être distinguées : la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde. On retrouve dans la lignée lymphoïde les lymphocytes T, B et la cellule tueuse NK. La lignée myéloïde est plus vaste, et contient la lignée monocyttaire (monocytes, macrophages et cellules dendritiques), et la lignée granulocytaire. C'est également à la lignée myéloïde qu'appartiennent les mastocytes, et on y trouve aussi les progéniteurs des érythrocytes (globules rouges) et des plaquettes, non représentés ici par souci de clarté.

Macrophages

Les macrophages sont beaucoup plus gros que les monocytes (environ $17\mu\text{m}$), et leur surface est très irrégulière. Ils sont les phagocytes professionnels et multi-tâches. Leur appareil de Golgi est très actif, ce qui leur permet de fabriquer en grande quantité les enzymes du phagosome ainsi que les cytokines inflammatoires. Ils expriment de nombreux récepteurs à leur surface capables de reconnaître des fragments bactériens comme le LPS, ou de lier des opsonines (anticorps ou complément). On les trouve principalement résidant dans les tissus, où ils phagocytent débris, résidus apoptotiques, ou micro-organismes. Une fois activés, notamment en présence d' $\text{IFN}\gamma$, ils deviennent présentateurs d'antigène et sont capables d'entamer un dialogue intense avec une sous-population de lymphocytes T effecteurs, les lymphocytes Th^3 , participant à l'amplification et la régulation de la réponse adaptative initiée par les cellules dendritiques [Unanue, 1984; Janeway *et al.*, 2009].

3. voir paragraphe 1.1.4

Cellules Dendritiques

On reconnaît les cellules dendritiques à leur forme étoilée et irrégulière, de taille moyenne ($11\mu\text{m}$ environ). Résidentes dans les tissus conjonctifs, la peau et les muqueuses, elles sont capables d'ingérer à peu près n'importe quel type de pathogène et d'en exposer des fragments à leur surface sous forme d'antigène. Elles possèdent notamment de nombreux récepteurs viraux pour favoriser l'entrée des virus dans leur cytoplasme. Pour n'importe quel autre type cellulaire, faciliter autant l'entrée des virus serait du suicide. Mais les cellules dendritiques détournent les stratégies virales et digèrent les virus en fragments pour permettre la présentation massive d'épitopes viraux [Janeway *et al.* , 2009]. Ce sont de véritables activatrices professionnelles et des présentatrices d'antigène très efficaces [Cella *et al.* , 1997], [Banchereau & Steinman, 1998]. En effet, la rencontre avec le pathogène cumulée à la présence de cytokines comme $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$ déclenche leur maturation au cours de laquelle elles changent de forme et se hérissent de dendrites (figure 1.6) [Rieser *et al.* , 1997]. Elles entament alors une migration vers les organes lymphoïdes où résident les lymphocytes T naïfs, qu'elles sont les seules à pouvoir sensibiliser [Liwski *et al.* , 2006]. On le voit donc ici : les cellules dendritiques n'ont pas à proprement parler de rôle effecteur de la réponse immunitaire, dans le sens où elles ne sont pas directement impliquées dans les mécanismes immuns (elles ne sont capables ni de phagocytose, ni de sécrétion d'anticorps, ni de sécrétion de molécules cytotoxiques). Ce sont plutôt des messagers responsables de l'alerte qui permettra de mettre en place l'immunité adaptative dans toute son efficacité.

Lymphocyte B

Le lymphocyte B est le support de la réponse adaptative humorale, c'est à dire la sécrétion d'anticorps solubles. A l'état quiescent, il est de petite taille : environ $7\mu\text{m}$ de diamètre [Chapman *et al.* , 1981]. On le trouve résidant dans la périphérie des ganglions lymphatiques, mais aussi circulant dans le sang et la lymphe. Comme pour le lymphocyte T, chaque lymphocyte B présente à sa surface un récepteur spécifique d'un antigène donné que l'on appelle BCR. Il s'agit en fait d'une molécule de structure identique aux anticorps, mais possédant un domaine transmembranaire lui permettant son ancrage à la surface du lymphocyte B. Son activation est déclenchée par la liaison à la membrane du BCR avec l'antigène complémentaire, mais nécessite l'intervention d'un type de cellules T effectrices sans lesquelles l'activation n'a pas lieu. Une fois activé, le lymphocyte B va proliférer massivement et se différencier en plasmocyte qui a pour fonction la sécrétion massive d'anticorps. Les anticorps solubles vont agir pour à la fois neutraliser le pathogène, faciliter sa phagocytose après opsonisation, et activer le système du complément [Janeway *et al.* , 2009].

Les cellules présentatrices, hautement sensibles à leur environnement

Parmi les cellules présentatrices énumérées, nous venons de voir que chacune d'entre elles est capable de répondre à des stimuli de type inflammatoire qui engendrent une modification de leur phénotype : les monocytes rejoignent les tissus pour s'y différencier, les macrophages deviennent plus phagocytaires, améliorent leurs capacités lytiques, sécrètent d'avantage de cytokines et costimulent les lymphocytes Th ; quand aux cellules dendritiques, elles changent radicalement de phénotype pour acquérir leur statut de

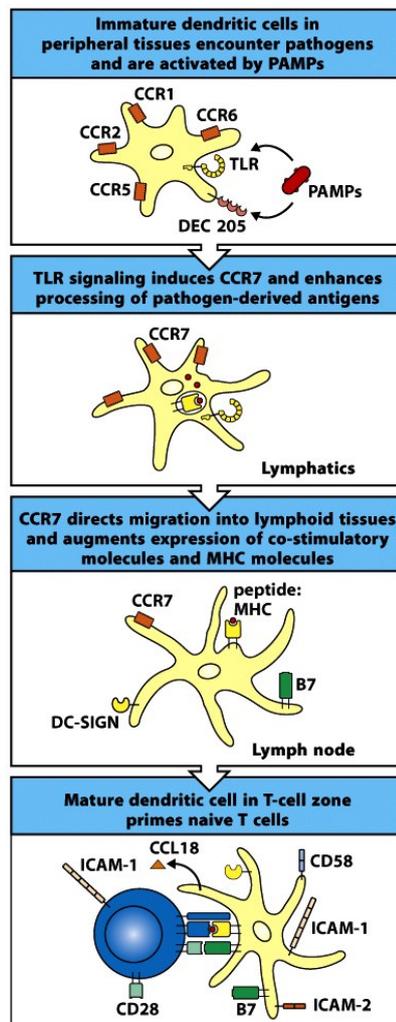


Figure 8-14 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

FIGURE 1.6 – **Mâturation des cellules dendritiques** : Les cellules dendritiques ingèrent la quasi-totalité des pathogènes qu’elles rencontrent et en présentent des fragments à leur surface. En fonction des signaux présents, elles peuvent changer de phénotype et migrer vers les organes lymphoïdes pour activer les cellules T naïves. Source : [Janeway *et al.* , 2009].

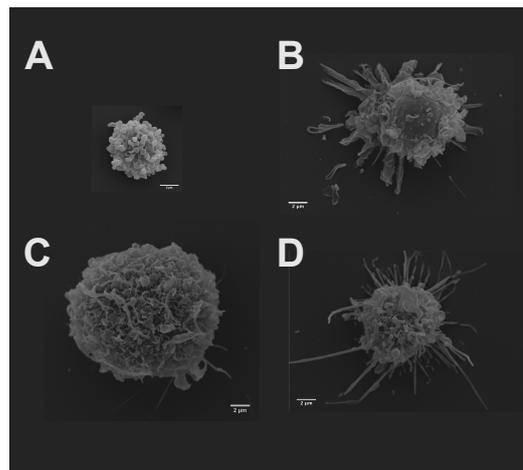


FIGURE 1.7 – **Cellules présentatrices d’antigène.** Clichés de cellules présentatrices d’antigène obtenues par microscopie à balayage. A) Monocyte ; B) Cellule dendritique immature ; C) Macrophage ; D) Cellule dendritique mature. La variété de leur morphologies est frappante. Clichés de M. Saïtakis, U932, Institut Curie.

cellules présentatrices professionnelles.

Par ailleurs, sur la figure 1.7, la variété de leur taille et de leur morphologie est frappante. Leur morphologie est notamment susceptible d’être modifiée par des conditions inflammatoires : le cas des cellules dendritiques est spectaculaire ! Là est le point de départ de notre étude : ces différences morphologiques influencent-elles la nature du dialogue établi avec le lymphocyte T ? Sont-elles les témoins de propriétés mécaniques différentes ? Ces propriétés mécaniques sont-elles susceptibles d’être affectées par des conditions inflammatoires ? Cela influence-t-il le dialogue entre lymphocyte T et cellule présentatrice ? Telles sont les questions auxquelles nous avons consacré notre travail. Mais avant d’apporter des éléments de réponse, intéressons-nous de plus près à la nature du contact établi entre lymphocyte T et cellule présentatrice d’antigène, ainsi qu’à ses conséquences sur le lymphocyte T et la mise en place de la réponse adaptative.

1.1.3 Activation du lymphocyte T : un échange intense de cellule à cellule

Présentation d’antigène : détails moléculaires

Une fois détecté et ingéré, l’antigène est morcelé à l’intérieur de la cellule présentatrice et les fragments ainsi obtenus sont couplés à des molécules transmembranaires que le lymphocyte T peut reconnaître : les molécules du complexe majeur d’histocompatibilité (CMH) (figure 1.8) [Schwartz *et al.* , 1979; Allen, 2007; Babbitt *et al.* , 1985]. Les molécules du complexe majeur d’histocompatibilité liées au peptide antigénique sont reconnues par un complexe à la surface du lymphocyte T : le récepteur du lymphocyte T (ou TCR pour T Cell Receptor). Comme les anticorps, le TCR est composé d’un domaine constant et d’un domaine variable. Le domaine variable constitue le site de fixation du complexe CMH-peptide, et il est unique pour chaque lymphocyte T : c’est cette unicité qui fonde le principe de l’immunité adaptative.

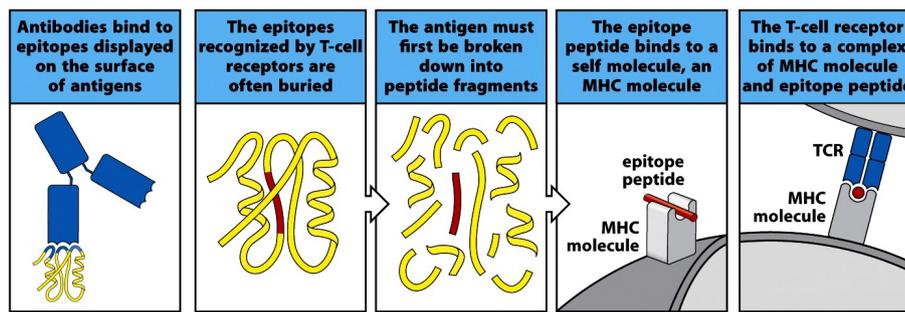


Figure 1-16 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

FIGURE 1.8 – **Supports moléculaires de la présentation antigénique.** Les anticorps générés aléatoirement se lient à des antigènes. Le TCR a la caractéristique particulière de se lier à un épitope unique, qui est souvent enfoui au sein de l’antigène. Les cellules présentatrices se chargent de digérer l’antigène et d’en présenter des fragments peptidiques au sein des molécules du CMH. La reconnaissance allostérique du complexe CMH-peptide par le TCR déclenche l’activation du lymphocyte T. Figure tirée de [Janeway *et al.* , 2009].

Cependant, le TCR ne possède pas de domaine cytoplasmique fonctionnel : sa seule présence ne suffit pas à déclencher des cascades de signalisation intracellulaires. Il est toujours couplé à un autre complexe appelé CD3 [Smith-Garvin *et al.* , 2009], dont la présence est nécessaire à l’activation du lymphocyte T et permet la transduction du signal. De nombreux co-stimulateurs se groupent également autour du TCR pour permettre l’amplification du signal [Saito *et al.* , 2010; Liwski *et al.* , 2006] (figure 1.9).

Lorsque le contact est établi, et sous certaines conditions de changement de conformation et de ségrégation des TCRs sur lesquelles nous reviendrons plus loin ; les molécules transmembranaires de la zone de contact se réorganisent, et forment des agrégats appelés micro-clusters, nécessaires pour déclencher la signalisation précoce amont à l’activation du lymphocyte T [Irvine *et al.* , 2002]. Cette zone de contact très structurée, dynamique, à la durée de vie étendue et aux fonctions essentielles a été dénommée synapse immune, en référence aux synapses neurologiques, bien qu’elles diffèrent autant par leur nature que par leur fonction.

La synapse immune

La synapse immune, une fois arrivée à maturation est organisée en structures concentriques (figure 1.10). L’organisation spatiale des anneaux successifs ainsi que les protéines qui s’y trouvent ont été identifiées par Monks *et al.* [1998]. La région centrale, aussi désignée par le nom de complexe d’activation supramoléculaire central (cSMAC) abrite le TCR et des protéines co-activatrices. On trouve dans la première couronne, appelée également complexe d’activation supramoléculaire périphérique (pSMAC), la protéine LFA1, qui est une intégrine, c’est à dire qu’elle appartient à une classe de protéines transmembranaires qui relie l’environnement extérieur de la cellule aux éléments mécaniques internes de la cellule sur lesquelles nous reviendrons plus tard (paragraphe 1.2.2). La seconde couronne, que l’on nomme par complexe d’activation supramoléculaire distal (dSMAC), abrite des molécules encombrantes comme CD43 et CD45 qui sont exclues de la zone de contact, et est également une zone de

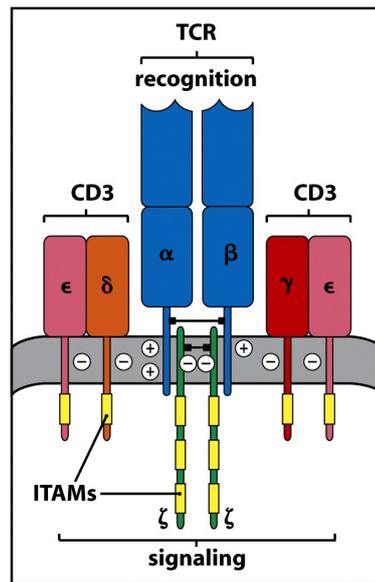


Figure 6-10 Immunobiology, 7ed, (© Garland Science 2008)

FIGURE 1.9 – **TCR et co-stimulateurs.** Le TCR seul ne permet pas de transmettre un signal. Il se lie au complexe transmembranaire CD3, ainsi qu'à une protéine transmembranaire majoritairement cytosolique appelée chaîne ζ . CD3 et chaîne ζ présentent des sites de phosphorylation (ITAMs), points de départ de la cascade de signalisation. Figure tirée de [Janeway *et al.* , 2009].

haute mobilité membranaire [Dustin *et al.* , 2010].

L'assemblage de toutes ces protéines de signalisation est un procédé complexe répondant à une cinétique déterminée [Grakoui *et al.* , 1999]. Leur concentration au sein de la synapse immune autorise un dialogue très précis entre un lymphocyte et une cellule présentatrice, qui dure plusieurs heures. De nombreuses molécules de signalisation intracellulaires interagissent avec les domaines cytoplasmiques des complexes transmembranaires présents. Le fait de les rassembler en un lieu d'échange unique et intense permet d'intégrer et de moduler la réponse de façon très fine en fonction des signaux des molécules présentes à la surface de la cellule présentatrice.

Signalisation précoce

La signalisation sous-jacente à la synapse immune est éminemment complexe, et induit des changements d'activité cellulaire (métabolisme, cycle cellulaire, remodelage du cytosquelette, induction de l'expression de gènes). Il est désormais admis que la signalisation induite par l'engagement du TCR n'est pas un événement linéaire, mais consiste plutôt en des processus de régulation complexes, rétroagissant à de nombreuses étapes [Smith-Garvin *et al.* , 2009]. Nous n'en proposerons pas une description exhaustive ici, mais nous nous devons toutefois de mentionner les quelques protéines principales qui interviendront plus tard dans nos expériences et discussions.

Le premier événement suivant la détection de l'antigène spécifique est la phosphorylation des chaînes cytoplasmiques du CD3. Les mécanismes permettant l'initiation

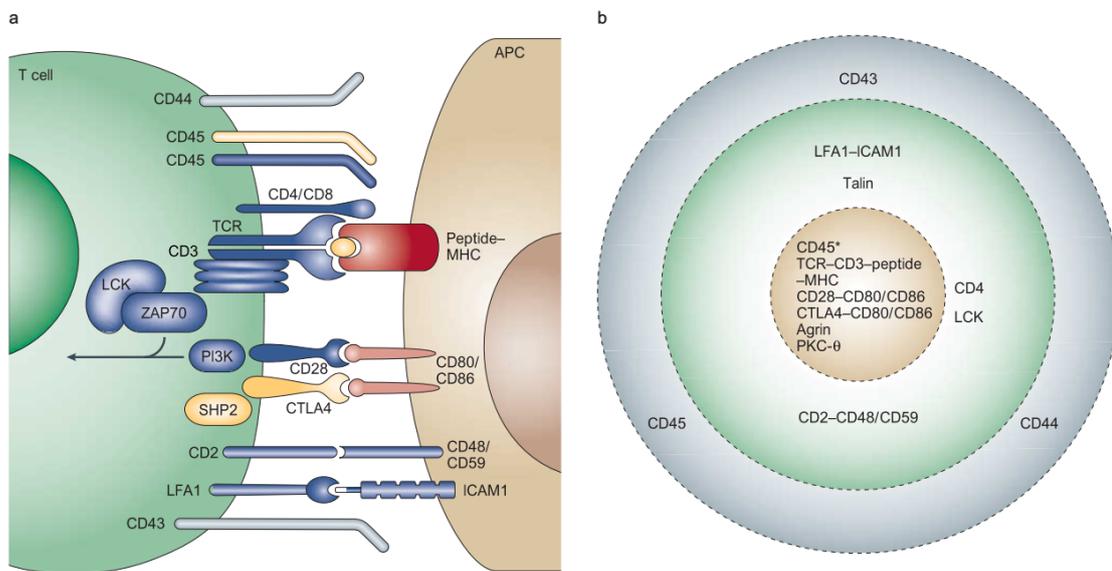


FIGURE 1.10 – **Structure de la synapse immunitaire** : a) vue de profil représentant une sélection des complexes ligand-récepteur et molécules de signalisation impliqués dans la reconnaissance antigénique du lymphocyte T (à gauche) en contact avec une cellule présentatrice (à droite). Les flèches montrent que l'addition des signaux amont entraînent l'activation du lymphocyte T. b) vue de dessus, la synapse immunitaire est organisée en cercles concentriques. La région centrale rassemble les molécules du complexe supra-moléculaire d'activation central (cSMAC, marron), la couronne périphérique contient principalement des molécules d'adhésion intercellulaires (pSMAC, vert) et la région distale (dSMAC, gris) est une zone de haute mobilité membranaire. [Huppa & Davis, 2003].

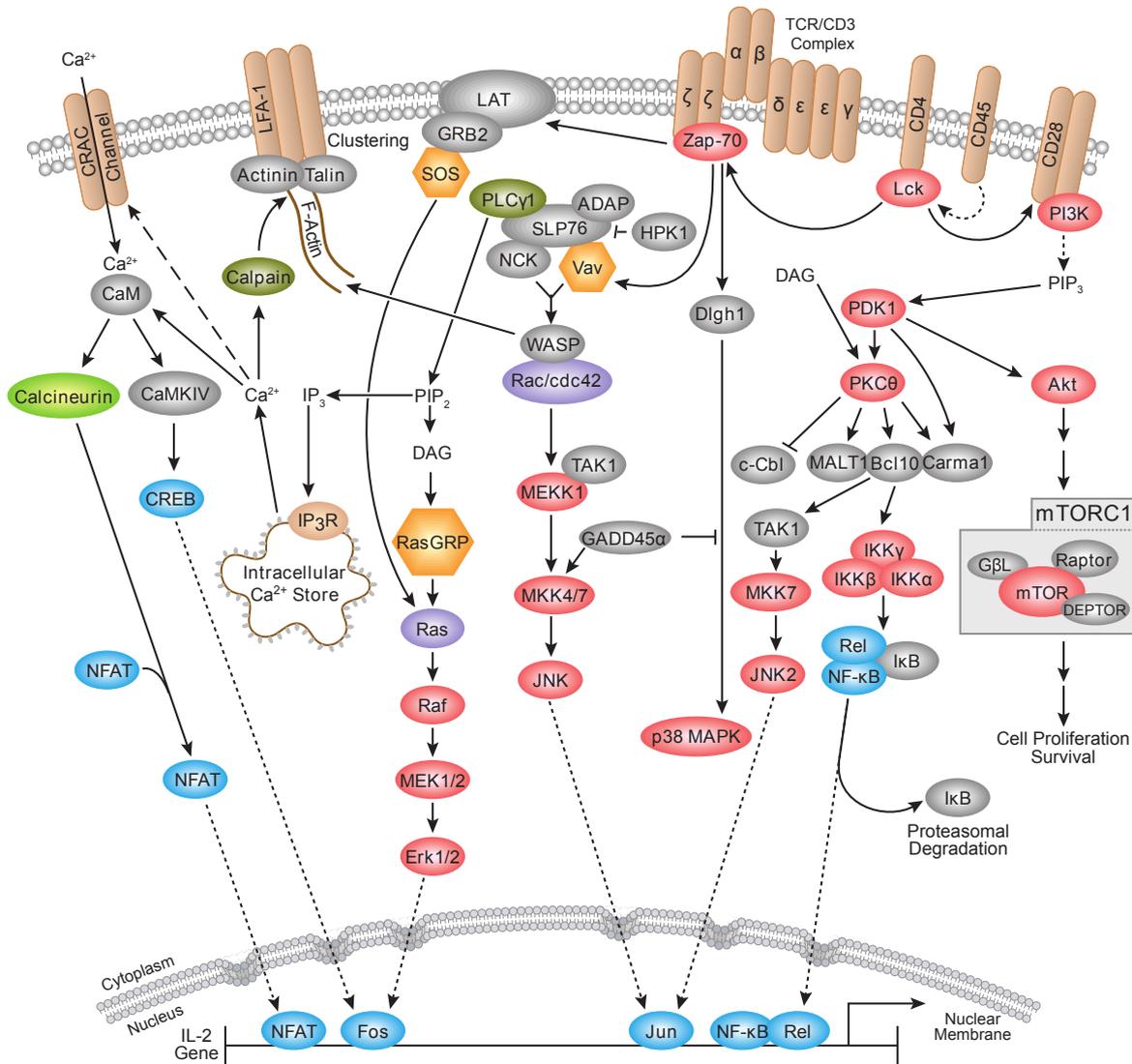


FIGURE 1.11 – **Signalisation après engagement du TCR** L’engagement du TCR engendre un grand nombre de cascades de signalisation qui déterminent le devenir cellulaire en régulant la production de cytokines, la différenciation et la prolifération cellulaire. Un des évènements précoces est la phosphorylation du domaine cytoplasmique du co-récepteur CD3. La protéine Zap70 est recrutée, ce qui permet son activation et la phosphorylation de protéines adaptatrices dont LAT et PLCγ1, qui à leur tour induisent un véritable ballet moléculaire. De nombreux points de régulation sont possibles à travers ces échanges complexes, permettant de couvrir un très large éventail de modifications métaboliques possibles. A ces régulations s’ajoutent celles apportées par les nombreux co-récepteurs de surface, comme LFA1 ou CD28. Source de l’image : site web de *Cell Signaling Technology, Inc.*

du signal sont à ce jour toujours controversés, mais impliquent probablement une combinaison de regroupement, ségrégation et changement conformationnel de protéines transmembranaires ou sous-jacentes à la synapse immune [van der Merwe & Dushek, 2011]. La présence de co-récepteurs, comme CD4 par exemple, capables de se lier au même complexe CMH-peptide permet d'amplifier le signal [Saito *et al.* , 2010].

Une des conséquences de ces phosphorylations est le recrutement de la protéine kinase ZAP70, qui phosphoryle la protéine LAT. LAT a la propriété particulière d'être présente dans des radeaux lipidiques, et sa fonction principale est de fournir des zones d'ancrage sous la membrane pour permettre la formation de complexes de signalisation primordiaux. Notamment, la phosphorylation de LAT induit sa liaison directe avec la protéine PLC γ 1, qui à son tour se lie à SLP76, permettant l'agrégation d'un complexe cytoplasmique faisant intervenir un nombre croissant de molécules [Zhang *et al.* , 1998a,b; Finco *et al.* , 1998].

Un des phénomènes notoires que l'on trouve à la suite de la formation de ces complexes est l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, expliquée à la fois par un relarguage de calcium stocké dans des compartiments intracellulaires et par une ouverture de canaux calciques [Imboden & Stobo, 1985]. L'augmentation de la concentration en calcium agit sur des facteurs de transcription influençant l'activation, la différenciation, la prolifération et les fonctions effectrices des lymphocytes activés [Savignac *et al.* , 2007].

Tous ces processus sont concomitants de la mise en place topographique de la synapse immune. Celle-ci requiert par ailleurs l'intervention active du cytosquelette, modulée par des molécules intervenant dans ces cascades, comme LAT, Wasp Rac et Cdc42 (figure 1.11) [Bunnell *et al.* , 2001].

La formation de la synapse immune nécessite des changements de forme cellulaire

Notons au passage les aspects de mécanique cellulaires mis en jeu lors de l'agencement de la synapse immune. En effet, les cellules présentatrices, tout comme les lymphocytes T, doivent modifier au moins localement leur forme pour pouvoir permettre à une telle structure de s'établir.

Le rôle du cytosquelette⁴ dans la mise en place de la synapse immune est fondamental, et nous nous y attarderons plus longuement dans le paragraphe 1.3.1. Nous pouvons néanmoins signaler ici que le lymphocyte T subit une séquence de polarisations successives. En phase de migration, c'est à dire lorsque la cellule scanne les surfaces des cellules présentatrices jusqu'à la rencontre CMH-peptide, le centrosome, noeud de polarisation de la cellule, est situé à l'arrière du corps cellulaire, dans une zone appelée uropode. Une fois le contact engagé, la formation d'une synapse immune implique le rappatriement du centrosome entre le noyau et l'interface avec la cellule présentatrice (voir figure 1.12) [Huppa & Davis, 2003; Dustin *et al.* , 2010].

4. Le cytosquelette désigne l'ensemble des protéines cytoplasmiques sur lesquelles reposent l'architecture de la cellule, qui sont donc responsable de sa forme et de son intégrité mécanique (voir paragraphe 1.2.2)

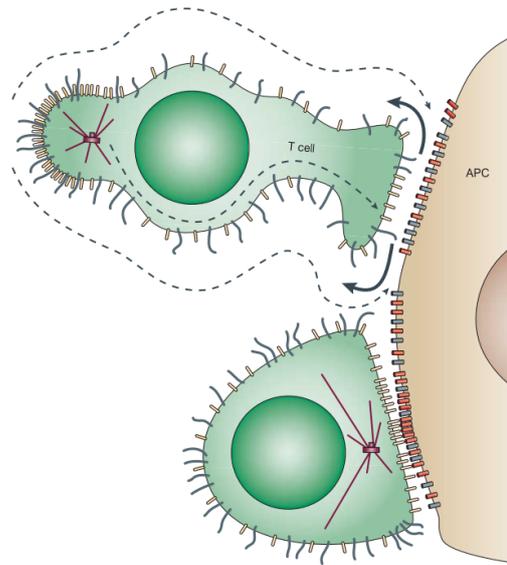


FIGURE 1.12 – **Polarisation du lymphocyte T au cours de la mise en place de la synapse immune.** En phase de migration, le centrosome du lymphocyte T est situé à l'arrière de la cellule, à l'uropode. Lorsque le lymphocyte T (à gauche) détecte le complexe CMH-peptide complémentaire à son TCR sur une cellule présentatrice (à droite), il ralentit et stoppe sa phase migratoire. Le centrosome est relocalisé entre le noyau et l'interface, où certaines molécules (TCR, jaune) sont recrutées alors que d'autres comme CD43 (en gris), par exemple, sont exclues. [Huppa & Davis, 2003]

Il a été montré par ailleurs que de brefs contacts transitoires étaient établis entre la cellule T et une surface activatrice pour permettre la rencontre TCR-CMH-peptide. Cette brève période de tâtonnement précède une phase d'étalement linéaire, suggérant qu'une "décision" d'étalement, c'est à dire de changement de forme cellulaire, a été prise à partir d'informations biochimiques scannées à la surface [Cretel *et al.* , 2010].

La présence de la molécule LFA1 à la périphérie du complexe d'activation supramoléculaire central ne semble pas non plus être anodine. LFA1 est une intégrine⁵, et sa localisation au pourtour du complexe d'activation supramoléculaire central rappelle les couronnes d'actine que l'on retrouve lors de la mitose ou du refermement d'un tissu épithélial [Satterwhite & Pollard, 1992; Bement *et al.* , 1993]. Nous verrons plus loin que cette couronne de LFA1 est effectivement accompagnée d'un anneau d'actine dans la partie cytoplasmique de la synapse. Il est supposé que la fonction première de LFA1 serait de permettre au lymphocyte T motile de ralentir pour favoriser la rencontre TCR-MHC-peptide, par de signaux forts d'adhésion; et par la suite de stabiliser le contact en fournissant l'infrastructure mécanique [Dustin *et al.* , 2010].

Ces quelques exemples instillent l'idée que la mécanique cellulaire et moléculaire pourrait jouer un rôle prépondérant dans l'activation précoce du lymphocyte T. Nous

5. Les intégrines sont des protéines transmembranaires liées au cytosquelette d'actine permettant la liaison entre l'extérieur de la cellule et les acteurs cytoplasmiques de la mécanique cellulaire. Ces propriétés particulières en font des mécanotransducteurs de premier choix (paragraphes 1.2.2 & 1.2.4)

reviendrons sur ces aspects plus en détail dans la partie 1.3.

Différentes cellules présentatrices, différentes synapses

Il est également intéressant de comparer la forme que prend le lymphocyte T lorsqu'il entre en contact avec les différentes cellules présentatrices. Nous l'avons vu, la synapse immune nécessite un contact intercellulaire stable et prolongé. Pendant ce contact, les cellules peuvent changer de forme, ce qui augmente la surface de contact. La figure 1.13 illustre les différentes configurations possibles. On remarque par exemple que le lymphocyte T est susceptible de s'étaler d'avantage sur les macrophages que sur les autres cellules. La différence entre cellules dendritiques selon qu'elles sont mûres ou non est aussi remarquable : le lymphocyte T semble former des excroissances lorsqu'il est en interaction avec la cellule dendritique immature, alors que c'est la cellule dendritique mûre qui paraît envelopper le lymphocyte T lorsqu'ils interagissent. Enfin, la forme que prennent les deux lymphocytes T en interaction avec un lymphocyte B est autant saisissante : les cellules T semblent tâtonner et s'étaler, comme pour augmenter l'aire de l'interface.

Ces observations renforcent la légitimité des questions soulevées plus haut : ces différences d'étalement ont-elles un rapport avec les propriétés mécaniques des cellules présentatrices ? Est-ce que le lymphocyte T est capable de sentir la rigidité de la cellule avec laquelle il interagit, et cela influence-t-il la forme qu'il est susceptible de prendre, et en aval, le signal biologique transmis ?

1.1.4 Le lymphocyte T : l'orchestrateur de la réponse immunitaire adaptative

Sélection clonale et différenciation

Les événements de signalisation issus de la synapse immune engendrent des modifications métaboliques des lymphocytes T. Parmi eux, la sélection clonale et la différenciation affecte une sous-population de lymphocytes T : les lymphocytes T naïfs. Ils ont la propriété particulière de n'avoir encore jamais rencontré leur antigène spécifique et restent en état de latence en attendant l'activation. Seules les cellules dendritiques matures sont capables d'activer cette sous-population, véritable réserve cellulaire pour agir contre des pathogènes alors jamais rencontrés. La rencontre TCR-CMH peptide permet de déterminer quel est le motif de l'antigène contre lequel la réponse doit être dirigée : on parle de sélection clonale. Le lymphocyte T ainsi sélectionné va alors entrer dans une phase de prolifération massive et de différenciation sous l'influence de l'interleukine IL-2 : il passe alors à l'état d'effecteur (voir figure 1.14) [Savignac *et al.*, 2007].

Les centaines de milliers de cellules ainsi engendrées en seulement quelques jours vont se différencier en sous-populations de cellules effectrices selon les informations transmises à la synapse et des signaux cytokiniques [Murphy & Reiner, 2002]. La voie de différenciation empruntée dépend notamment de l'état d'activation des cellules dendritiques elles-mêmes [Kapsenberg, 2003]. On distingue principalement les lymphocytes

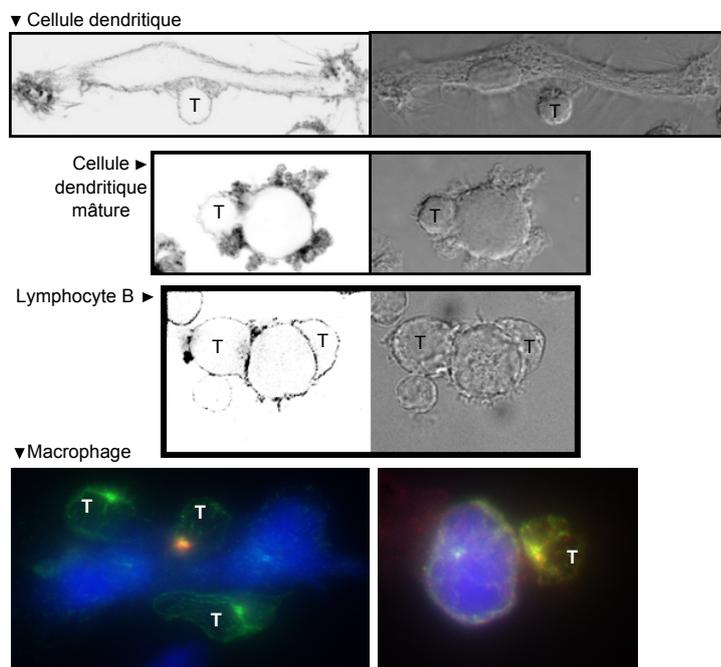


FIGURE 1.13 – La forme de la synapse diffère selon la cellule présentatrice

Clichés de microscopie figurant les synapses que forme le lymphocyte T avec différentes cellules présentatrices d'antigène. Le lymphocyte T module sa morphologie et son étalement en fonction de la cellule avec laquelle il est en interaction. Clichés pris par l'équipe de Claire Hivroz, Institut Curie, U932.

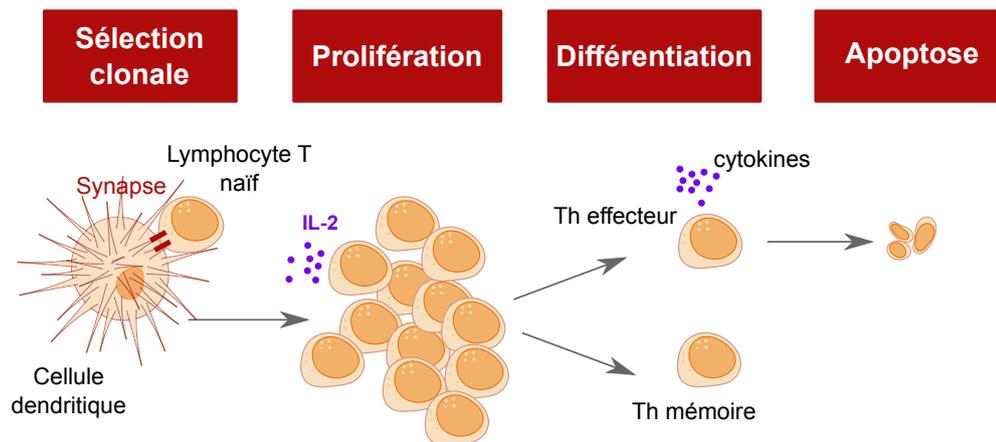


FIGURE 1.14 – **Étapes de la réponse du lymphocyte T CD4⁺** Le lymphocyte T initialement à l'état naïf est activé par une cellule dendritique par la reconnaissance du complexe CMH-peptide par son TCR et l'établissement de la synapse immunitaire. Le clone sélectionné prolifère. L'activation engendre une sécrétion d'IL-2 qui soutient la multiplication. Les cellules obtenues entrent alors en différenciation. Nous n'avons représenté ici que les lymphocytes Th, responsables de l'organisation de la réponse immunitaire par l'intermédiaire de la sécrétion de cytokines, et les lymphocytes mémoire assurant la mémoire immunitaire. Lorsque le danger est écarté, les lymphocytes surnuméraires devenus inutiles sont éliminés par apoptose. Image inspirée de Espinosa & Chillet [2010].

Th, de l'anglais "helper", responsables de la coordination des réponses cellulaires extracellulaires; des lymphocytes T cytotoxiques responsables de la lyse ciblée de cellules infectées ou tumorales. Par ailleurs, chaque sous-population possède un certain nombre de lymphocytes T mémoires responsables comme leur nom l'indique de la mémoire immunitaire, qui permet une réponse plus rapide et plus efficace contre un pathogène déjà rencontré au cours de la vie de l'individu. Ces sous-populations sont en retour susceptibles d'interagir avec les autres cellules présentatrices d'antigène, directement *in situ* et selon la situation.

Sous-populations et lignées lymphocytaires

Au tout début de l'histoire de la classification des cellules Th selon leurs caractères effecteurs, Mosmann & Coffman [1989] ont montré que deux sous-populations pouvaient se distinguer par l'ensemble des cytokines qu'elles sécrètent. Ils ont ainsi défini les lymphocytes Th1 sécrétant IL2, IFN γ et TNF β tandis que les lymphocytes Th2 relèguent une variété d'interleukines (IL4 IL5 IL6 et IL13). En retour, ces différents paysages d'expression cytokinique induisent des effets variés sur les cellules régulées. Ainsi les lymphocytes Th1 vont stimuler la phagocytose bactérienne par la production d'IFN γ tandis que l'interleukine IL4 sécrétée par les lymphocytes Th2 va agir sur les lymphocytes B pour stimuler leur production d'anticorps (voir figure 1.15). Cette classification s'est raffinée et enrichie avec le temps, non sans soulever de nombreux scepticismes : certaines cellules que l'on appelle Th0 peuvent toutefois exprimer un

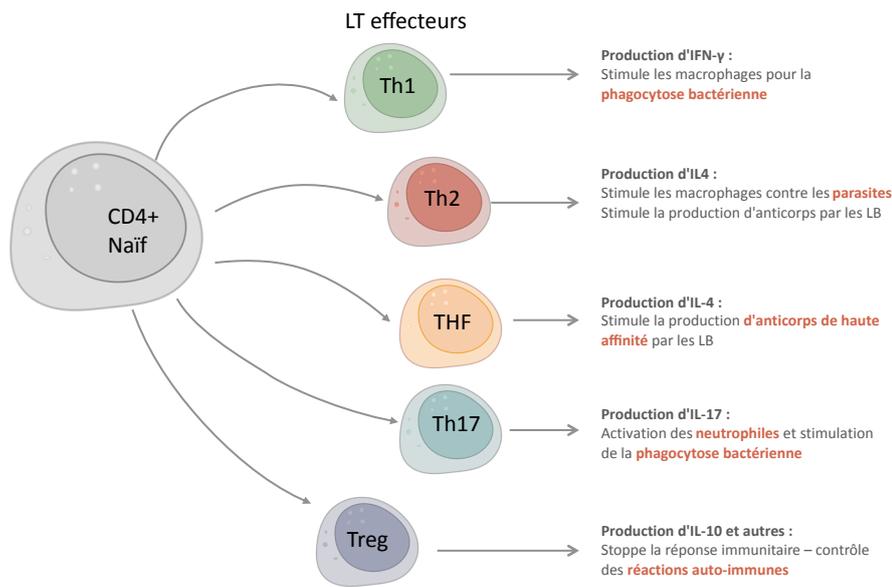


FIGURE 1.15 – **Différentes voies de différenciation du Lymphocyte T** En fonction du signal reçu, le lymphocyte T peut évoluer vers différentes sous-populations dont les propriétés de régulation des fonctions immunes sont variées. La voie de différenciation choisie est intimement liée au contact établi avec la cellule dendritique, à l'état de la cellule dendritique activatrice, à la présence de co-stimulateurs à la synapse ainsi et surtout à celle de cytokines dans le milieu environnant la cellule T. Aux lymphocytes Th1 et Th2 découverts initialement se sont rajoutés les lymphocytes THF et Th17 ainsi que les lymphocytes Treg, dont la fonction mal comprise à ce jour serait notamment de réguler les autres réponses T et de contrôler les réactions auto-immunes. La sélection clonale d'un seul lymphocyte permet ainsi de mettre en place avec une finesse extrême une réponse adaptée à chaque pathogène.

éventail large et hétérogène de cytokines rendant leur classification impossible [Abbas *et al.* , 1996].

La variété et l'hétérogénéité des ensembles de cytokines secrétées et les fonctions effectrices qu'elles engendrent semble désormais davantage relever d'une continuité d'états dépendant de l'histoire individuelle de chaque lymphocyte. La classification présentée en figure 1.15 n'est qu'une tentative arbitraire opérée par les chercheurs, néanmoins nécessaire pour fournir un moyen d'en aborder l'immense complexité [O'Shea & Paul, 2010] ; tout comme la sociologie cherche à regrouper des comportements d'individus afin d'élucider les mystères d'une société humaine où les interactions individuelles sont pourtant si déterminantes pour le devenir de chacun.

En tout état de cause, ces motifs d'expression cytokinique produits par les lymphocytes T effecteurs permettent de solliciter la totalité de l'arsenal immunitaire : activation des lymphocytes B et sécrétion d'anticorps spécifiques, activation de la phagocytose, activation des lymphocytes CD8⁺ (cellules cytotoxiques adaptatives). En retour, les différentes cellules présentatrices d'antigène sont susceptibles d'interagir *in situ* avec les différentes sous-populations de lymphocytes T effecteurs et d'en infléchir

l'activité, résultant en une capacité de modulation illimitée de signaux de régulations de la réponse immune.

De l'immunologie à la mécanique cellulaire

La conclusion évidente découlant de l'aperçu général d'immunologie présenté dans cette partie introductive est que la réponse immunitaire est d'une immense complexité, et que cette complexité repose essentiellement sur les modalités de régulation infinie que permettent à la fois le dialogue direct à travers la synapse immune et le dialogue indirect par voie cytokinique.

Forts de ces connaissances, nous pouvons maintenant imaginer que si la communication entre cellule présentatrice et lymphocyte T dépend étroitement de la configuration de la synapse, il soit tout à fait possible que les limitations d'ordre physique au niveau de la synapse conditionnent le message transmis. De surcroît, nous avons vu plus haut que les cellules présentatrices d'antigène diffèrent énormément en forme et en taille, elles-mêmes susceptibles d'être modifiées en présence de certaines conditions inflammatoires (paragraphe 1.1.2; figure 1.7). Il paraît alors raisonnable de se demander si ces différences géométriques relèvent de différences de constitution mécanique, et si cette constitution mécanique peut en retour influencer les interactions à la synapse.

Un grand champ de recherche, la mécanique cellulaire, aussi appelée biomécanique cellulaire ou mécanobiologie s'attache à mettre en évidence comment une cellule - quelle qu'elle soit - peut sentir l'environnement mécanique qui l'entoure, et comment la nature de cet environnement est susceptible d'influencer son devenir. Dans cette étude, nous avons voulu appliquer cette démarche à la compréhension de l'activation du lymphocyte T. Avant de nous intéresser au cas particulier de la cellule T, je vous invite à explorer ce que propose cette discipline fascinante, à la frontière entre mécanique classique et biologie cellulaire.

1.2 Mécanique cellulaire

1.2.1 Forme, force, raideur, adhésion : définitions

Après avoir décrit succinctement le système immunitaire, du point de vue des interactions biologiques qu'il rassemble, nous allons tenter à présent d'aborder la biologie par l'observation des phénomènes physiques qui s'y déroulent. Tout être vivant repose sur un arrangement particulier de matière, et la physique est précisément la "science qui étudie les propriétés générales de la matière, de l'espace, du temps, et établit les lois qui rendent compte des phénomènes naturels" (Petit Larousse Illustré, 1996). Par ce que dégage la physique sur les arrangements de l'univers, nous espérons apporter des réponses au questionnement sur le vivant.

Mais la physique est elle aussi une vaste discipline, et nous allons plus particulièrement interroger la mécanique, sous-discipline relative à l'étude des forces et des mouvements, aussi désignée par mécanique newtonienne. Nous allons tour à tour mentionner

les termes de forme, de force, de rigidité, et d'adhésion. Ces notions, qui peuvent paraître triviales pour les physiciens, entretiennent des relations parfois complexes entre elles et sont souvent une source de confusion, aussi convient-il de les clarifier ici.

La forme est la notion la plus évidente. Appliqué au cas de la cellule unique, il s'agira de décrire sa géométrie dans l'espace et son évolution dans le temps : degré d'étalement, présence d'irrégularités, sphéricité, etc. L'unité de rigueur est le mètre et ses dérivés (dans notre cas, le micron : μm). A partir de la forme, on peut construire la grandeur de déformation, qui désigne une forme relative à une forme initiale : un ressort s'est déformé de 20mm lorsque sa taille à l'instant d'observation est égale à la taille initiale diminuée de ces 20mm. On parle encore de taux de déformation lorsque la déformation est exprimée sous forme de rapport : un taux de déformation de 10% correspond à une déformation de 20mm d'un ressort qui en mesure initialement 200. Ce concept de déformation est central en mécanique classique car il permet de raisonner en variation de forme relative, pour la comparaison d'objets de tailles diverses. La déformation d'un objet à un instant donné $\varepsilon(t)$ est donc définie comme la variation de longueur à l'instant t :

$$\varepsilon = \frac{|L_0 - L(t)|}{L_0} \quad (1.1)$$

où L_0 et $L(t)$ désignent respectivement la longueur initiale et la longueur à l'instant t . Ici, on remarquera que la grandeur observée est une simple longueur, qui est la taille caractéristique de l'objet étudié (dans notre cas, l'élongation de la cellule entre deux plaques). Il est également possible de définir les variations de taille d'un objet en trois dimensions, et de rassembler ces variations dans un objet mathématique comparable à un tableau, que l'on appelle tenseur, mais il n'est pas nécessaire ici d'entrer dans ces détails, dépassant le cadre de cette étude.

Le concept de force date de la nuit des temps, mais est pourtant assez difficile à appréhender. Une force est ce qui permet de produire un mouvement ou la déformation d'un objet. Le Petit Larousse le formule comme ceci : "toute cause capable de déformer un corps, d'en modifier l'état de repos ou de mouvement". C'est donc une notion très intimement liée à celles de vitesse et de forme, car sa présence ne se décèle que par une modification de la forme ou du mouvement d'un corps. La force est précisément l'action qu'il a fallu appliquer au ressort précédent pour diminuer sa longueur de 20mm. Cette grandeur physique s'exprime en Newtons, soit des kilos multipliés par des mètres et divisés par des secondes au carré. Nous mentionnerons aussi les termes de contrainte et de pression, qui sont des forces ramenées à une surface et s'expriment en Pascals (Newton/m²), soit des kilos divisés par des mètres et des secondes au carré. La contrainte σ est donc reliée à la force F et à sa surface d'application S :

$$\varepsilon = \frac{F}{S} \quad (1.2)$$

Les deux autres notions gravitent autour des premières. La raideur, ou rigidité, est la résistance qu'un matériau offre à la déformation lorsqu'il est soumis à une force. L'amplitude de la force qu'il a fallu appliquer au ressort précédent pour obtenir une

déformation de 20mm dépend de la raideur du ressort. Plus un matériau est raide, plus grande est la force qu'il faut appliquer pour obtenir la même déformation. Cette notion est donc précisément ce qui relie la force à la forme, ou plus précisément la contrainte à la déformation. Ce n'est pas toujours le cas, mais pour un objet élastique, contrainte et déformation sont reliés par une constante de proportionnalité définissant précisément sa raideur. On nomme cette constante module de raideur, qui s'exprime en Pascals (contrainte/déformation = (force/surface)/(longueur/longueur) = pression). Pour un objet purement élastique, cette constante s'appelle le module d'Young, et il est relié à la contrainte et la déformation par :

$$\sigma = E\varepsilon \quad (1.3)$$

Certains matériaux, cependant, ne sont pas purement élastiques mais présentent une composante visqueuse. Un matériau élastique a la propriété particulière d'emmagasiner l'énergie et de la restituer à l'identique : un ressort revient immédiatement à sa forme initiale lorsque la force qu'on lui applique est relâchée, l'énergie qu'on a dépensé pour le déformer est instantanément et strictement restituée par la déformation inverse. La viscosité, au contraire, est une notion permettant de décrire la propension d'un matériau à dissiper de l'énergie, à résister à l'écoulement : il va de soi que le miel est plus visqueux que l'eau. Dans ce cas, la force est proportionnelle à la vitesse d'écoulement v , et le facteur qui les relie est le coefficient de viscosité η . Pour un liquide newtonien, ces relations s'écrivent :

$$F = \eta v \quad (1.4)$$

ou, en termes de contrainte et déformation :

$$\sigma = \eta \dot{\varepsilon} \quad (1.5)$$

où $\dot{\varepsilon}$ désigne la dérivée temporelle du taux de déformation.

Mais pour ces matériaux hybrides, que l'on qualifie de visco-élastiques, ils ne sont ni exactement comparables à du miel, ni exactement comparables à un bout d'acier, mais ils sont plutôt quelque chose entre les deux, susceptible d'emmagasiner de l'énergie sous forme élastique, mais aussi de la dissiper par viscosité. Ainsi, si on relâche la force qu'on leur applique, ils sont capables de revenir à leur forme initiale, mais au bout d'un certain temps seulement. La cinétique de ce recouvrement de forme peut d'ailleurs être étudiée en rhéologie⁶, c'est ce qu'on appelle la relaxation. En fait, la plupart des matériaux tombent sous cette catégorie : les polymères sont presque tous visco-élastiques et constituent une grande partie des matériaux qui nous entourent. C'est aussi le cas des cellules animales, dont nous verrons plus loin comment on peut les caractériser.

Enfin, pour transmettre une force à l'extérieur, et pour permettre le support de l'état de raideur interne, une cellule a besoin d'adhérer. Il faut faire attention à cette notion d'adhésion, car au delà de son apparence triviale, elle peut prêter à confusion. Il faut en fait distinguer deux types d'adhésion. Nous nommerons la première l'adhésion *passive* : lorsque seule la membrane est attachée au substrat et seule la membrane se

6. Comme nous le verrons au chapitre 1.2.3, la rhéologie est la science qui étudie la relation entre contrainte et déformation des matériaux.

déforme et s'étend, sans qu'aucun lien avec le cytosquelette ne soit nécessaire. Dans ce cas, l'adhésion se caractérise plutôt par la force à appliquer pour détacher la cellule. Nous verrons des exemples de ce type d'adhésion au cours de la thèse. Le second type d'adhésion peut être vu comme une adhésion *structurelle* : en plus de passivement "coller" comme un ruban adhésif, il s'agit de permettre une continuité structurelle entre les deux entités que l'on joint. Seul ce type d'adhésion permet de transmettre des forces à l'environnement extérieur : de même que la structure d'un bâtiment a besoin d'être ancrée sur des fondations, une forme cellulaire donnée correspond à un état, une distribution de tensions internes données qui doivent être distribuées sur le substrat. Pour ce faire, il existe des protéines transmembranaires responsables de l'intégrité du lien entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule : les intégrines. L'amplitude et la nature des forces que la cellule va pouvoir transmettre à la matrice extra-cellulaire dépendent des capacités mécaniques de ce contact. Il va de soi que plus la prise est bonne, plus l'amplitude des forces que la cellule peut appliquer peut l'être, nous verrons plus loin comment ceci se traduit au niveau moléculaire.

Ces concepts sont bien évidemment interdépendants. Nous verrons que la forme qu'est susceptible de prendre une cellule conditionne l'état de la matière qui la constitue, et qu'inversement l'état de cette matière influence en retour l'ensemble des formes possibles. De façon similaire, les forces qu'une cellule peut exercer sur un substrat sont intimement liées à sa forme et sa constitution interne, et dépendent de la résistance qu'offre le terrain dans lequel elle évolue, ainsi que la possibilité d'y adhérer ou non. On imagine aisément, que même si dix grands gaillards s'attelaient pour une épreuve de tir à la corde, ils ne pourraient développer aucune force sans la présence d'une équipe adverse ou si la corde se brisait, c'est à dire en l'absence de tension dans la corde ! Nous allons voir comment toutes ces régulations entre force, raideur et déformation se traduisent au niveau cellulaire.

1.2.2 Éléments d'architecture cellulaire

Qu'est-ce qu'une cellule ? Encore une fois, le petit Larousse apporte un éclairage en la définissant comme "l'élément fondamental constitutif de tout être vivant". Une cellule est une unité fonctionnelle autonome, mais agissant en coordination avec les autres, qui lui sont semblables. Son occupation dans l'espace est bornée par une surface matérialisée par la membrane plasmique, qui est également la seule interface de communication avec l'extérieur. A l'intérieur, on y trouve différents organites : noyau, mitochondries, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, etc., chargés d'assurer le fonctionnement métabolique de la cellule. Ces organites baignent dans un liquide, le cytoplasme, composé d'eau, d'ions et d'une multitude de protéines aux concentrations et propriétés diverses.

Le cytoplasme a donc potentiellement une pression osmotique qui diffère de l'extérieur⁷, ce qui se traduit par une différence de pression hydrostatique. Si on lui applique

7. La notion de pression osmotique découle de l'observation faite lorsqu'on dispose deux solutions de concentrations différentes de part et d'autre d'une membrane où seule l'eau peut passer. On observe un transfert d'eau de la solution la moins concentrée à la plus concentrée. Ceci modifie la hauteur à l'air libre des deux solutions, indiquant une différence de pression hydrostatique entre les deux

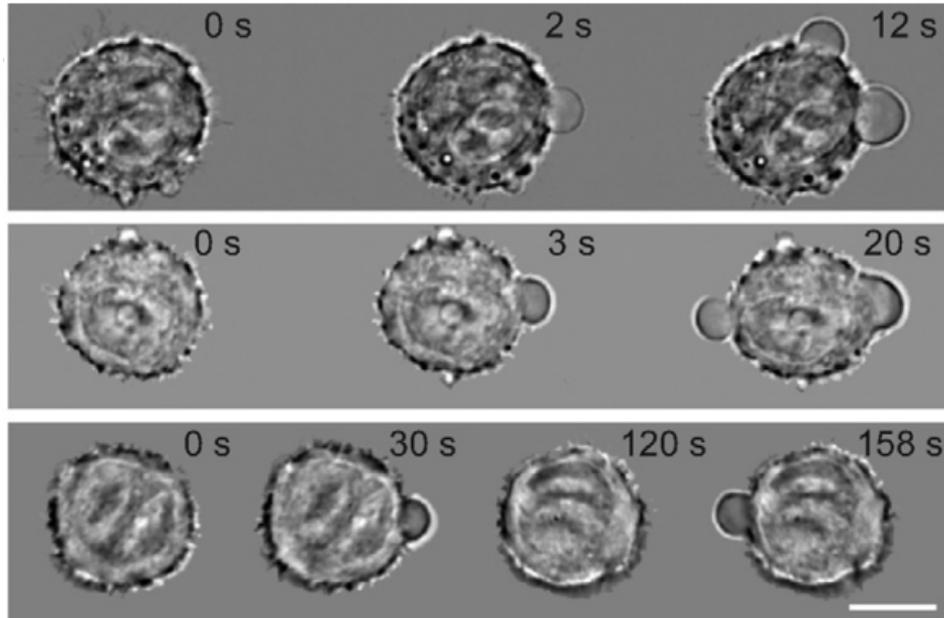


FIGURE 1.16 – **Membrane plasmique.** Observation de blebs à la surface d’une cellule, obtenues par ablation laser du cortex d’acto-myosine sous-jacent (Fibroblaste L929) indiquent que la membrane cellulaire n’est pas tendue dans le cas d’une cellule normale, . Barre $10\mu\text{m}$ [Tinevez *et al.* , 2009]

la loi de Laplace, reliant la courbure locale d’une interface à la différence de pression entre deux milieux, dans le cas d’une goutte sphérique :

$$P_{int} - P_{ext} = \frac{2\gamma}{R}; \quad (1.6)$$

on voit immédiatement que pour préserver l’intégrité d’une forme sphérique de rayon R , la différence de pression doit s’équilibrer par la présence d’une tension superficielle γ .

La membrane plasmique apparaît comme le premier candidat naturel à l’origine de cette tension superficielle. Elle est formée d’une bicouche lipidique : il s’agit en fait d’un liquide à deux dimensions composé de lipides, de protéines et de certains glucides, auquel, comme pour tout liquide, il est possible d’associer une tension surfacique. Quelques observations suffisent à écarter la tension membranaire comme seule support de la tension superficielle γ de la cellule. Dans certains cas, il peut arriver qu’une cellule forme des blebs, c’est à dire des petites bulles momentanées à la surface (voir figure 1.16). Il semble que ces structures soient tendues et correspondent à la compensation de la différence de pression osmotique par la tension superficielle de la membrane [Tinevez *et al.* , 2009]. Dans ce cas, si la membrane supportait à elle seule la différence de pression, les cellules devraient être de la taille des blebs, ce qui n’est de toute évidence pas le cas : la tension superficielle de la cellule lui permettant une taille micronique a donc une autre origine.

solutions, compensée par la pression hydrostatique. La différence de pression hydrostatique compense alors la différence de pression osmotique.

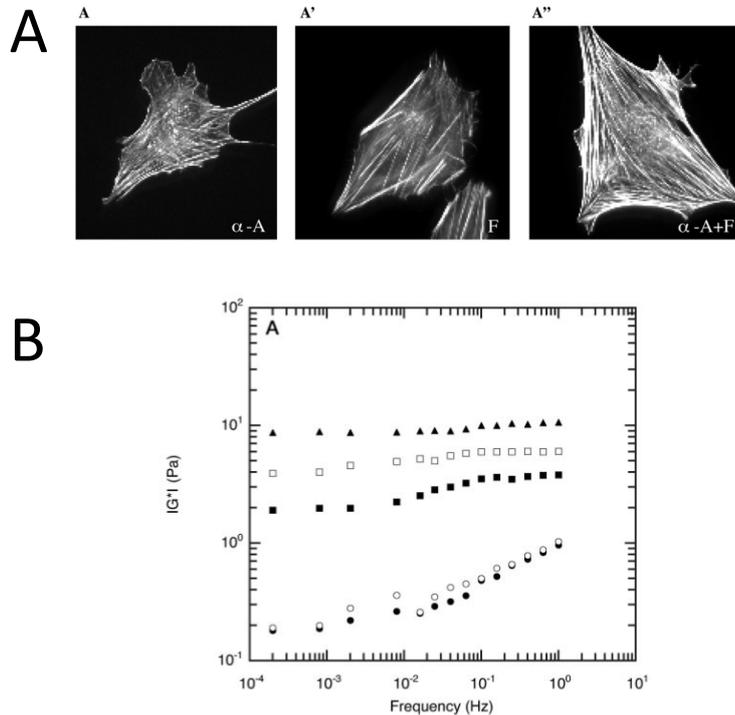


FIGURE 1.17 – α -actinine et fascine réticulent l'actine. A) Clichés de microscopie par fluorescence de fibroblastes 3T3 révélant la présence de : A, α -actinine ; A', Fascine ; A'', α -actinine + Fascine [Tseng *et al.* , 2005]. B) Le module visco-élastique complexe, une grandeur usuellement utilisée pour décrire la rhéologie cellulaire, augmente avec la température et la concentration en alpha-actinine - ● 15 μ M actine à 25°C ; ○ 15 μ M actine à 8°C ; ■ 15 μ M actine+ 0.03 μ M α -actinine à 25°C ; □ 15 μ M actine+ 0.03 μ M α -actinine à 15°C ; ▲ 15 μ M actine+ 0.03 μ M α -actinine à 8°C[Xu *et al.* , 1998].

Le cortex d'acto-myosine

Le cortex d'acto-myosine vient alors comme le second candidat évident pour supporter la forme cellulaire. D'un point de vue physique, on peut le décrire comme un gel réticulé qui sous-tend la membrane, d'une épaisseur d'environ 200nm [Clark *et al.* , 2013], et qui possède deux propriétés remarquables.

La première est une immense plasticité, permise à la fois par la dynamique de polymérisation/dépolymérisation de l'actine et par la grande variété des structures d'assemblage possibles. Ces structures sont obtenues grâce à de très nombreuses protéines capables de lier l'actine. Parmi elles

- La profiline favorise la polymérisation du filament au bout + ; l'ADF/cofiline accélère la vitesse de dépolymérisation au bout - et la capping protein, comme son nom l'indique, vient coiffer le bout + du filament pour stopper l'élongation. Toutes trois participent à l'équilibre entre polymérisation et dépolymérisation, et garantissent le maintien d'une concentration en actine globulaire en excès [Pollard & Borisy, 2003].
- l' α -actinine est un réticulant de l'actine dont la concentration influence la raideur

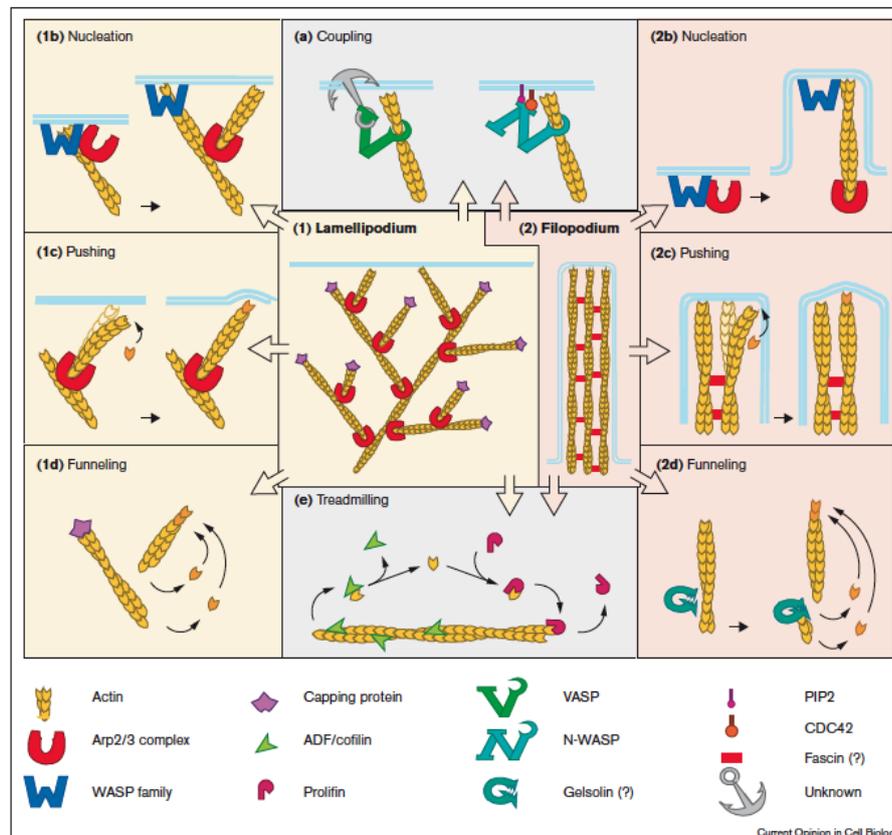


FIGURE 1.18 – Les protéines organisatrices de l'actine [Borisys & Svitkina, 2000].

- du gel d'actine (figure 1.17) ; [Lazarides, 1976; Xu *et al.* , 1998].
- La fascine et la filamine (entre autres) permettent l'organisation de faisceaux de filaments [Tseng *et al.* , 2001, 2005; Esue *et al.* , 2009]. α -actinine et fascine par leurs caractéristiques complémentaires, permettent de réguler finement la microstructure du gel d'actine (figure 1.17-A).
 - Le complexe Arp2/3 nucléé des filaments d'actine et permet la formation de branches à un angle fixe de 70 degrés, et forme des structures protrusives très fines que l'on retrouve dans le lamellipode [Cossart, 2000].
 - La famille des formines sont un ensemble de protéines homologues structurellement, mais pouvant selon leur type effectuer toutes les tâches citées ci-dessus [Esue *et al.* , 2008; Goode & Eck, 2007].

Ainsi l'actine peut être assemblée en des structures variées aux caractéristiques mécaniques diverses : le lamellipode, fin feuillet d'actine réticulée, permet à la cellule de s'étaler et de migrer ; le filopode, excroissance cylindrique de filaments parallèles sont souvent trouvés à l'extrémité des lamellipodes, servent d'antennes par lesquelles la cellule explore et forme les premiers points d'ancrage avec son environnement [Mattila & Lappalainen, 2008] ; les fibres de stress, câbles de filaments d'actine parallèles mis sous tension par la myosine permettront de supporter les contraintes mécaniques lorsqu'une cellule en étalement s'éloignera de la forme sphérique, et par là même appliqueront des forces sur l'environnement extérieur [Harris *et al.* , 1981].

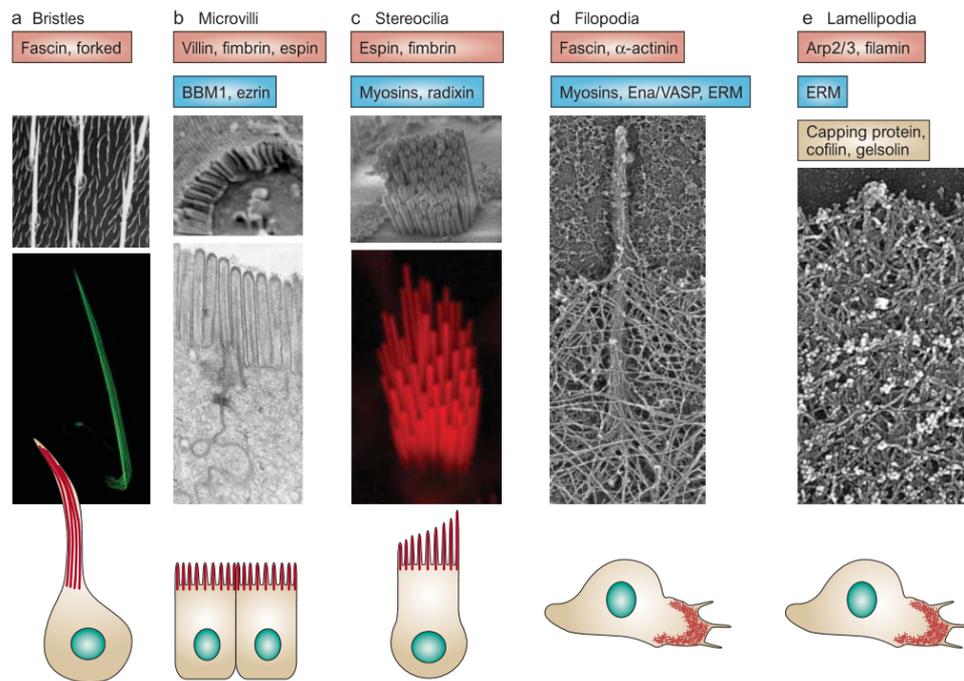


FIGURE 1.19 – Les différentes structures d'actine [Revenu *et al.* , 2004]

D'autre part, le cytosquelette possède cette extraordinaire faculté de contractilité permise par l'activité du moteur moléculaire qu'est la myosine⁸ [Mizuno *et al.* , 2007]. Par le mécanisme de "Power stroke", la myosine est capable de faire glisser les filaments d'actine l'un contre l'autre (voir figure 1.20) en échange de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP en ADP [Vale, 2000; Uyeda *et al.* , 1996]. Ceci a pour effet de raccourcir ainsi la longueur totale d'une fibrille, formée de plusieurs filaments. Ce mécanisme est la base de la contraction musculaire, où fibrilles s'assemblent en fibres de stress, qui s'assemblent ensuite en fibres musculaires.

A l'échelle du cortex, l'activité des myosines permet de moduler ses propriétés mécaniques de façon subtile : le nombre de liens et la contractilité active résulte en une augmentation de la raideur du gel, alors que la nature transitoire des contacts lui confère sa viscosité. En ce sens, il a été observé par des collègues au laboratoire il y a quelques années que l'inhibition de la myosine par la blebbistatine engendre à la fois une baisse du module apparent et une perte de viscosité [Balland *et al.* , 2005]. Il a également été observé que l'organisation même de l'actine joue sur l'activité de la myosine, qui a une affinité préférentielle pour des faisceaux d'actine anti-parallèles, illustrant l'étroite imbrication et l'interdépendance de ces deux protéines du cytosquelette [Reymann *et al.* , 2012]. Enfin, les fibres de stress formées par le complexe d'acto-myosine sont sensibles à l'environnement, et se renforcent ou se réorientent sous l'effet de la contrainte extérieure (voir paragraphe 1.2.4 p.50).

Le cortex d'acto-myosine est donc un objet mécanique bien singulier. Pour l'ingénieur que je suis, ces propriétés relèvent du fantasme : vous imaginez un bâtiment qui

8. Par simplification, le terme de myosine désigne ici et tout au long du manuscrit, sauf précision contraire la myosine II.

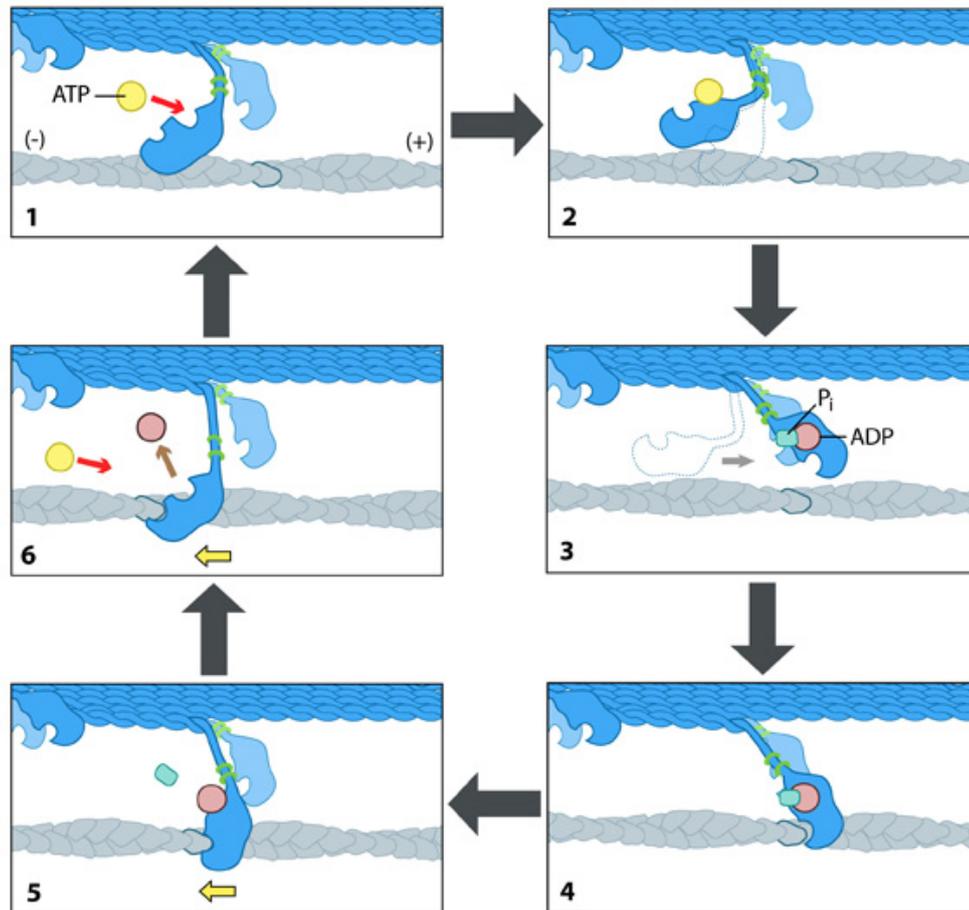


FIGURE 1.20 – **Le mécanisme de "Power Stroke" de la myosine** 1) Au début du cycle, la tête de myosine est libérée de l'ADP et est attachée au filament d'actine. 2) Une molécule d'ATP se lie à la tête de la myosine, ce qui induit un léger changement conformationnel réduisant l'affinité de la myosine pour le filament d'actine : il y a détachement. 3) La liaison de l'ATP cause également un changement conformationnel dans la queue de la myosine, ce qui referme le bras et le déplace plus loin sur le filament. L'ATP est ensuite hydrolysée, et le complexe ADP-Phosphate est maintenu attaché à la tête de la myosine. 4) La configuration myosine-ADP-Phosphate favorise l'entrée en contact de la tête avec le filament d'actine, ce qui déclenche un changement de conformation permettant le relargage du phosphate. 5) La libération du phosphate renforce l'attache myosine-filament, tout en libérant le bras qui revient dans sa position initiale : c'est le "power-stroke". 6) En regagnant sa conformation initiale, la myosine libère l'ADP tout en restant attachée au filament : le cycle est réinitialisé. (MBInfo contributors. Image insérée avec la permission de MBInfo : www.mechanobio.info; Mechanobiology Institute, National University of Singapore").

se contracterait en fonction du vent auquel il est soumis ? Ou un sous-marin dont les propriétés de la paroi évolueraient pour s'adapter en temps réel à la pression extérieure au fur et à mesure de la descente dans les abysses ? Les propriétés extraordinaires de la matière vivante constituent bel est bien une chimère technique que l'homme s'évertue à déchiffrer, pour peut-être un jour parvenir à l'imiter.

Microtubules et filaments intermédiaires

Bien que le cortex d'acto-myosine soit l'élément du cytosquelette prépondérant dans cette étude, il n'en est pas le seul, et nous ne pouvons omettre de mentionner les autres filaments du cytosquelette : microtubules et filaments intermédiaires.

Microtubules Les microtubules, comme les filaments d'actine, sont obtenus par assemblage de protéines identiques, ici les dimères de tubuline. Leurs fonctions sont essentiellement reliées à l'organisation spatiale des organites dans le cytoplasme. Un de leur rôle les plus connus est celui de la ségrégation des chromosomes lors de la mitose et du transport de ceux-ci aux deux pôles cellulaires. Ils servent également de guides pour le transport cellulaire en permettant l'accroche des cargos transporteurs de vésicules (dynéines). Enfin, le centrosome où ils sont nucléés correspond souvent au centre de polarisation cellulaire : il définit la base du flagelle du spermatozoïde, celle du cil des cellules ciliées, et nous avons déjà mentionné son positionnement très précis lors de la formation de la synapse immune.

Pour autant, leur importante longueur de persistance (de l'ordre du millimètre) en a fait de très bons candidats pour le support de la structure cellulaire. Un des modèles les plus séduisants a été le modèle de tenségrité, inspiré par un courant architectural des années soixante. L'idée avancée par Donald Ingber en 1993 reprend ce principe architectural selon lequel un ensemble de poutres de compression reliées entre elles par des câbles sous tension permet d'assurer la stabilité mécanique d'une structure sans que les poutres ne se touchent (voir figure 1.21). Cette idée, poétiquement illustrée par les sculptures de Kenneth Snelson, pourrait s'appliquer à l'architecture cellulaire, l'actine faisant office de câbles de tension et les microtubules de poutres de compression [Ingber, 1993]. Un certain nombre de scientifiques ont alors tenté de déceler les évidences d'une telle structure mécanique, parfois même avec succès [Wang *et al.*, 2001; Laurent *et al.*, 2002]. Cependant, de récentes observations mettent à mal la validité de ce modèle, dénoncé comme trop simpliste [Mehrbood & Mofrad, 2011]. A ce jour, la communauté s'accorde sur la prépondérance des rôles de polarisation cellulaire, d'organisation cellulaire et de support du transport vésiculaire des microtubules.

Filaments intermédiaires Les filaments intermédiaires sont souvent les grands oubliés en mécanique cellulaire. Il en existe différents types (lamine, vimentine, keratine, etc.), tous homologues. Ils s'assemblent en une structure fibrillaire très stable. Cette grande stabilité a pour contrepartie une dynamique minimale, et pour cette raison, ils ont longtemps été considérés comme de simples éléments passifs chargés du renforcement mécanique des structures formées par les microtubules et filaments d'actine [Goldman *et al.*, 1996]. Par exemple, les filaments de desmine sont connus pour relier les sarcomères perpendiculairement à leur élongation, permettant de stabiliser la microstructure musculaire. Néanmoins, des recherches plus récentes ont dévoilé un comportement très extensible (jusqu'à 250% de déformation), très flexible et une grande dureté [Qin *et al.*, 2010]. Ils sont également susceptibles d'encourir un remodelage suite à des sollicitations mécaniques extérieures, comme dans le cas de cisaillement sur les cellules épithéliales [Helmke *et al.*, 2001; Ridge *et al.*, 2005].

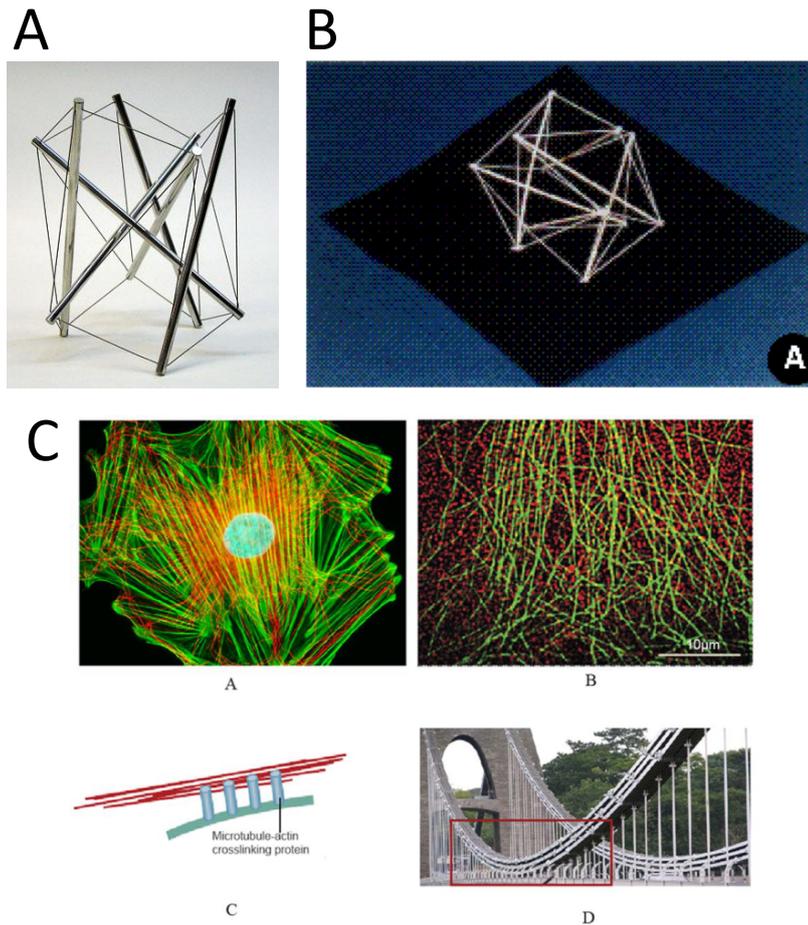


FIGURE 1.21 – Le principe de tensegrité en architecture.. et en mécanique cellulaire A) Sculpture de Kenneth Snelson : Newport, 1967 aluminum & acier inoxydable. B) Maquette de cytosquelette construit à partir de chevilles de bois et d'élastiques par Donald Ingber d'après le concept de tensegrité [Ingber, 1993]. C) Exemple de figure comparant l'architecture cellulaire à des modèles de tensegrité dans une publication scientifique [Mehrbod & Mofrad, 2011].

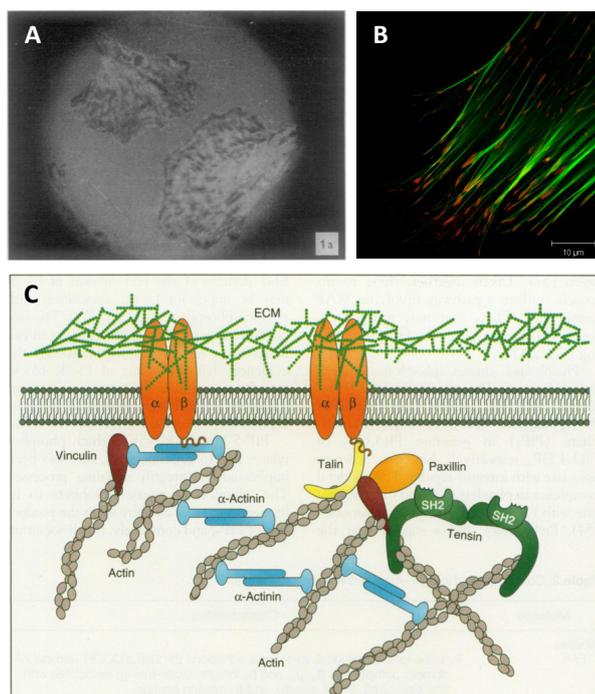


FIGURE 1.22 – L'intégrine et les complexes d'adhésion : le lien mécanique entre intérieur et extérieur d'une cellule (A) Première observation des complexes d'adhésion par microscopie interférentielle en 1975 [Abercrombie & Dunn, 1975]; (B) Image de microscopie par immunofluorescence mettant en évidence les complexes d'adhésion (rouge) à la terminaison des fibres de stress d'actine (vert) (Cliché Wikimedia Commons, Christoph Moehl); (C) Schéma structurel des complexes d'adhésion [Clark & Brugge, 1995].

Lien mécanique entre l'intérieur et l'extérieur d'une cellule

Nous l'avons mentionné plus haut : pour qu'une cellule puisse exercer des forces sur l'environnement extérieur, il faut qu'elle puisse y avoir prise. Les intégrines sont les protéines transmembranaires chargées de faire ce lien entre le cytosquelette et la matrice extra-cellulaire. Il s'agit d'un ensemble de deux hétéro-dimères, les sous-unités *alpha* et *bêta*, possédant à la fois un domaine extra-membranaire et une terminaison cytoplasmique. Celle-ci est reliée au cortex d'acto-myosine par l'intermédiaire d'un certain nombre de protéines cytosoliques (taline, vinculine, paxiline, α -caténine, etc.), formant des agencements protéiques complexes que l'on désigne par le terme de *complexes d'adhésion* (voir figure 1.22).

Ces complexes sont mécanosensibles : ils sont susceptibles de croître pour former ce que l'on appelle des *adhésions focales* dont la taille est proportionnelle à la force transmise au substrat [Balaban *et al.* , 2001], et dont il est possible de déclencher la formation par l'application d'une force extérieure [Riveline *et al.* , 2001], du moins dans la phase initiale de croissance de l'adhésion [Stricker *et al.* , 2011]. Assurant la continuité mécanique de l'intérieur à l'extérieur de la cellule, les complexes d'adhésion sont des mécanotransducteurs de premier choix : ils constituent un centre de signalisation rassemblant près de 300 protéines et pouvant influencer à peu près tout le devenir

métabolique d'une cellule [Kuo *et al.* , 2011].

Dans le cas de l'adhésion de cellules entre-elles, ce qui est très important pour la formation de tissus cohésifs, c'est une autre classe de protéines qui entre en jeu : les cadhérines. Bien que leur structure soit différente de celle des intégrines, elles remplissent des fonctions homologues, et forment également des complexes cette fois nommés *jonctions adhérentes*, similaires aux complexes d'adhésion. On y retrouve même certaines protéines des complexes d'adhésion comme la vinculine [Pignatelli, 1998], et elles sont également mécanosensibles [Yonemura *et al.* , 2010].

Enfin, une dernière famille de protéines est responsable du lien physique entre le cytosquelette et la membrane plasmique : la famille des Ezrine-Radixine-Moesine (ERM). En permettant l'ancrage de la membrane au cytosquelette, elles sont responsables non seulement de la forme locale mais aussi des assemblages de protéines possibles à la membrane et dans le cytoplasme sous-jacent. Par des sites de liaisons multiples, elles peuvent se lier à la fois directement aux domaines cytoplasmiques des protéines membranaires (figure 1.23-b) ou par l'intermédiaire de protéines échaffaud (figure 1.23-c) [Bretscher *et al.* , 2002]. De ce fait, elles sont aussi susceptibles de se lier à des protéines de signalisation. Elles sont en particulier impliquées dans les voies de signalisation permettant la régulation du cytosquelette (famille des Rho-GTPases) [Mackay *et al.* , 1997].

Les ERM interviennent également dans la formation de la synapse immune : elles interagissent avec la protéine CD43 pour la retenir hors de la zone de contact, ce qui permet l'agrégation des molécules du TCR au centre de la synapse immune [Shaw, 2001]. Plus récemment, il a été montré que les ERM sont inactivées peu de temps après la reconnaissance antigénique, ce qui conduit à une libération de la membrane et facilite la mise en place du contact entre lymphocyte T et cellule présentatrice [Faure *et al.* , 2004].

Nous venons de décrire les différents éléments composant l'architecture d'une cellule. Mais alors, quelles propriétés mécaniques ces éléments architecturaux confèrent-ils aux cellules ? Comment peut-on les mesurer ? Les réponses à ces questions ont été apportées au cours des vingt dernières années, et constituent le domaine de la rhéologie cellulaire.

1.2.3 Éléments de rhéologie cellulaire

Qu'est-ce que la rhéologie ?

Faisons encore appel aux définitions du Petit Larousse : du grec "écoulement", il s'agit de la "science des lois de comportement des matériaux qui lient, à un instant donné, les contraintes aux déformations". En d'autres termes, c'est la discipline qui s'attache à caractériser le comportement mécanique des matériaux, en observant notamment la manière dont ils se déforment ou s'écoulent sous l'effet de différentes contraintes contrôlées. Cette discipline vise également à modéliser ces comportements et à les relier à la structure ou aux interactions ayant lieu au sein du matériau, afin de prédire la réaction d'un matériau à une sollicitation future.

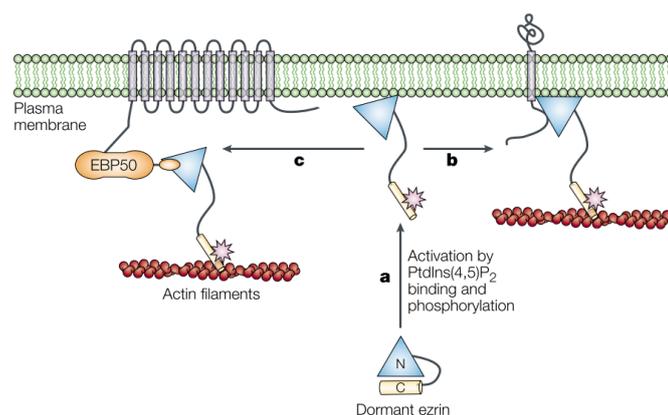


FIGURE 1.23 – **La famille des protéines ERM relie la membrane au cytosquelette** Les ERM à l'état inactif diffusent dans le cytoplasme. Après activation (a), elles permettent de lier la membrane plasmique au cytosquelette en se liant soit directement aux domaines cytoplasmiques de protéines membranaires (b) ; soit en interagissant avec des protéines échaffauds (c) [Bretscher *et al.* , 2002].

La rhéologie a permis de maîtriser le comportement de certains métaux utilisés couramment dans l'industrie. Par exemple, lorsqu'on mesure simultanément la déformation et la contrainte subies par un échantillon lors d'une expérience de traction simple, il est possible de tracer la courbe contrainte-déformation. Dans le cas de l'acier, dont la courbe caractéristique est représentée en figure 1.24, le matériau passe par plusieurs phases, dont une où contrainte et déformation évoluent proportionnellement : c'est l'élasticité linéaire. Il est donc possible, dans cette phase, de relier contrainte et déformation par un simple coefficient : c'est, vous vous en souvenez, la définition de la raideur d'un matériau. Ce coefficient, qui est la pente de la courbe contrainte-déformation, est appelé module d'Young et s'exprime en Pascals. De façon plus générale, la théorie de l'élasticité linéaire, élaborée d'après ce type d'observations, permet de modéliser les contraintes et déformations à tout instant et en tout point du matériau en faisant intervenir des opérateurs mathématiques appropriés pour les décrire en trois dimensions.

La rhéologie est donc simplement aujourd'hui la science qui observe des matériaux moins triviaux (gels, émulsions, matériaux granulaires, etc.) dont les lois n'ont pas encore été caractérisées, afin justement de les élaborer. Bien entendu, cette science doit recourir à des notions mathématiques plus complexes qu'une simple droite, et fait appel à la physico-chimie, la thermodynamique ou la mécanique des fluides pour parvenir à des modèles suffisamment complets. Naturellement, la cellule animale fait partie de ces matériaux difficiles à décrire, et cela d'autant plus qu'il s'agit d'un objet actif, chose tout à fait singulière dans les sciences de la matière. Mais depuis une vingtaine d'années, les avancées techniques ont permis l'accès à des données rhéologiques expérimentales sur des cellules uniques - point de départ essentiel de toute modélisation théorique. Je vous propose d'aborder la description des méthodes expérimentales principales mises au point par les chercheurs en mécanique cellulaire.

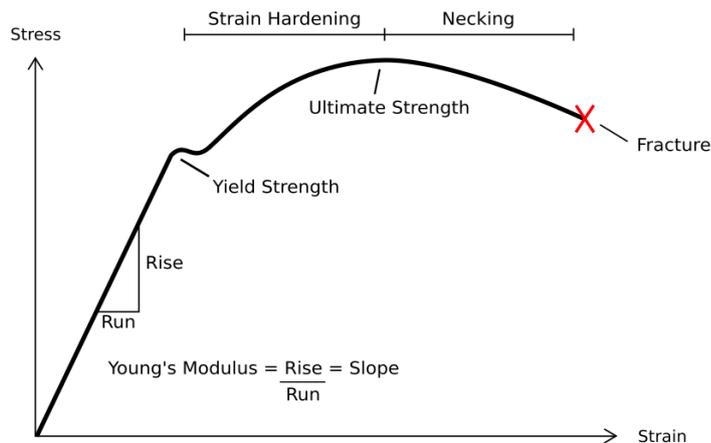


FIGURE 1.24 – courbe contrainte-déformation typique obtenue par traction simple sur un échantillon d'acier (Wikimedia commons)

Différentes techniques en rhéologie cellulaire

Les quelques techniques que nous allons décrire ici font appel à des lois physiques et à des techniques variées : optique, électro-magnétisme, mécanique, hydrostatique, etc. Cependant, elles partent toutes du même principe, identique à celui illustré pour le cas de l'acier : appliquer une contrainte maîtrisée à la cellule et mesurer la déformation qui en découle, ou bien l'inverse.

Micropipette Mitchison et Swann ont été les premiers à avoir eu l'idée de mesurer les propriétés mécaniques d'une cellule isolée, dans les années cinquante [Mitchison & Swann, 1954]. Leur principe était simple : sous un microscope, si on parvient à aspirer une cellule et à en mesurer la déformation grâce à une micropipette, et si l'on arrive simultanément à relever la pression appliquée pour obtenir cette déformation, on peut remonter au comportement mécanique de la cellule (voir figure 1.25-A). A l'époque, les deux auteurs étaient intéressés par les propriétés mécaniques de la surface d'un oeuf d'oursin (ils cherchaient à estimer la fameuse tension de surface γ de la loi de Laplace). Toutefois, il est désormais possible, en utilisant une modélisation simple, de remonter aux propriétés visco-élastiques du cytosquelette dans son ensemble [Hochmuth, 2000].

Pinces optiques La technique des pinces optiques est un peu plus élaborée, mais n'est apparue que dans les années quatre-vingt. C'est le scientifique Arthur Ashkin qui a tout premièrement montré qu'un laser très fortement focalisé peut exercer une force sur une particule diélectrique, lorsque la différence d'indice de réfraction est suffisante [Ashkin *et al.*, 1986]. Cette force est une force de rappel qui ramène la particule vers le point de focalisation. Il a ensuite appliqué ce principe avec succès à des bactéries et des virus et a été capable de les manipuler dans l'espace [Ashkin *et al.*, 1987]. A l'heure actuelle, on utilise les pinces optiques en biomécanique cellulaire pour piéger des microbilles que l'on recouvre de molécules permettant l'adhésion d'une cellule (voir figure 1.25-B). En déplaçant le laser, on peut manipuler les billes pour déformer la cellule et étudier son retour à sa forme initiale, ce qui permet d'en extraire les propriétés mécaniques [Henon

et al. , 1999; Lenormand *et al.* , 2001; Sleep *et al.* , 1999].

Pinces magnétiques Le principe est semblable aux pinces optiques, mais cette fois les billes sont piégées dans un champ magnétique. La modulation (rotation) du champ magnétique permet la rotation d'une bille préalablement accrochée à une cellule (voir figure 1.25-C) ; et l'analyse de la déformation permet de remonter aux propriétés mécaniques locales de la cellule sollicitée [Bausch *et al.* , 1999; Valberg, 1984; Wang *et al.* , 1993].

Etireur Optique Cette méthode est de loin l'une des plus originales. Mise au point par Jochen Guck au début des années deux mille, elle consiste à placer une cellule unique dans un faisceau de deux lasers divergents (voir figure 1.25-D) [Guck *et al.* , 2001]. Le principe s'appuie sur le même phénomène physique que celui à la base des pinces optiques, mais l'applique à la cellule entière. C'est donc la cellule entière qui est piégée, et deux lasers sont agencés face à face de sorte que la résultante des forces optiques qu'ils appliquent permet d'étirer la cellule.

Microscope à Force Atomique (AFM) Le microscope à force atomique a été conçu pour scanner des surfaces avec une extrême précision (de l'ordre de l'angström). Mais il peut également être utilisé en tant que dynamomètre, c'est à dire en tant qu'appareil permettant de mesurer une force, avec une résolution de l'ordre du piconewton (un dixième de millième de milliardième de la force exercée par la gravité terrestre sur un objet d'une masse de 1kg). Pour cela, une pointe très fine est montée sur un portant très flexible, dont le module de flexion est connu⁹. Un laser est focalisé sur l'extrémité du portant où se trouve la pointe, et le faisceau réfléchi est dévié en fonction du mouvement de celle-ci. Ces déflexions sont mesurées par une diode photosensible et permettent de remonter à la force à laquelle la pointe est soumise. En adaptant la forme de la pointe à la taille cellulaire, et en contrôlant très précisément les mouvements de celle-ci, il est possible d'effectuer des indentations locales à la surface d'une cellule, et d'en extraire les propriétés mécaniques (voir figure 1.25-E) [Alcaraz *et al.* , 2003].

C'est la méthode la plus largement commercialisée, et donc la plus accessible aux non-spécialistes de la mesure mécanique. Cependant, elle présente plusieurs désavantages. Premièrement, elle permet de ne sonder que localement et en surface les propriétés mécaniques de la cellule, dont le comportement rhéologique global est possiblement éloigné. Ensuite, elle repose sur une modélisation mathématique (le plus souvent le modèle de Hertz) qui permet de remonter aux propriétés mécaniques à partir de la courbe d'indentation obtenue [Alcaraz *et al.* , 2003]. Comme tout modèle, ils ne sont valides que sous un certain nombre d'hypothèses qu'il est parfois difficile de vérifier expérimentalement. Par exemple, hormis un modèle commercialisé en 2014, ces appareils ne permettent pas de visualiser la déformation orthogonale à la compression lors des mesures de force. Bien que cette technique de mesure soit la plus répandue dans le domaine de la mécanique cellulaire, parce que la plus facile à mettre en place, il faut garder en mémoire que toutes les données obtenues par cette méthode sont à prendre

9. C'est à dire que l'on connaît précisément le coefficient qui relie force et déflexion au bout du portant : pour une déflexion donnée, la force subie par la pointe est immédiatement déterminée.

avec extrêmement de précaution.

Rhéomètre à cellule unique, ou dispositif à microplaques Voici une technique moins répandue mais pour autant aussi utile que versatile. C'est la technique que nous avons utilisée pour cette étude, aussi nous y reviendrons de façon plus détaillée au Chapitre 2. Succinctement, il s'agit de disposer une cellule unique entre deux microplaques de verre dont les mouvements sont finement contrôlés (voir figure 1.25-F). L'une d'entre-elles, infiniment rigide, fournit un socle indéformable, tandis que la seconde est flexible. Comme dans le cas de l'AFM, le module de flexion de la plaque flexible est précisément connu : pour une déformation donnée, on connaît la force appliquée à l'extrémité de la microplaque. Le tout est visualisé sous un microscope inversé ordinaire. Ayant accès à la fois à la force et à la déformation, il est possible d'effectuer une multitude de tests mécaniques sur cellule isolée, et ce à l'échelle de la cellule entière [Desprat *et al.*, 2006].

Comportement rhéologique d'une cellule animale

Ces techniques ont permis de mettre au jour le comportement rhéologique d'une cellule animale. Celui-ci est à la fois particulier et très robuste : c'est une loi de puissance¹⁰ [Balland *et al.*, 2006]. On peut observer cette loi de puissance de deux façons différentes. Premièrement, par une expérience de fluage¹¹ avec le dispositif à microplaques : une force constante est appliquée à la cellule, et on mesure sa déformation dans le temps, qui suit une loi de puissance [Desprat *et al.*, 2005] (voir figure 1.26-A).

Ensuite, lorsqu'on mesure le module visco-élastique complexe¹² d'une cellule unique en la soumettant à des oscillations, on observe que le module de reprise élastique G' comme le module de perte G'' évoluent en loi de puissance à mesure que la fréquence augmente (dans la limite des fréquences inférieures à 10Hz).

Ceci a été observé localement par pinces magnétiques [Puig-De-Morales *et al.*, 2001; Trepas *et al.*, 2007] (voir figure 1.26-B) et AFM [Alcaraz *et al.*, 2003] (voir figure 1.26-C); et à l'échelle de la cellule entière, par le dispositif à microplaques (données expérimentales au Chapitre 2; voir figure 1.26-D). Ces deux façons de retrouver la loi de puissance sont en fait équivalentes, puisque fonction de fluage et module visco-élastique (analyse fréquentielle) se relie aisément de façon formelle (dans le régime des petites déformations) [Balland *et al.*, 2006].

Il est donc possible de formaliser la fonction de fluage $J(t)$ sous la forme d'une loi de puissance :

$$J(t) = J_0 t^\alpha; \quad (1.7)$$

10. C'est à dire une fonction de la forme $f(x) = \alpha x^\beta$

11. Le fluage est une expérience usuelle de mécanique des solides qui consiste à appliquer une contrainte constante à un échantillon, et à en mesurer la déformation au cours du temps.

12. Le module visco-élastique complexe est l'équivalent du module d'Young pour les matériaux qui possèdent une composante visqueuse. Sa partie réelle et imaginaire constituent respectivement un module de reprise élastique, G' , et un module de perte G'' , caractérisant l'élasticité et la viscosité du matériau, respectivement (voir Chap 2).

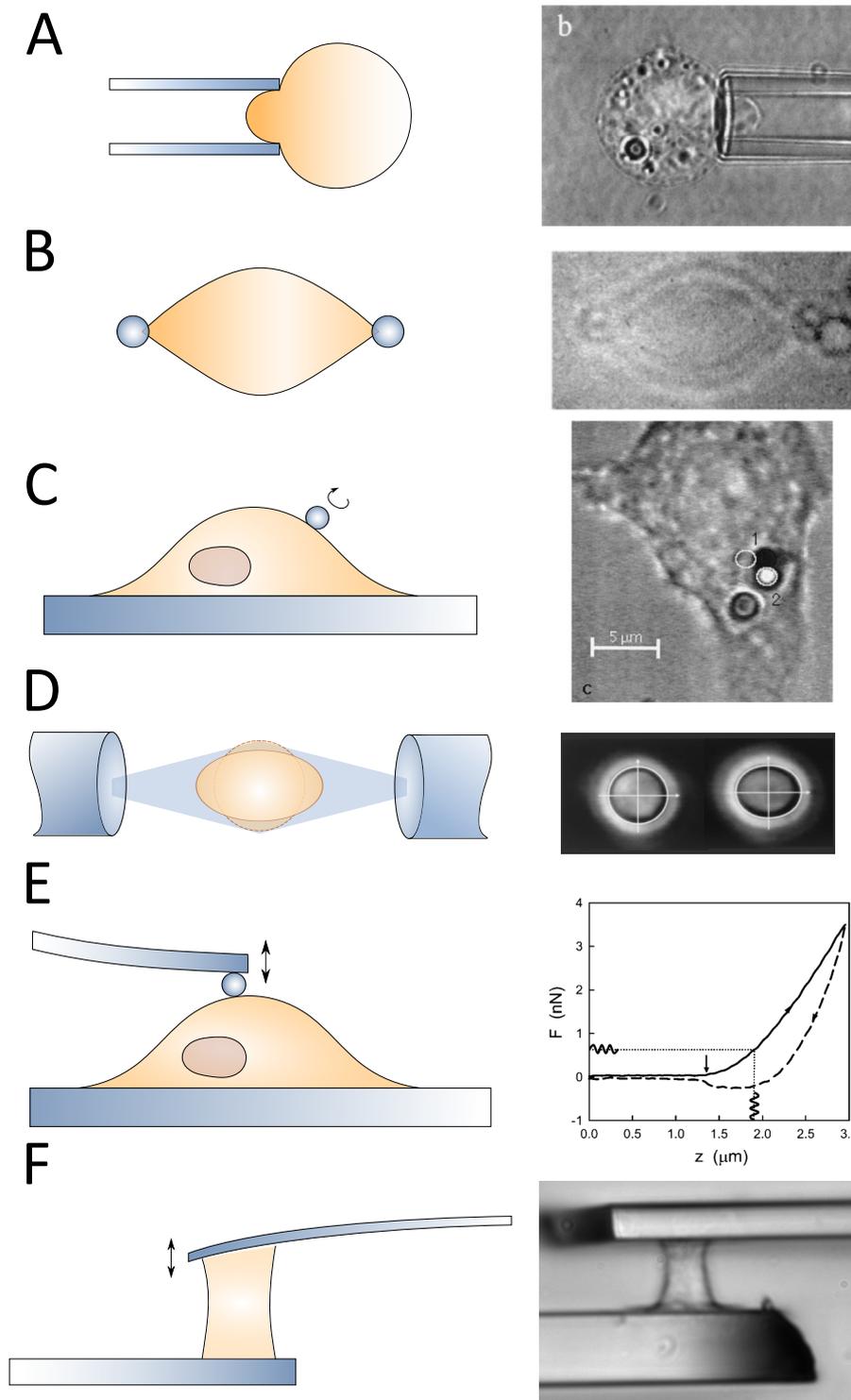


FIGURE 1.25 – Différentes techniques pour la rhéologie cellulaire A) Aspiration par micropipette. Image Jones *et al.* [1999]; B) Pinces optiques. Image Henon *et al.* [1999]; C) Pinces magnétiques. Image Bausch *et al.* [1999]; D) Etireur optique [Guck *et al.*, 2001]; E) Microscopie à Force Atomique (AFM). Courbe d'indentation caractéristique : Alcaraz *et al.* [2003]; F) Dispositif à microplaques. Toutes les cellules sont de taille comparable (environ 15 μm de diamètre).

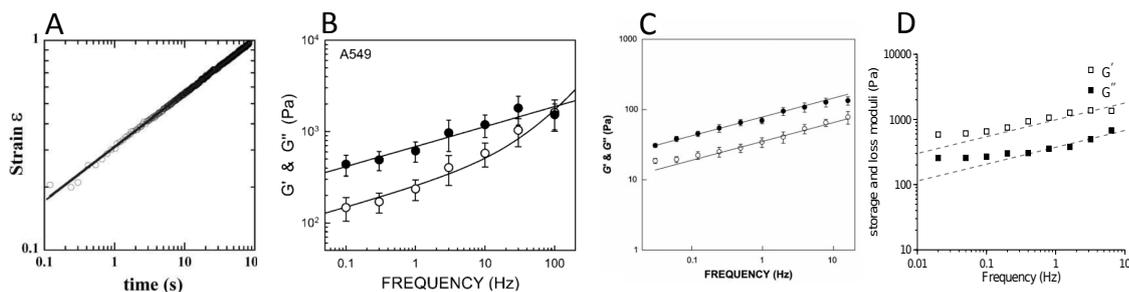


FIGURE 1.26 – la cellule animale a un comportement rhéologique en loi de puissance Loi de puissance obtenue par (A) fluage avec le dispositif à microplaques [Desprat *et al.*, 2005]; sollicitation oscillatoire par (B) AFM [Alcaraz *et al.*, 2003], (C) pinces magnétiques [Puig-De-Morales *et al.*, 2001] et (D) dispositif à microplaques (cette thèse).

et il en va de même pour le module visco-élastique complexe, ainsi que sa partie réelle G' et imaginaire G'' :

$$\begin{cases} G'(f) = G'_0 f^\alpha \\ G''(f) = G''_0 f^\alpha \end{cases} ; \quad G^*(f) = G_0^* f^\alpha. \quad (1.8)$$

Les préfacteurs (J_0, G'_0, G''_0) ainsi que les exposants α de ces lois de puissance peuvent être directement extraits des courbes expérimentales, et constituent les grandeurs caractéristiques de ce matériau si particulier. G'_0 désigne la partie élastique, et G''_0 la dissipation du matériau. La norme du module visco-élastique complexe G_0^* donne une estimation de la raideur cellulaire effective : elle est de l'ordre de 500 à 1000 Pa [Balland *et al.*, 2006] pour les cellules animales. L'exposant α , quant-à-lui, donne une idée du caractère plus ou moins élastique ou visqueux du matériau : $\alpha=1$ pour un liquide visqueux, et $\alpha=0$ pour un solide purement élastique. Pour les cellules isolées, il est de l'ordre de 0.15 à 0.20 [Balland *et al.*, 2006].

Bien que caractéristique des cellules animales, ce comportement en loi de puissance se retrouve aussi chez certains matériaux inertes. C'est le cas par exemple de systèmes colloïdaux proches de la transition vitreuse, ou de matériaux mous vitreux comme les mousses, pâtes, émulsions [Tanaka *et al.*, 2005; Weeks, 2000]. Ces systèmes ont en commun une grande complexité structurale, où la dissipation mécanique implique des phénomènes dynamiques à différentes échelles résultant en une infinité de temps caractéristiques [Sollich *et al.*, 1997]. Il est donc naturel de supposer que c'est également le cas pour le matériau dont la cellule animale est composée, et plusieurs modèles se proposent à la théorisation d'un tel comportement [Balland *et al.*, 2006; Fabry *et al.*, 2001].

1.2.4 Mécano-sensibilité cellulaire

Si les cellules humaines ont les propriétés de matériau que nous venons de décrire, elles n'en interagissent pas moins avec les différentes matières du corps humain. Or le paysage rhéologique qu'offrent les différents types de matrices extra-cellulaires est très varié, allant de la dizaine de Pascals pour la graisse, à la centaine de kilopascals pour

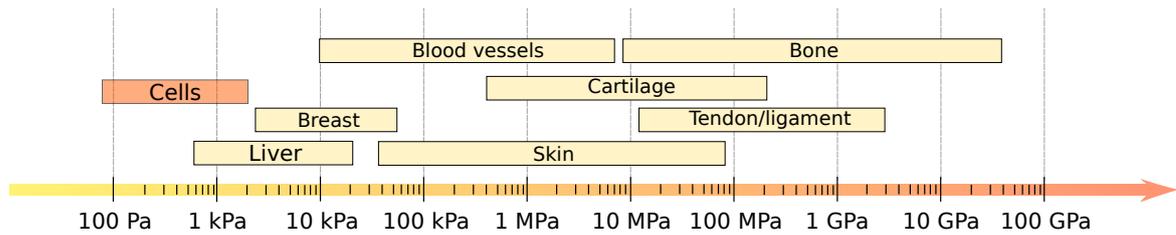


FIGURE 1.27 – Différentes raideurs des tissus du corps humain

le cartilage [Levental *et al.*, 2007] (figure 1.27). De plus, les cellules comprises dans ces matrices sont soumises à plusieurs types de sollicitations mécaniques : la gravité impose une contrainte de compression uniforme dans tout l'organisme ; la marche et la course entraînent des contraintes de compression encaissées par le cartilage des articulations ; la respiration impose aux poumons de larges contraintes de traction et cisaillement ; et les battements cardiaques déterminent l'écoulement du flux sanguin qui exerce à son tour des contraintes de cisaillement sur les parois des vaisseaux sanguins. Par ailleurs, le rythme cardiaque et la respiration s'adaptent en temps réel à l'effort, ce qui implique que l'amplitude et la fréquence de ces sollicitations soient interdépendantes.

Aussi n'est-il pas surprenant que les cellules soient capables d'une part de sentir l'environnement mécanique dans lequel elles évoluent, et d'autre part d'intégrer les sollicitations mécaniques comme des signaux influençant leur métabolisme. Ici, nous allons reprendre les preuves expérimentales qui ont permis de mettre au jour cette mécano-sensibilité cellulaire, et voir comment des stimuli mécaniques peuvent infléchir le devenir d'une cellule.

Géométrie et confinement dans l'espace

Il y a une quinzaine d'années, une technique de laboratoire a été mise au point pour déposer des protéines d'adhésion cellulaire sur des zones bien déterminées, de l'ordre de la taille cellulaire. Par cette méthode, il a été possible d'observer comment les cellules réagissaient dans un environnement confiné. La première étude de ce genre a été réalisée par Chen *et al.* [1997], qui, en cultivant des cellules endothéliales capillaires humaines sur ces micro-motifs d'aire contrôlée, ont montré que leur taux d'apoptose est d'autant plus élevé que leur étalement est frustré (figure 1.28-A). Chez ces cellules, dont le rôle physiologique est d'assurer la continuité et la cohésion d'un tissu, la probabilité de déclencher un signal de mort programmée est donc accrue dans le cas où l'étalement est impossible.

De nombreuses équipes ont ensuite repris ces techniques de micro-impression de motifs d'adhésion. Pitaval *et al.* [2010] ont montré que les cellules rétiniennees très étalées étaient beaucoup moins susceptibles de former un cil, à la fois marqueur et structure nécessaire pour l'arrêt de ces cellules entre deux cycles de division. Lorsqu'ils ont traité les cellules étalées avec des inhibiteurs de la myosine, la proportion de cellules ciliées a doublé, indiquant que la tension cellulaire empêchait en partie la formation du cil. Ils ont expliqué ceci en observant le positionnement du centrosome, qui, dans le cas étalé,

est confiné sous le noyau et ne peut conduire à la formation du cil et par conséquent à l'arrêt du cycle cellulaire (figure 1.28-B).

L'espace que les cellules occupent, et la possibilité de plus ou moins s'étaler semble donc être un élément déterminant de leur devenir. Les chercheurs ont ensuite voulu observer les modifications de l'architecture cellulaire et de la mécanique interne des cellules lors de la culture sur ces substrats d'aires contrôlées. Par exemple, Théry *et al.* [2006] ont mis en évidence que les fibres de stress s'intensifient sur les zones non-adhésives pour compenser la tension de membrane et conserver l'aire d'étalement (figure 1.28-D). En cultivant des cellules sur des micropiliers, Tan *et al.* [2003] ont montré que la force exercée par les cellules sur le substrat augmente avec l'aire d'étalement (figure 1.28-E). Une étude menée par Roca-Cusachs *et al.* [2008] a permis de corroborer ces résultats : en mesurant la rigidité du cytosquelette par AFM sur des cellules étalées sur des motifs d'aire croissante, ils ont observé que plus la cellule est étalée, plus elle est rigide, ce qui laisse à supposer que son état de tension interne est plus important (figure 1.28-C).

Tout ceci confirme une intuition de Harris *et al.* [1981] formulée il y a une trentaine d'années : en cultivant des fibroblastes sur du silicone déformable, ils avaient à l'époque observé la formation de ridules sur le substrat, qu'ils ont attribuées à des forces de traction exercées par les cellules. La culture cellulaire sur des substrats déformables s'est depuis imposée comme un outil incontournable pour étudier la mécanique et la mécano-sensibilité cellulaire.

Sensibilité de la cellule à la rigidité du substrat

Parallèlement à l'étude du rôle du confinement géométrique et des facultés d'adhésion des cellules sur leur devenir, d'autres chercheurs ont voulu déterminer si la rigidité du substrat pouvait avoir des effets similaires. En effet, les techniques classiques de biologie imposent que la culture cellulaire se déroule sur des substrats en verre ou en plastique, bien plus rigides que les rigidités physiologiques auxquelles les cellules sont susceptibles d'être exposées. Des chercheurs ont donc mis au point des hydrogels mous permettant la culture cellulaire, dont les propriétés mécaniques peuvent-être modulées pour pouvoir observer la réponse cellulaire à la rigidité.

Les plus courants sont les gels de poly-acrylamide, qui garantissent un mode de fabrication relativement facile et peu dispendieux, des caractéristiques optiques favorables à la microscopie, et une non-toxicité¹³. Ces gels sont fabriqués à partir de monomères d'acrylamide et de son réticulant, le bis-acrylamide. Pour moduler la rigidité finale du gel, qui peut s'étendre de quelques centaines de pascals à la centaine de kilopascals, il suffit de faire varier la concentration relative en monomère et réticulant [Pelham *et al.* , 1997; Grevesse *et al.* , 2013; Tse & Engler, 2010; Fischer *et al.* , 2012]. Il est ensuite possible de fonctionnaliser ces gels en couplant des molécules d'adhésion cellulaires à leur surface, le plus souvent la fibronectine. Nous reviendrons plus en détail sur les procédés de fabrication de ces gels ainsi que sur leur rhéologie au Chapitre 5 ; car nous avons nous-mêmes mis en place ces techniques lors de la dernière partie de

13. L'acrylamide est en fait hautement toxique lorsqu'il est sous forme de monomère, mais ne présente plus aucun danger une fois polymérisé.

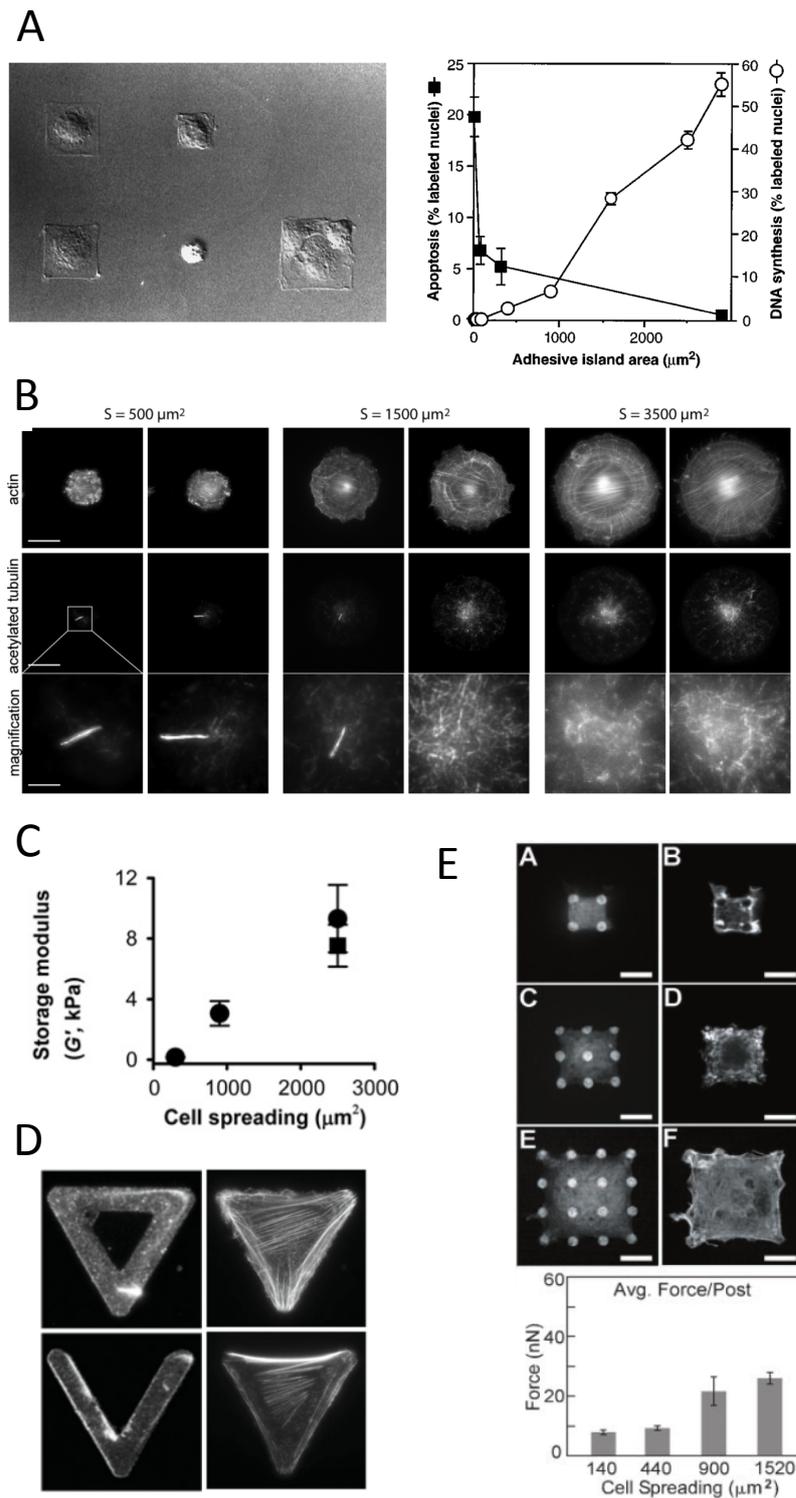


FIGURE 1.28 – **Le confinement spatial influence la vie des cellules** (A) Les cellules cultivées sur des micro-patterns (gauche) présentent un taux d'apoptose décroissant avec l'aire d'étalement [Chen *et al.*, 1997]. (B) La formation du cil lors de l'arrêt du cycle cellulaire n'est possible que lorsque les cellules sont peu étalées [Pitaval *et al.*, 2010]. (C) La rigidité cellulaire augmente avec l'aire d'étalement [Roca-Cusachs *et al.*, 2008]. (D) Les fibres de stress se concentrent sur les zones non-adhésives [Théry *et al.*, 2006]. (E) Les forces exercées par des cellules augmentent avec l'aire d'étalement [Tan *et al.*, 2003].

cette étude.

De nombreuses équipes de recherche utilisent également un autre matériau, le polydiméthylsiloxane (PDMS), qui présente l'avantage de pouvoir être réticulé par photolithographie. Il est ainsi possible de confectionner des substrats de formes variées à taille micrométrique : micro-puits, micro-canaux, micro-pilliers, etc. ; ce qui permet d'étudier le comportement des cellules sous confinement. Là aussi, la rigidité est modulable en faisant varier la concentration de réticulants, mais les rigidités obtenues s'écartent de la gamme physiologique. Pour mesurer les forces de traction cellulaires, il est également possible d'utiliser non pas des substrats continus de PDMS, mais des réseaux de piliers dont le moment de flexion est connu [Tan *et al.* , 2003; Saez *et al.* , 2007].

Pelham *et al.* [1997] furent les premiers à cultiver des cellules sur des substrats plans de rigidités différentes. Ils observèrent que les cellules étaient moins étalées et moins mobiles sur des substrats de raideur faible. Contrairement à celles cultivées sur les substrats plus rigides, ces cellules ne développaient pas de complexes d'adhésion. Les auteurs ont montré que les cellules initialement cultivées sur substrat rigide formaient le même phénotype que celles cultivées sur substrat mou lorsqu'on inhibait l'activité de la myosine, montrant ici encore le rôle de la tension du cortex dans l'activité cellulaire.

Bien des années plus tard, Solon *et al.* [2007] ont montré que l'augmentation de l'aire d'étalement sur les substrats rigides s'accompagnait d'une augmentation de la raideur cellulaire (figure 1.29-A) ; et que les cellules semblaient adapter leur raideur interne à celle à laquelle elles étaient exposées, à la manière d'un caméléon mécanique.

Si les propriétés mécaniques "statiques" des cellules (forme, rigidité) sont influencées par la nature mécanique de l'environnement, la manière dont elles exercent activement des forces, c'est à dire leur dynamique, l'est aussi. En effet, il a été mis en évidence que ces forces exercées par les cellules dépendent de la rigidité du substrat sur lequel elles se trouvent [Discher *et al.* , 2005]. Le travail effectué par Mitrossilis *et al.* [2009] au sein de notre équipe a permis de retrouver ces résultats grâce au dispositif à microplaques, en utilisant des lamelles de flexibilité variée. Mais surtout, il a été montré que le taux d'accroissement de la force (la vitesse à laquelle la cellule tire, c'est à dire la dérivée temporelle de la force, dF/dt) s'adapte à la raideur de la microplaque flexible (figure 1.29-B). De plus, en modifiant la façon dont la position des plaques rigides et flexibles sont régulées, il a été possible de modifier la raideur perçue par la cellule en temps réel. Par cette méthode, les auteurs ont montré que dF/dt s'adapte à la raideur en un temps inférieur à 0,1s, révélant ainsi que la réponse à la rigidité est purement mécanique et ne peut pas passer par des processus de régulation biologique classiques, dont les temps caractéristiques sont bien supérieurs (figure 1.29-C) [Mitrossilis *et al.* , 2010]. Ces résultats ont été reproduits peu après par Webster *et al.* [2011] à l'aide d'un dispositif similaire adapté d'un microscope à force atomique.

Ces exemples illustrent le rôle de la mécanique de l'environnement sur la mécanique interne des cellules, qu'elle soit statique ou dynamique. Mais la nature mécanique du substrat influence la vie de la cellule bien au-delà de son comportement mécanique. Les études d'Adam Engler, dans le groupe de Dennis Discher à l'Université de Penn-

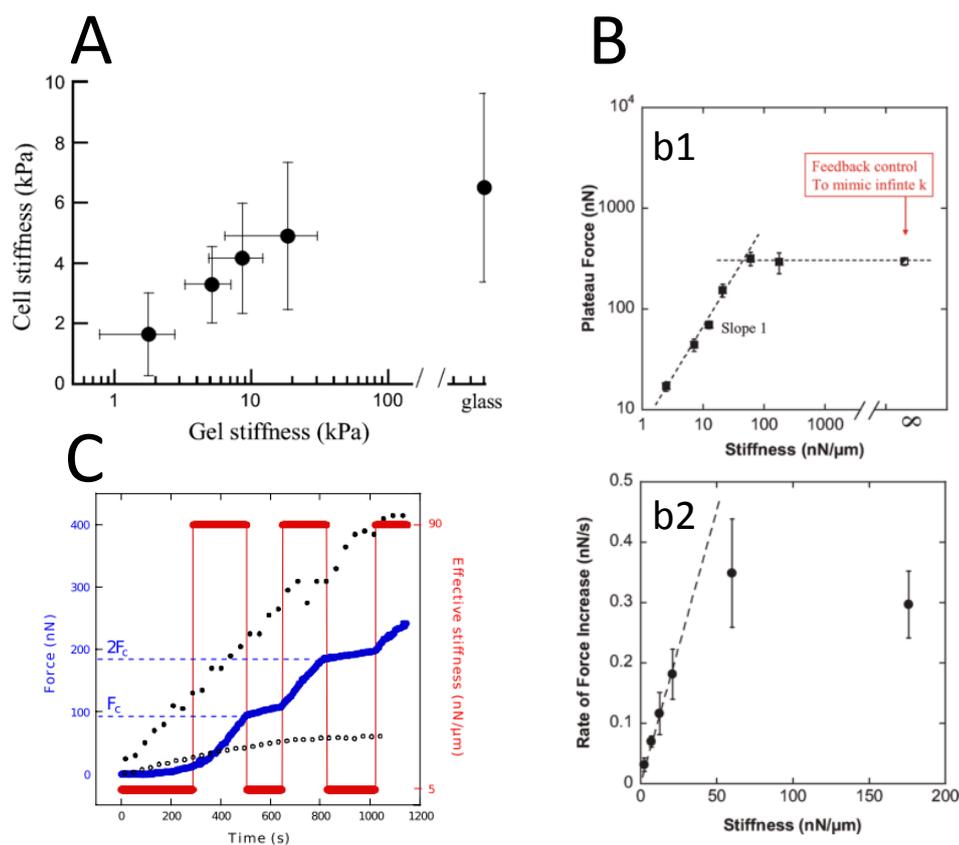


FIGURE 1.29 – **Les cellules adaptent la force exercée à la rigidité du substrat** (A) La rigidité cellulaire augmente avec celle du substrat [Solon *et al.*, 2007]; (B) La force exercée par les cellules (b1) et sa dérivée temporelle (b2) s’adaptent à la rigidité de l’environnement [Mitrossilis *et al.*, 2009]; (C) La force exercée par une cellule (bleu) s’adapte en temps réel à la raideur (rouge). Les cercles noirs, creux, et pleins représentent des courbes de traction de référence dans des conditions standards, sous raideurs constantes, dont les valeurs correspondent aux deux raideurs utilisées [Mitrossilis *et al.*, 2010].

sylvanie en est l’exemple le plus connu. Son travail a commencé par l’observation que la striation des myotubes¹⁴ était optimale lorsque les cellules étaient cultivées sur des gels dont la rigidité était équivalente à celle du muscle [Engler *et al.*, 2004]. La culture de myoblastes sur des substrats plus rigides ou plus mous donnaient bien lieu à la formation de myotubes, mais de moindre striation (voir figure 1.30-A). Il a donc supposé que la rigidité du substrat pouvait avoir une influence sur la différenciation cellulaire, ce qui l’a amené à conduire l’étude la plus spectaculaire en mécanique cellulaire de ces dernières années. Il s’est simplement procuré des cellules souches mésenchymateuses, un type de cellule souche adulte pouvant se différencier en de nombreux types cellulaires; et les a cultivées sur des substrats dont la rigidité était semblable à celle du cerveau (0.1-1kPa), du muscle (8-17kPa), ou des os (25-40kPa). Au bout d’une semaine de culture, les cellules cultivées sur des gels de la rigidité du cerveau, du muscle ou des os présentaient les caractéristiques de neurones, myoblastes ou ostéoblastes, res-

14. Les myotubes sont des cellules poly-nucléées formées par la fusion de plusieurs cellules de muscles, les myoblastes, et constituent l’étape précédant la formation de fibres musculaires.

pectivement [Engler *et al.* , 2006] (voir figure 1.30-B). Il a ensuite poursuivi ce travail en démontrant notamment que des cardiomyocytes embryonnaires reproduisaient un battement spontané physiologique lorsque cultivées sur un substrat de propriétés mécaniques semblables à celles rencontrées *in vivo*, et surtout qu'ils cessaient rapidement de battre sur des substrats de rigidité plus élevée [Engler *et al.* , 2008] (voir figure 1.30-C).

Ces travaux ont eu un grand retentissement dans la communauté. D'innombrables études illustrent désormais le rôle de la rigidité sur de nombreux processus cellulaires, comme l'apoptose [Wang *et al.* , 2000], la différenciation neurale [Saha *et al.* , 2008], la formation et la maintenance tissulaire [Guo *et al.* , 2006], la motilité cellulaire [Pelham *et al.* , 1997], etc¹⁵.

Comme ces exemples le montrent, la rigidité du matériau auxquelles les cellules sont exposées affectent leur migration, leur morphologie, la structure du cytosquelette, et l'expression génétique. L'importance de la mécanique de l'environnement cellulaire est indubitable : cela va jusqu'à influencer le cycle cellulaire, ou déterminer leur engagement dans une voie de différenciation. Et plus les recherches avancent dans ce domaine, plus le rôle des propriétés mécaniques sur les fonctions biologiques semble important.

15. Je vous invite à consulter les publications de Discher *et al.* [2005] ou de Georges & Janmey [2005] pour des revues plus complètes sur ce sujet

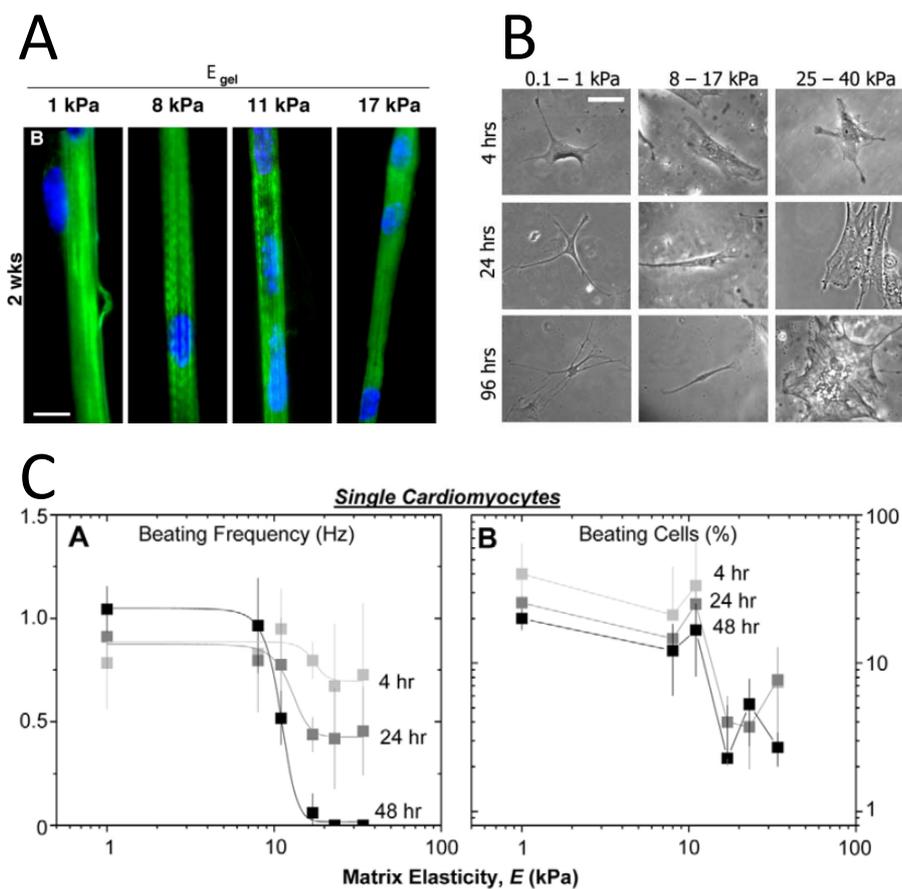


FIGURE 1.30 – **Les travaux d’A. Engler** (A) Les myotubes présentent une striation optimale sur des gels dont la rigidité est équivalente à celle des muscles [Engler *et al.* , 2004] ; (B) Des cellules souches mésenchymateuses se différencient en cellules ayant les caractéristiques de neurones, myoblastes ou ostéoblastes selon qu’elles sont cultivées sur des substrats dont la rigidité est celle du cerveau (gauche), du muscle (milieu) ou de l’os (droite) [Engler *et al.* , 2006] ; (C) La fréquence de contraction spontanée de cardiomyocytes et le nombre de cellules battant décroissent sur des substrats de rigidité élevée [Engler *et al.* , 2008].

Sensibilité à des sollicitations mécaniques

Si les cellules sont sensibles à la nature mécanique de l'environnement dans lequel elles évoluent, elles sont également capables de sentir et de répondre à des sollicitations mécaniques extérieures. Des études sur des substrats étirables ont par exemple montré que l'orientation des fibres de stress dépend de la sollicitation mécanique appliquée. Lorsque celle-ci est statique, les fibres s'orientent dans le sens de la plus grande déformation [Eastwood *et al.*, 1998]. Mais lorsque la sollicitation est dynamique, c'est à dire lorsque l'expérimentateur impose des cycles d'étirement et de relâchement à la cellule, la réorientation des fibres de stress s'effectue perpendiculairement à la direction de la sollicitation, comme si il y avait renforcement de la polarisation cellulaire dans le sens de la moindre sollicitation [Faust *et al.*, 2011; Jungbauer *et al.*, 2008; Yoshigi *et al.*, 2005] (voir figure 1.31-A). Toujours sur ces substrats étirables, Trepap *et al.* [2007] ont observé une fluidification locale du cytosquelette après étirement, et ce d'autant plus que l'étirement est grand. Après un certain temps, les cellules récupèrent leur rigidité initiale (voir figure 1.31-B). Cela suggère que l'équilibre du cytosquelette serait rompu et compromettrait transitoirement la rigidité globale de la cellule. A l'échelle locale cependant, une sollicitation mécanique par pinces magnétiques induit une rigidification du cytosquelette sous-jacent [Wang *et al.*, 1993].

Ici encore, si les sollicitations mécaniques induisent des changements sur la mécanique interne des cellules, elles ont souvent pour conséquence des modifications phénotypiques ou fonctionnelles. Par exemple, le cycle cellulaire des cellules endothéliales tapissant les vaisseaux sanguins est influencé par la nature du flux de cisaillement auquel elles sont soumises [Lin *et al.*, 2000; Akimoto *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2012]. De plus, après avoir observé une réorientation du cytosquelette dans le sens de la contrainte de cisaillement de cellules endothéliales soumises à un flux (figure 1.31-C), Garcia-Cardena *et al.* [2001] ont mis en évidence que la régulation nombreux gènes dépendait de cette sollicitation, et que l'expression de ces gènes était modifiée selon que le flux était laminaire ou turbulent, et il est désormais admis que les cellules endothéliales vasculaires sont directement sensibles au flux de cisaillement [Barakat *et al.*, 2006].

Une autre propriété particulière d'alignement a été mise en évidence grâce à ces chambres à flux. Valignat *et al.* [2013] ont en effet observé un comportement remarquable des lymphocytes T : ceux-ci orientent leur migration dans le sens du flux, mais dans la direction opposée à celui-ci, comme des saumons remonteraient le courant d'une rivière. Lorsque la direction du flux est modifiée, les cellules s'orientent pour toujours aller dans la direction opposée au courant (voir figure 1.31-D).

Enfin, Chowdhury *et al.* [2010] ont montré qu'une sollicitation mécanique locale de cellules souches embryonnaires déclenchait leur étalement, mais seulement sur des cellules non différenciées, qui sont par ailleurs dix fois moins rigides que celles différenciées. Ils ont mis en évidence l'implication de la myosine II, de l'actine ainsi que des protéines Src et Cdc42 dans ce phénomène. Plus intéressant encore, ils ont montré que l'expression du gène Oct3/4 était réduite dans les cellules sollicitées. Or une diminution de l'expression de ce gène est un marqueur de différenciation : la simple sollicitation

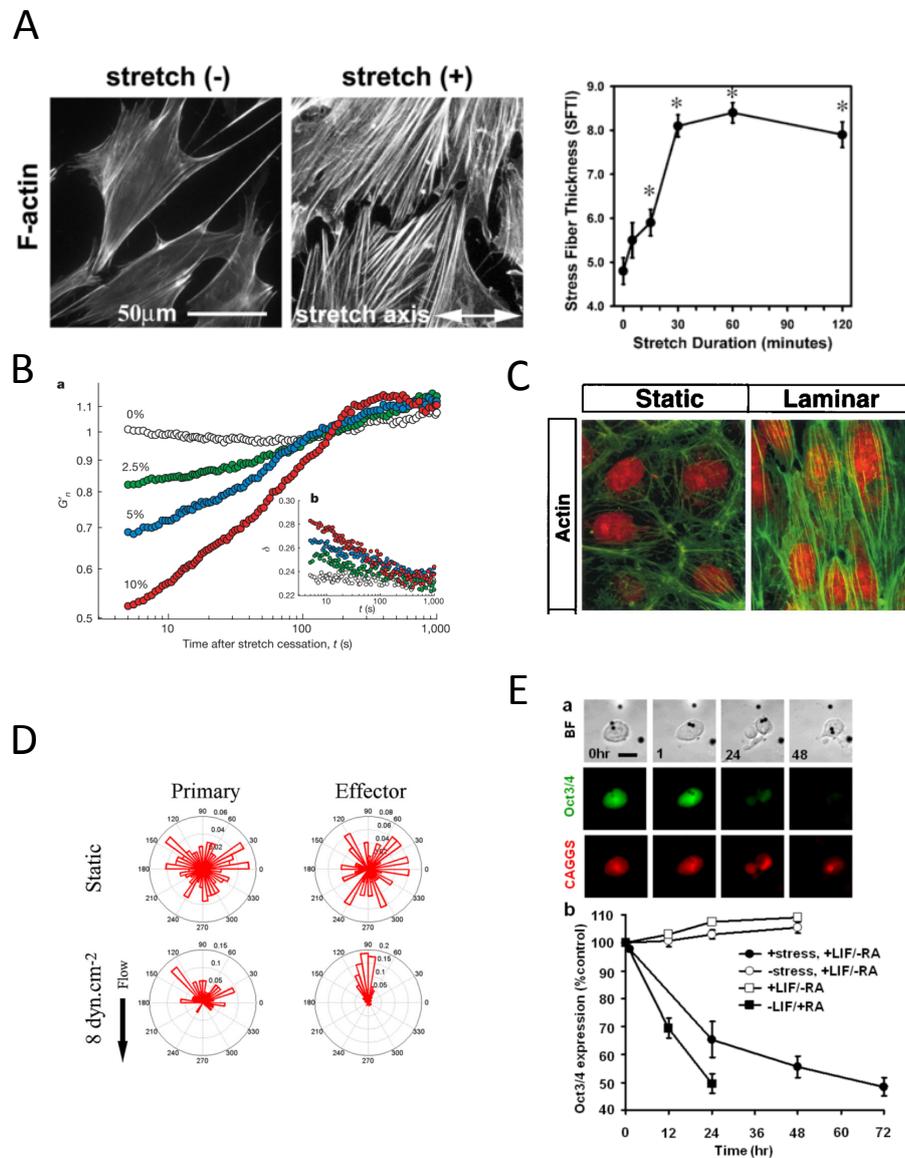


FIGURE 1.31 – **Sensibilité des cellules à une sollicitation mécanique** (A) Des fibroblastes soumis à un étirement orientent leurs fibres de stress orthogonalement au sens de l'étirement [Yoshigi *et al.*, 2005]; (B) Après un étirement, la rigidité du cytosquelette chute, et cela d'autant plus que l'étirement est grand. Le module réaugmente ensuite progressivement jusqu'à retrouver sa valeur initiale [Treatat *et al.*, 2007]; (C) Des cellules endothéliales soumises à un flux de cisaillement orientent leurs fibres de stress dans le sens de l'écoulement [Garcia-Cardena *et al.*, 2001]; (D) Des lymphocytes T primaires et effecteurs orientent leur migration dans le sens opposé au flux [Valignat *et al.*, 2013]; (E) L'expression du gène Oct3/4 est fortement diminuée après sollicitation mécanique de cellules souches embryonnaires, marquant leur entrée en différenciation [Chowdhury *et al.*, 2010].

mécanique locale d'une cellule souche suffirait donc à induire sa différenciation (voir figure 1.31-E).

Mécanotransduction : comment forces et mouvements sont-ils traduits en signaux biologiques ?

Si les propriétés mécaniques intrinsèques de l'environnement peuvent influencer la vie cellulaire, si les cellules adaptent les actions mécaniques qu'elles appliquent sur l'extérieur à la rigidité du substrat, et si les cellules peuvent sentir et répondre à des sollicitations mécaniques, alors une question naturelle s'impose : comment s'y prennent-elles ? Comment des stimuli mécaniques peuvent-ils être intégrés sous la forme de signaux biochimiques conduisant à la modulation de l'expression génétique ? De nombreuses équipes tentent d'apporter des réponses à ces questions : c'est la science de la mécano-transduction. Leurs recherches ont mis à jour deux mécanismes principaux : l'existence de canaux ioniques mécano-sensibles, et celles de protéines qui sous l'effet d'une force subissent un changement conformationnel ouvrant la voie à des cascades de signalisations biochimiques traditionnelles.

Les premiers canaux mécano-sensibles ont été observés chez la bactérie *Escherichia coli*. En mesurant directement le courant électrique au niveau d'un canal ionique (cette méthode est appelée patch-clamp), il a été possible de mettre en évidence une augmentation de la conductance suite à un changement de pression [Martinac *et al.*, 1987]. Les auteurs ont supposé que ceci permettait à la bactérie de réguler directement sa pression osmotique en actionnant mécaniquement des canaux ioniques adéquats. Par la suite, des études extensives ont dévoilé l'existence de nombreux canaux dont l'ouverture et la fermeture dépendent de conditions mécaniques. Ce sont généralement des canaux dont la structure est semblable à celle d'un diaphragme, susceptible de s'ouvrir ou de se refermer selon l'état de tension de la membrane environnante [Perozo, 2006] (voir figure 1.32-B).

Les cellules ciliées auditives sont un très bel exemple de mécano-transduction faisant également intervenir des canaux ioniques. Ce sont des cellules épithéliales très polarisées qui présentent des touffes de cils dans la lumière du conduit auditif (voir figure 1.32-A). Une onde sonore fait vibrer le tympan qui amplifie et transmet le signal sonore sous la forme d'une onde de compression qui se propage dans un liquide appelé endolymphe. Lorsque cette onde parvient aux cils des cellules auditives, ceux-ci se penchent sous l'effet du fluide. L'ingéniosité du système, si on peut parler en ces termes, tient au fait qu'une protéine relie deux cils successifs dont la taille est légèrement différente (voir figure 1.32-A). Sous l'effet du flux, les deux cils vont s'éloigner, et cette protéine va actionner un canal ionique, ce qui induit une polarisation électrochimique de la cellule. Ce signal est ensuite transmis à une synapse neuronale située au niveau basal [Hudspeth, 1989]. Plus récemment, l'équipe de A. J. Hudspeth a montré que la réponse des cils est très variée (déclenchement de signal, oscillateur actif, filtre passe-bas, etc.), et qu'elle dépend de façon très non-linéaire de la manière dont la contrainte mécanique est appliquée [Ó Maoiléidigh *et al.*, 2012].

La mécano-sensibilité des complexes d'adhésion que nous avons mentionnée plus

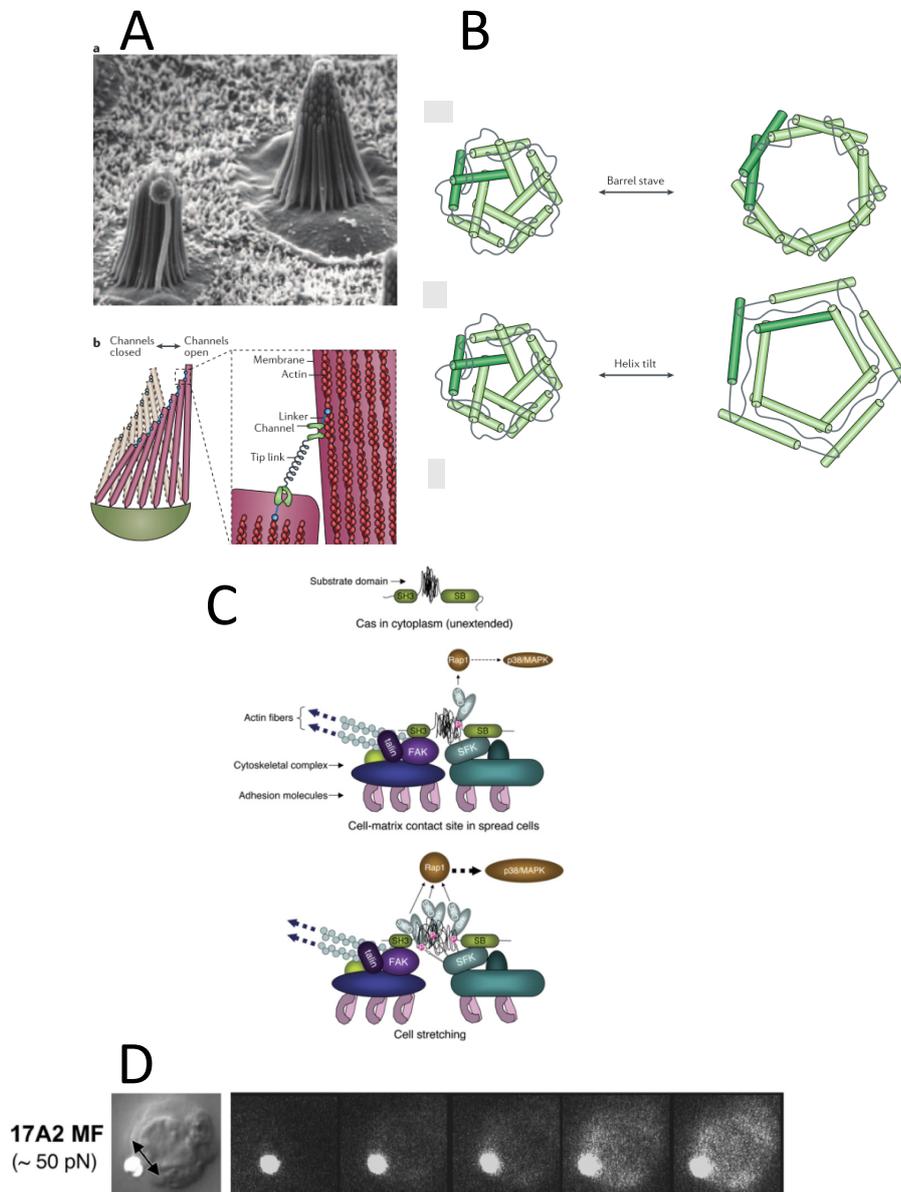


FIGURE 1.32 – Exemples de mécanotransduction (A) Haut : structure des stéréocils des cellules auditives, bas : sous l'effet de l'écoulement, les cils se penchent les uns par rapport aux autres, ce qui permet l'ouverture d'un canal ionique par une protéine [Perozo, 2006]; (B) Deux structures possibles de canaux mécano-sensibles. La forme fermée à gauche correspond à la forme au repos, qui s'ouvre sous l'effet d'une tension [Perozo, 2006]; (C) La protéine p130Cas présente dans les adhésions focales libère des sites de phosphorylation suite à une extension, ce qui déclenche une voie de signalisation [Sawada *et al.*, 2006]; (D) Recrutement de calcium dans le lymphocyte T lorsqu'une force lui est appliquée par pinces optiques [Kim *et al.*, 2009].

haut est un autre sujet suscitant des recherches très actives. Il y a quelques années, le groupe de Michael Sheetz a décrit le mécanisme de fonctionnement de la protéine p130Cas présente dans les adhésions focales [Sawada *et al.* , 2006]. Celle-ci subirait un changement conformationnel suite à l'application d'une force, ce qui libérerait des sites de phosphorylation (voir figure 1.32-C) et déclencherait une cascade de signalisation [Tamada *et al.* , 2004].

Mais ce n'est pas tout : le TCR lui-même est soupçonné de mécano-sensibilité. Kim *et al.* [2009] ont découvert que l'application d'une force par une bille manipulée par pinces optiques et recouvertes d'antagonistes du TCR pouvait déclencher un flux de calcium dans la cellule T (voir figure 1.32-D). Si les mécanismes par lequel le TCR réalise cette mécano-sensibilité restent encore incompris, de nombreuses observations indiquent que le lymphocyte T est hautement mécano-sensible. De nombreux processus de l'ordre de la modification des caractéristiques mécaniques cellulaires sont à l'oeuvre en immunologie, et de multiples indices laissent à penser que le lymphocyte T est non seulement mécano-sensible, mais surtout que cette propriété est centrale pour son activation. Ces préoccupations sont précisément celles de notre étude, aussi la section suivante est-elle dédiée à la description de la littérature existante sur ces phénomènes.

1.3 Mécanique cellulaire et immunité, du dialogue entre mécanique et biologie

Bien entendu, les cellules du système immunitaire n'échappent pas à cette mécano-sensibilité, et un certain nombre d'études plus ou moins récentes ont mis en évidence l'importance de ces signaux d'origine mécanique dans les processus immunitaires. Ici, nous allons voir quels sont les indices motivant la recherche de mécano-sensibilité du lymphocyte T.

1.3.1 Activation du LT et mécanique cellulaire

Rôle du cytosquelette dans l'activation du Lymphocyte T

La première observation allant en ce sens est que le cytosquelette d'actine joue un rôle essentiel dans la synapse, où elle s'accumule [Smith-Garvin *et al.* , 2009; Valitutti *et al.* , 1995; Piragyte & Jun, 2012]. Il a d'ailleurs été montré que lors de l'activation du lymphocyte T par une cellule dendritique, le cytosquelette de la cellule dendritique subissait un remodelage profond et intensif, faisant intervenir la fascine, et que ce remodelage est nécessaire pour l'activation du lymphocyte T [Al-Alwan *et al.* , 2001].

En particulier, la déplétion de l'actine polymérisée par la cytochalasine D empêche l'activation du lymphocyte T [Henney & Bubbers, 1973; Holsinger *et al.* , 1998]. En outre, les premières phases d'adhésion nécessitent la présence de l'intégrine LFA1, qui se stabilise ensuite dans le premier anneau de la synapse (pSMAC) [van der Merwe, 2002; Monks *et al.* , 1998]. A cet anneau d'intégrines du pSMAC correspond un anneau d'actine sous-jacent, qui a été remarqué dès les premières observations de la synapse [Ryser *et al.* , 1982] (voir figure 1.33-A) et pourrait servir de support de l'anneau de LFA1 peut-être par l'intermédiaire de la taline, une protéine présente dans les complexes d'adhésions [Monks *et al.* , 1998]. Cet anneau proviendrait de l'effet cumulé d'une polymérisation active sur le pourtour de la zone d'engagement des récepteurs, où la molécule Arp2/3 serait impliquée, et d'une dépolymérisation dans la zone centrale de l'interface [Bunnell *et al.* , 2001; Burkhardt *et al.* , 2008] (voir figure 1.33-A (haut)).

Par ailleurs, comme nous l'avons vu plus haut la formation de la synapse nécessite des transports actifs de molécules. Ces transports ont été attribués à un flux rétrograde d'actine [Kaizuka *et al.* , 2007b], et les différences de vitesse entre l'actine et les molécules qu'elle transporte (voir figure 1.33-B) suggèrent un mécanisme de transport par friction. Ce transport actif nécessite l'engagement de protéines co-stimulatrices, et requiert la présence de la myosine [Wülfling, 1998; Ilani *et al.* , 2009].

Plus récemment, Yi *et al.* [2012] ont fourni une analyse plus fine de l'interaction actine-myosine à la synapse. Ils ont proposé notamment que la contraction d'arcs d'acto-myosine orthoradiaux semblables à ceux observés à l'extrémité protrusive des cellules migrantes [Burnette *et al.* , 2011] pouvait expliquer une partie des mouvements observés dans le pSMAC, tandis que la dynamique des agrégats protéiques du dSMAC correspondrait au flux rétrograde d'actine. D'après cette étude, la structure du cytosquelette s'apparente à celle de la lamelle et du lamellipode des cellules migrantes, dans le pSMAC et le dSMAC respectivement (voir figure 1.33-C ; ainsi que [Hammer & Burkhardt, 2013]). Cependant, si les scientifiques convergent sur l'existence de myosine II

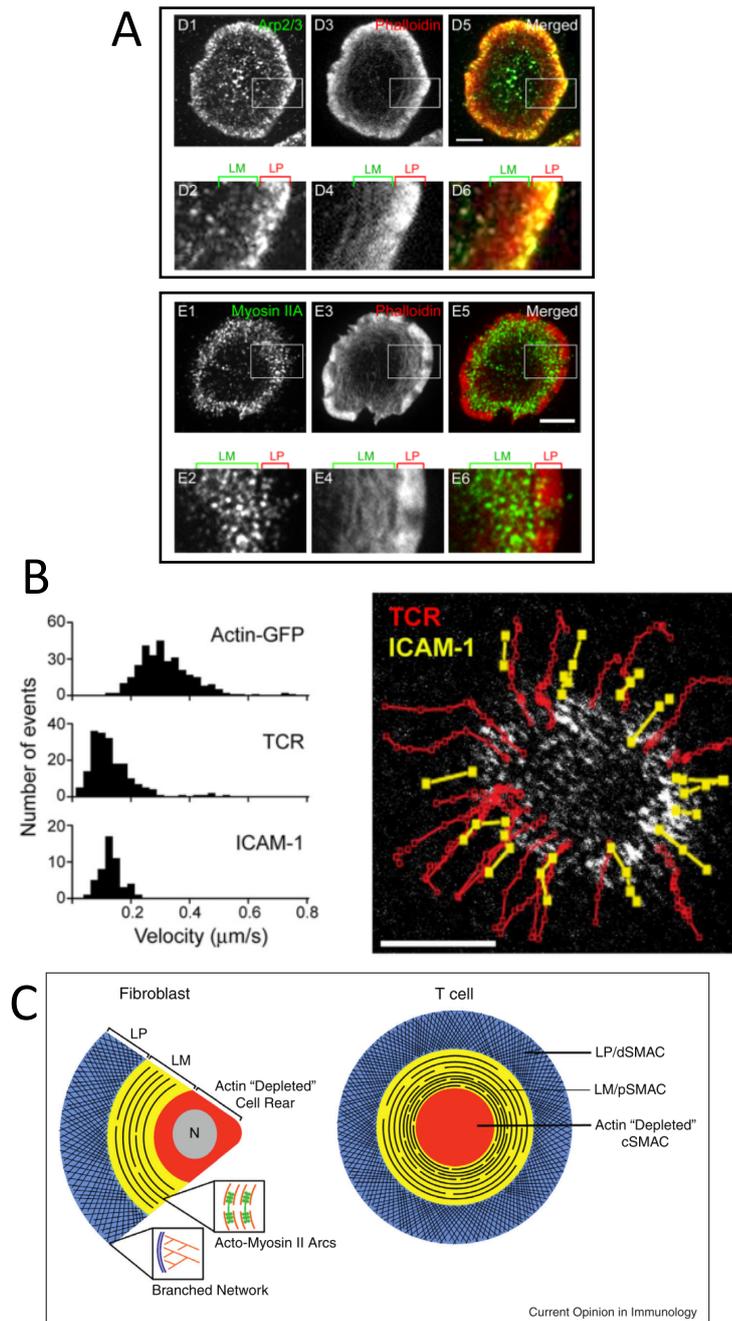


FIGURE 1.33 – **Le rôle de l’actine à la synapse immune** (A) L’actine s’organise en une structure en anneau au pourtour du centre d’activation supramoléculaire central de la synapse (cSMAC). La protéine Arp2/3 est co-localisée à l’extrémité de la zone d’adhésion, correspondant au centre d’activation supramoléculaire distal (dSMAC) (haut), tandis que la myosine est co-localisée dans une région plus interne correspondant au centre d’activation supramoléculaire périphérique (pSMAC) [Yi *et al.* , 2012] ; (B) Mouvement centripètes du TCR et de l’ICAM1 observés par l’étalement de lymphocytes T sur une bicouche-lipidique (cellules Jurkat). Le TCR et l’ICAM1 ont une vitesse environ deux fois inférieure à celle du flux d’actine rétrograde [Kaizuka *et al.* , 2007a] ; (C) Vue schématique faisant le parallèle entre les structures observées dans des fibroblastes migrants (gauche) et la synapse immune (droite). La zone centrale dépourvue d’actine est entourée par des arcs orthoradiaux d’actomyosine, puis par une structure d’actine branchée lamellipodiale [Hammer & Burkhardt, 2013].

dans l'anneau périphérique de la synapse (pSMAC), ils divergent quant à son importance et son rôle précis dans la signalisation du lymphocyte T : à ce jour, les études portant sur son implication dans le transport actif des complexes de micro-clusters au centre de la synapse sont contradictoires [Hammer & Burkhardt, 2013].

Le remodelage du cytosquelette à la synapse est le résultat de nombreux processus de régulation intensivement étudiés, et faisant intervenir (entre autres) les protéines de la famille WASP, Cdc42, Src et le TCR lui-même [Piragyte & Jun, 2012]. Une activation réussie du lymphocyte T nécessite donc l'intervention active et régulée du cytosquelette, ce qui constitue notre premier indice de la mécano-sensibilité du lymphocyte T.

Considérations géométriques

L'engagement prolongé du TCR est essentiel pour l'activation de la cellule T. Pour autant, de nombreux obstacles d'ordre spatial s'opposent à la stabilité du complexe TCR-CMH. De nombreuses glycoprotéines très encombrantes, comme CD45 constituent une barrière stérique au TCR qui lui, est très court [Davis & van der Merwe, 1996]. Par ailleurs, le TCR a une affinité très faible avec le complexe peptide-CMH [Davis & van der Merwe, 1996; Davis *et al.*, 1998]; et si les molécules du CMH sont très nombreuses à la surface des cellules présentatrices, celles portant le peptide complémentaire au TCR sont très rares [Wang & Gulden, 1997].

La faible affinité du TCR pour le CMH semble être surmontée par une extrême sensibilité du lymphocyte T à l'engagement du TCR. Les travaux de Jay Groves et de son équipe, à l'Université de Californie à Berkeley apportent des informations intéressantes autour de ces questions. Ils ont mis au point un système de bicouches lipidiques dont la mobilité dans le plan est modulée par la présence de micro-grilles de chrome. Grâce à ces grilles, ils ont pu isoler spatialement les molécules du CMH présentes dans la bi-couche lipidique et contrôler leur nombre dans chaque carré de la grille [Manz *et al.*, 2011]. Par cette méthode, ils ont montré que le seuil d'activation est de l'ordre de 4 molécules du CMH par TCR, et que la présence de co-stimulateurs (CD28 et CD80) peut faire descendre ce seuil. Sur ces membranes où la mobilité du TCR est restreinte, ils ont par ailleurs observé une réduction du flux d'actine rétrograde, indiquant une inter-régulation entre les mouvements du TCR et ceux de l'actine [Yu *et al.*, 2010]. Il a également été montré que la liaison d'un seul complexe TCR-CMH-peptide suffit à déclencher des événements de signalisation [Irvine *et al.*, 2002; Sykulev *et al.*, 1996]. Une autre équipe a plus récemment montré qu'un seul complexe peptide-CMH pouvait déclencher la production de certaines cytokines par des cellules CD4⁺ de souris [Huang *et al.*, 2013], confirmant l'extrême sensibilité du lymphocyte T à la sollicitation du TCR.

Ensuite, l'engagement du TCR induit l'exclusion des grandes glycoprotéines accusées d'encombrement stérique à l'extérieur de la synapse. Ceci permet aux deux membranes de se rapprocher et fournit une situation plus favorable à la rencontre CMH-peptide, donc à l'engagement de plusieurs TCR et à l'amplification du signal [Sperling & Sedy, 1998] (voir figure 1.10). Si les mécanismes d'exclusion ne sont pas élucidés pour toutes les grandes glycoprotéines présentes à la surface du lymphocyte T,

celui concernant la mise à l'écart de CD43 a été intensivement étudiée. Comme nous l'avons mentionné plus haut, son exclusion se fait par l'intermédiaire des ERM, notamment la moesine, qui est capable de lier le domaine cytoplasmique de CD43. L'engagement du TCR déclenche une déphosphorylation des ERM qui détache la membrane du cytosquelette. Il a été proposé que cette déphosphorylation puisse libérer CD43 de son ancrage au cytosquelette, pour ensuite lui permettre de diffuser rapidement hors de la zone synaptique. La re-phosphorylation successive des ERM (plus précisément de la moesine) à l'extérieur de la synapse conduit à la stabilisation de la localisation de CD43 qui deviennent de nouveau liés au cytosquelette [Delon *et al.* , 2001]. Cependant, bien qu'il a longtemps été supposé que CD43 agissait comme un régulateur négatif qu'il fallait exclure de la zone de signalisation pour permettre l'activation, il semble maintenant que le rôle de CD43 dans l'activation du lymphocyte T soit paradoxalement lié à son domaine cytoplasmique, sans que le rôle de son très grand domaine extracellulaire ne soit complètement élucidé [Mody *et al.* , 2007].

Le détachement du cytosquelette de la membrane cellulaire a un autre effet tout aussi nécessaire à la mise en place de la synapse immune. Cela permet à l'actine néopolymérisée (notamment par Arp2/3) de pousser la membrane et d'entamer une phase d'étalement [Faure *et al.* , 2004]. L'étalement de la cellule T sur la cellule présentatrice est primordial pour la mise en place de la synapse, car cela augmente l'aire de contact entre les deux cellules, et donc la probabilité de rencontre TCR/CMH.

L'équipe de Mark Davis a observé un phénomène impressionnant qu'ils ont également attribué à la nécessité d'augmentation de l'aire de contact. Au cours d'une étude visant à dégager les différentes étapes de la mise en place de la synapse immune, par des observations précises en microscopie électronique à balayage et à transmission couplées à des reconstructions tomographiques ; ils ont observé lors de la phase la plus précoce de la mise en place de la synapse, la présence de pseudopodes et d'excroissances, riches en actine, formant des invaginations très profondes et pouvant aller jusqu'au niveau du noyau de la cellule présentatrice [Ueda *et al.* , 2011] (voir figure 1.34). Selon eux, ceci permettrait d'augmenter très significativement l'aire de contact entre les deux cellules (ici entre lymphocyte T / lymphocyte B) et de favoriser la rencontre TCR/CMH. Cette étape est ensuite suivie d'une phase où l'interface de contact est très lisse, et les microtubules et organites très polarisés entre le noyau et la zone de contact.

Cela dit, quand bien même la cellule B de la lignée utilisée serait extrêmement molle par rapport à la cellule T, la formation de ces pseudopodes et cette invasion spectaculaire ne peut se faire sans l'implication de forces, puisqu'il y a déformation significative de la cellule présentatrice. Ceci constitue notre deuxième indice suggérant la mécano-sensibilité du lymphocyte T. Nous savons donc désormais que le lymphocyte T est capable d'exercer des forces, et je vous propose maintenant de passer en revue les autres éléments dont nous disposons à ce sujet.

Forces impliquées lors de l'activation

Citons d'abord l'étude qui a été à l'origine de cette thèse. Peu avant mon arrivée au laboratoire, Husson *et al.* [2011], dans l'équipe de Claire Hivroz, ont mesuré les forces

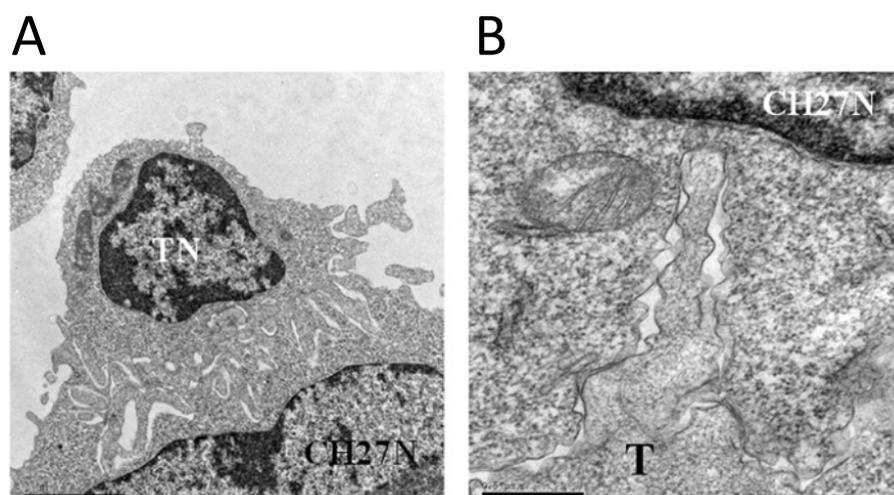


FIGURE 1.34 – **Invaginations membranaires à l’interface entre lymphocyte T et cellule présentatrice** (A) De nombreuses invaginations membranaires sont observées entre un lymphocyte T helper et un lymphocyte B (lignée CH27) - barre $2\mu\text{m}$; (B) les pseudopodes pénètrent très profondément dans le cytoplasme de la cellule présentatrice, sans qu’aucune des membranes ne soit endommagée, atteignant presque le noyau - barre 500nm [Ueda *et al.* , 2011].

exercées par le lymphocyte T durant l’activation précoce. Ils ont utilisé pour cela un système de micropipette, où le globule rouge servant de sonde élastique était fonctionnalisé à l’aide d’une bille recouverte de protéines activatrices (anticorps anti-CD3) ; faisant ainsi office de cellule présentatrice artificielle. La force appliquée par le lymphocyte T sur la sonde est mesurable d’après la différence de pression à la sortie de la micropipette. En modifiant la pression de succion, il a ensuite été possible de modifier la raideur apparente de la sonde et d’enregistrer la réponse du lymphocyte T à la raideur. Les auteurs ont ainsi pu faire plusieurs observations intéressantes. Premièrement, après une courte phase de latence, le lymphocyte T exerce des séquences de forces de poussée et de traction. L’apparition des forces de poussée sont suivies par l’entrée d’un flux de calcium dans la cellule, marqueur d’activation précoce (figure 1.35-A). Ces forces sont en fait exercées par une protrusion riche en actine (figure 1.35-B), qui disparaît si les cellules sont traitées avec la Latrunculine, un inhibiteur de la polymérisation de l’actine. La costimulation par LFA1 réduit la vitesse des forces de poussée et raccourcit leur durée, sans influencer les forces de traction ni changer le signal calcique. Enfin, le taux de génération de la force de traction (dF/dt) augmente avec la raideur de la sonde, d’une manière remarquablement comparable avec les observations de Mitrossilis *et al.* [2009] dans l’équipe d’Atef Asnacios (voir comparaison figure 1.35-C). C’est suite à ces observations que les deux chercheurs ont décidé de mettre en place une collaboration, à l’origine de cette thèse.

Une étude similaire a mis en évidence des forces de poussée transitoire lors de l’activation du lymphocyte T par une cellule présentatrice, mesurées par AFM [Hosseini *et al.* , 2009]. Cependant ici, l’inhibition du couplage LFA1-ICAM1 a suffi pour abolir ces forces. Une étude publiée tout récemment a également mesuré les forces exercées par la cellule T lors de son activation, mais par une toute autre méthode [Bashour

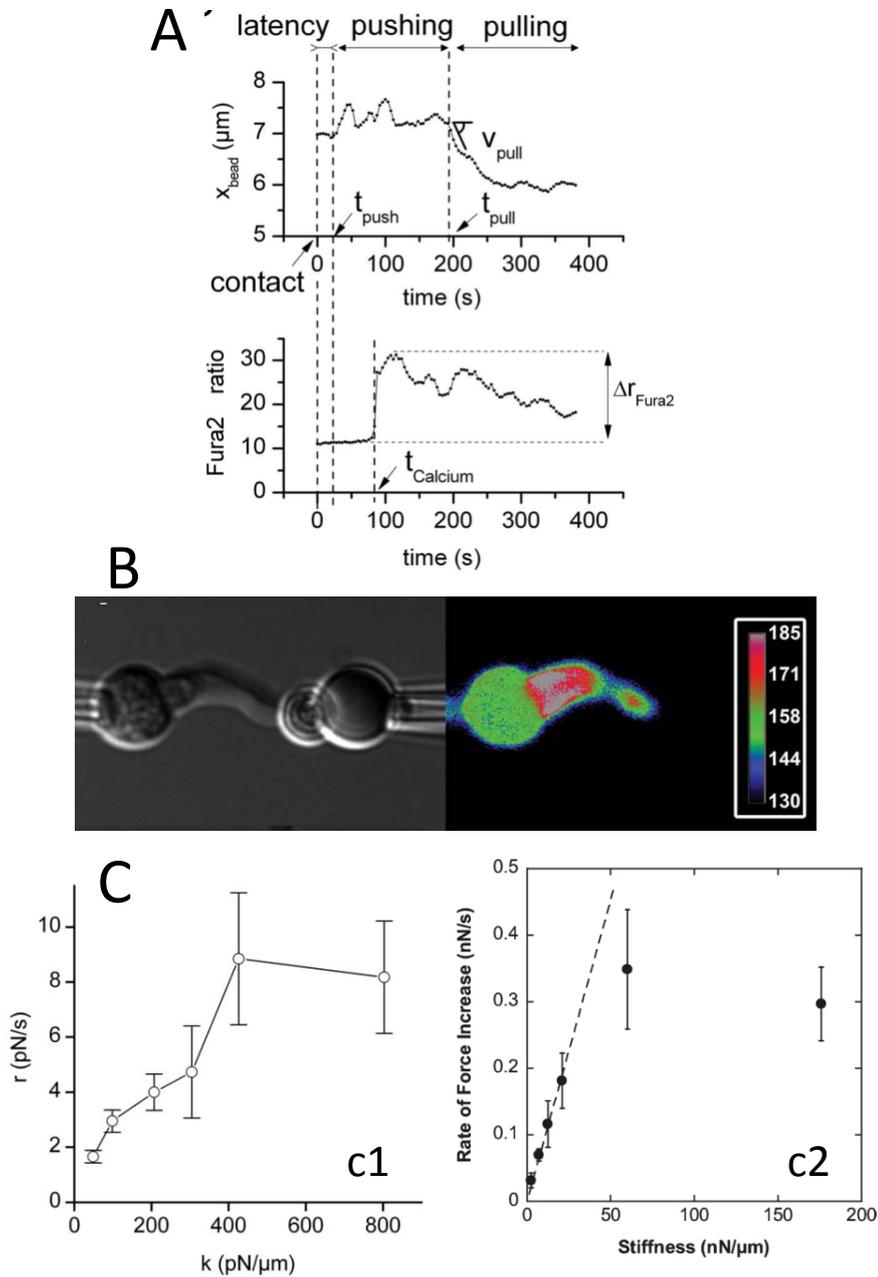


FIGURE 1.35 – **Etude de Husson *et al.* [2011] sur les forces générées par la cellule T** (A) Le lymphocyte T exerce des forces de poussée et de traction, successivement (haut) ; l'initiation des forces de poussées sont suivies par une augmentation du calcium intra-cellulaire (bas) ; (B) Les forces sont exercées par une trompe riche en actine (échelle de couleur : intensité du fluorophore fixé à l'actine polymérisée) ; (C) Le taux de génération de la force de traction dépend de la raideur de la sonde (c1) ; et suit la même tendance que ce qu'observé par Mitrossilis *et al.* [2009] avec des myoblastes par le dispositif à microplaques (c2).

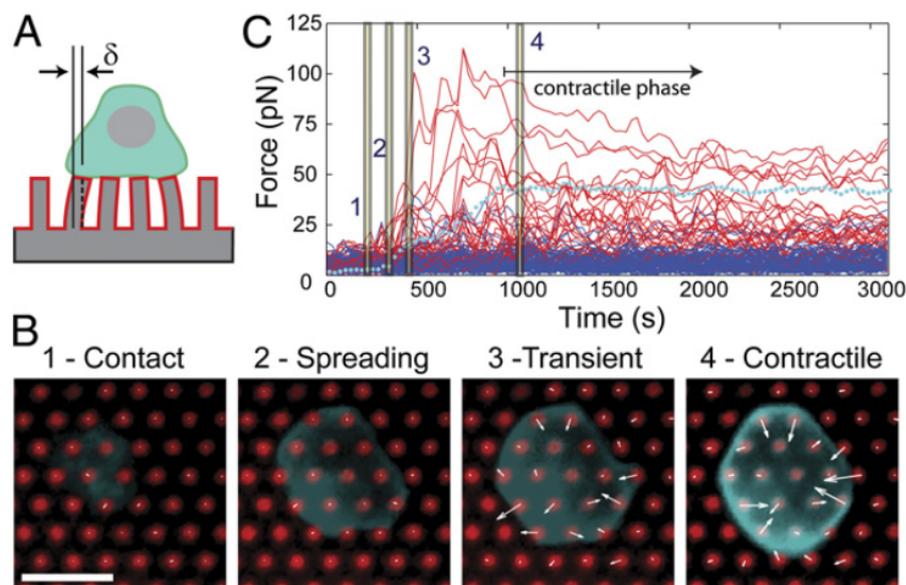


FIGURE 1.36 – Cellules T cultivées sur des réseaux de micropiliers (A) La déflexion des micropiliers permet de mesurer les forces exercées par le lymphocyte T. (B) le lymphocyte T (bleu) interagit avec les piliers recouverts de CD3 et CD28 (rouge) selon quatre phases successives : 1) contact initial; 2) étalement rapide; 3) forces aléatoires; 4) contraction stable. Barre $5\mu\text{m}$. (C) Représentation de la force sur chaque pilier en fonction du temps. La ligne en pointillés bleus montre la moyenne, et les courbes bleues le niveau de bruit (piliers extérieurs à la cellule) [Bashour *et al.*, 2014].

et al., 2014] (voir figure 1.36). Des lymphocytes T primaires humains ont été déposés sur un réseau de micro-piliers de PDMS recouverts de protéines activatrices (anti CD3 seul ou anti CD3 + anti CD28). Nous avons brièvement mentionné ce système au paragraphe 1.2.4 : il permet de mesurer les forces lors de l'étalement cellulaire, en mesurant la déflexion des micro-piliers dont le module de flexion est par ailleurs connu. Après une phase de contact, d'étalement rapide et de génération de forces dans des directions aléatoires, les auteurs ont observé une phase où les cellules exercent une traction stable et centripète sur les piliers. Cette cinétique s'apparente à celle observée par Trichet *et al.* [2012] sur des fibroblastes, mais l'ordre de grandeur des forces exercées est mille fois plus petit. Les auteurs ont par ailleurs montré que l'amplitude de ces faibles forces de traction était presque doublée lorsque les piliers étaient recouverts de molécules co-stimulatrices (anticorps anti-CD28). Ils ont obtenu les mêmes résultats en diffusant cet anti-CD28 dans le milieu de culture au lieu de le présenter uniquement au niveau des piliers. Ils en ont déduit que le lymphocyte T exerce les forces à travers le TCR seul, et que l'augmentation de forces par la co-stimulation est due à des événements de signalisation plutôt qu'à l'engagement d'un second récepteur susceptible de transmettre des forces conjointement.

En réalité, les forces mises en jeu au niveau du TCR pourraient jouer un rôle central dans l'activation du lymphocyte T. Il y a quelques années, Ma *et al.* [2008] ont proposé un modèle selon lequel des forces mécaniques de traction ou de poussée seraient à

l'origine de l'activation du TCR. Cela pourrait se produire par une déformation directe du TCR se répercutant sur les domaines intracellulaires de CD3, par un changement de position relative entre le TCR et le CD3, par un changement conformationnel sur les co-récepteurs CD4 ou CD8, ou encore directement sur CD3. Quelle qu'elle soit, cette modification stérique aurait pour effet de libérer des sites de phosphorylation au niveau des motifs ITAMs du domaine cytoplasmique du CD3, déclenchant ainsi la cascade de signalisation. Mais ce modèle n'était à l'époque qu'une hypothèse, certes très séduisante, mais sans aucune preuve expérimentale pour l'appuyer.

Un an plus tard seulement, Kim *et al.* [2009] ont apporté la première preuve de la mécano-sensibilité du TCR. Ils ont montré qu'un anticorps du CD3 dont la structure ne permettait pas de déclencher l'activation du lymphocyte T devenait activateur lorsqu'il était couplé à une force appliquée par pinces optiques, indiquant que le mode d'activation du TCR était probablement dû à quelque phénomène mécanique. Un an plus tard encore, Li *et al.* [2010] ont retrouvé un résultat semblable, mais sur des cellules de la lignée Jurkat, et par un tout autre dispositif expérimental. Ils ont fait exprimer à des fibroblastes 3T3 des anticorps dirigés contre CD3 afin de les utiliser comme cellules présentatrices artificielles. Celles-ci étaient bien capables de déclencher l'activation du lymphocyte T par liaison entre le TCR et le CD3. Ils ont ensuite construit une protéine hybride pour modifier l'agencement stérique de l'anti-CD3 exprimé par les fibroblastes en le fusionnant à la longue protéine CD43, toujours exprimée à la surface des fibroblastes. Cette sonde hybride n'était pas capable d'activer la cellule T, sauf lorsqu'un flux de cisaillement était rajouté au système. Ils ont par ailleurs observé que cette activation par stimulus mécanique n'était possible que lorsque le TCR était sollicité, et n'avait pas lieu lorsque la même expérience était réalisée à travers des co-stimulateurs tels que CD28 ou ICAM1, allant dans le même sens que les observations de Bashour *et al.* [2014] sur les micro-piliers.

Sensibilité du lymphocyte T à la rigidité du substrat

Voici à peu près l'état de l'art au moment où cette thèse a débuté : rôle prépondérant du cytosquelette dans la mise en place de la synapse immune ; considérations géométriques intrigantes à la synapse ; et importance de forces moléculaires et cellulaires mises en jeu lors de l'activation. Depuis, quelques études ont mis en évidence la sensibilité du lymphocyte T à la rigidité du substrat - indice supplémentaire de sa sensibilité potentielle à la rigidité de la cellule présentatrice lors de l'activation - en cultivant les lymphocytes T sur des substrats de poly-acrylamide ou de PDMS de rigidité variable.

Judokusumo *et al.* [2012] ont déposé des lymphocytes T isolés de ganglions lymphatiques de souris sur des gels de poly-acrylamide de rigidité variant de 10 à 200kPa, recouverts d'anticorps dirigés contre CD3 et CD28, et ont observé une augmentation de la sécrétion de l'interleukine 2 avec la rigidité (figure 1.37-A), prouvant ainsi la mécano-sensibilité de l'activation du lymphocyte T tant soupçonnée. Ces observations corrélaient avec l'absence de phosphorylation de protéines en aval de la cascade de signalisation du TCR (Zap70 et la famille des protéines Src) sur le gel le plus mou et

leur présence sur les gels plus rigides. L'inhibition de la myosine par l'ajout de blebbistatine a suffi pour suspendre cette mécano-sensibilité, suggérant un rôle de l'activité contractile de la myosine dans ce mécanisme. Quelques mois plus tard, une autre étude a pourtant apporté des résultats contradictoires : cette fois, sur des substrats de PDMS recouverts des mêmes molécules, de rigidité allant de 100 à 10 000 kPa, O'Connor *et al.* [2012] ont observé une diminution de la sécrétion d'IL2 avec la raideur (figure 1.37-B).

Suite à ces observations, nous pouvons faire plusieurs remarques. Premièrement, la nature du polymère présenté peut être à l'origine des deux tendances observées. Ensuite, s'il s'avérait que ces deux tendances soient retrouvées sur un gel de même nature physico-chimique, nous pourrions supposer que le lymphocyte T a une sensibilité optimale autour de la centaine de kPa, puisque ces deux études recouvrent des gammes de raideur qui se complètent. Ceci étant dit, les gammes de rigidité choisies dans ces deux études sont bien au delà de la rigidité physiologique des cellules isolées, de l'ordre de quelques centaines de Pascals [Balland *et al.* , 2006] ; et comme nous le verrons au Chapitre 2, de la rigidité des cellules présentatrices avec lesquelles le lymphocyte T interagit.

Ces deux études nous ont en fait coupé l'herbe sous le pied, puisque nous comptions faire - et avons fait - des expériences similaires, mais souhaitions identifier au préalable quelle gamme de rigidité le lymphocyte T était susceptible de rencontrer *in vivo*. Une des questions que nous nous sommes notamment posées au commencement de cette thèse était de savoir si les cellules présentatrices d'antigène peuvent avoir des modifications de leurs propriétés mécaniques en fonction des conditions inflammatoires dans lesquelles elles se trouvent. Effectivement, nous allons maintenant voir comment l'inflammation peut engendrer des modifications de la structure mécanique de cellules isolées.

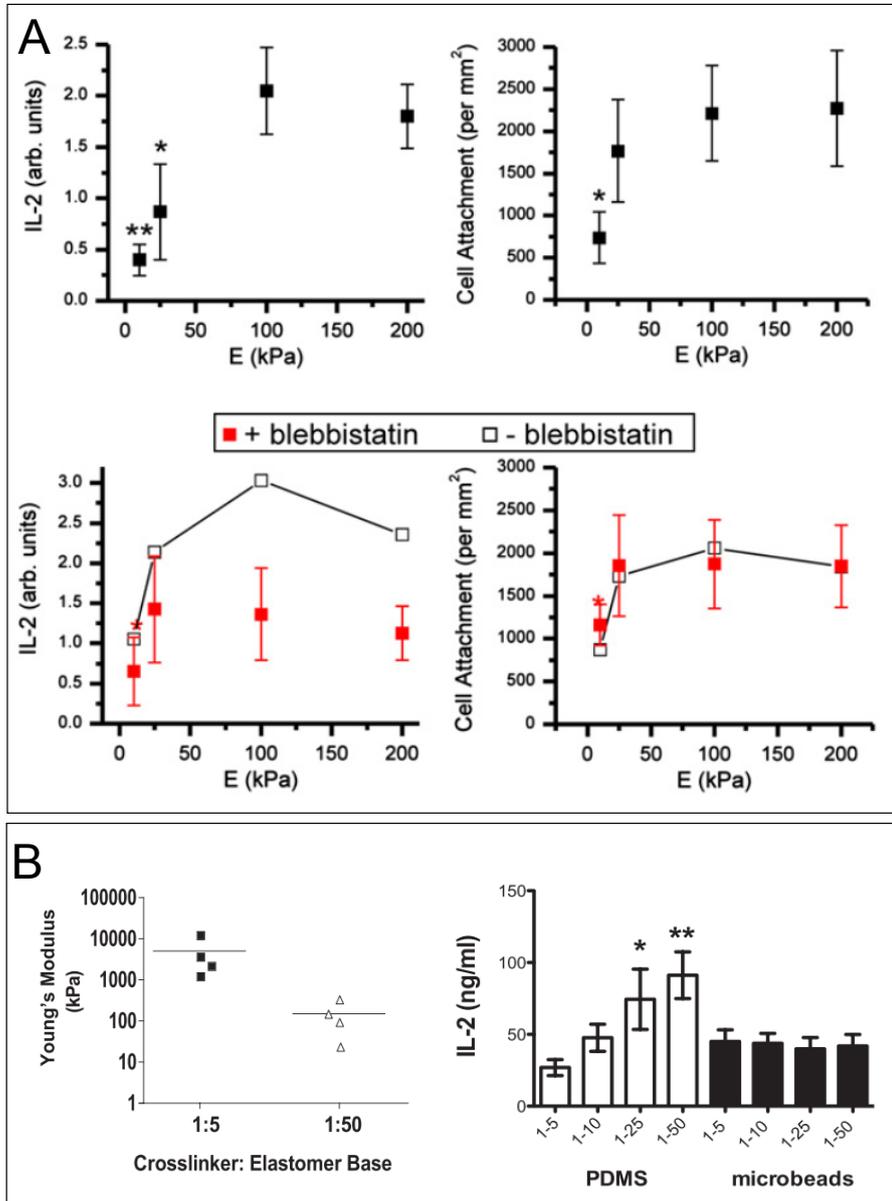


FIGURE 1.37 – **Rigidité et activation du lymphocyte T** (A) Les lymphocytes T cultivés sur des gels de poly-acrylamide de rigidité allant de 10 à 200kPa présentent un attachement et une sécrétion d’IL2 qui augmente avec la raideur. Ces tendances sont abolies lors de l’ajout de blebbistatine, un inhibiteur de la myosine Judokusumo *et al.* [2012]. (B) Une étude similaire sur des substrats de PDMS de rigidité allant de 100 à environ 10 000 kPa montre une tendance opposée : la sécrétion de cytokines augmente avec la dilution du rapport cross-linker/monomère (donc la diminution de la rigidité) [O’Connor *et al.* , 2012].

1.3.2 Mécanique cellulaire, pathologie et immunité

Preuves de l'importance des propriétés mécaniques cellulaires dans certaines pathologies

Un certain nombre de pathologies se traduisent par des modifications mécaniques à l'échelle cellulaire dont les conséquences peuvent-être dramatiques pour l'individu atteint. La plus connue, et aussi la plus spectaculaire, en est certainement la drépanocytose, ou anémie falciforme. Les personnes atteintes produisent une forme altérée d'hémoglobine, dont la forme désoxygénée a la fâcheuse propriété de polymériser pour former des longues fibres. Ces fibres déforment l'érythrocyte pour lui conférer une forme de faucille (figure 1.38-A), et leur rigidité est bien plus grande que celle des cellules saines [Maciaszek & Lykotrafitis, 2011] (figure 1.38-B). Ce changement de forme, et surtout la perte de déformabilité, est à l'origine non seulement d'une perte fonctionnelle du transport d'oxygène, mais surtout, peut amener les cellules déformées à boucher des capillaires et vaisseaux sanguins, pouvant provoquer des infarctus. Cette pathologie pour laquelle la mécanique cellulaire est au premier plan est la première maladie génétique en France, et touche 300 000 personnes chaque année dans le monde.

De façon similaire, il a été montré que les cellules cancéreuses issues d'échantillons humains ont une rigidité de l'ordre de 70% inférieure à celles des cellules saines [Cross *et al.*, 2007] (figure 1.38-C). Ceci est d'autant plus spectaculaire que les différents types de cancers observés lors de cette étude (poumons, sein, pancréas) présentent tous cette même caractéristique. La diminution de la rigidité des cellules cancéreuses, c'est à dire une augmentation de leur déformabilité peut être à l'origine de la facilité avec lesquelles ces cellules peuvent, après détachement, migrer et former des métastases, et est donc au centre des enjeux majeurs de la lutte contre le cancer. De nombreuses autres observations ont été faites sur des cellules cancéreuses, provenant principalement de lignées humaines et murines, qui illustrent une grande diversité des effets de ce type de pathologie sur la mécanique cellulaire [Suresh, 2007]. Enfin, il a également été observé que des traitements par chimiothérapie pouvaient augmenter la rigidité cellulaire [Lam *et al.*, 2007].

Les conditions inflammatoires peuvent influencer les propriétés mécaniques cellulaires

Or, comme nous l'avons vu au tout début de ce chapitre, l'inflammation est un processus immunitaire qui accompagne de nombreuses pathologies. Dans ce cas, est-il possible que les conditions inflammatoires elles-mêmes puissent engendrer des modifications mécaniques, aux conséquences dommageables pour l'organisme? Plusieurs exemples ont déjà été observés et permettent de répondre par l'affirmative à cette question.

En effet, des modifications de propriétés mécaniques cellulaires sous l'effet de cytokines inflammatoires ont été observées à plusieurs reprises et semblent impliquées dans des pathologies variées [Inoue *et al.*, 2006; Lavkan *et al.*, 1998]. En particulier, Trepatt *et al.* [2005] ont observé une augmentation de la rigidité des cellules épithéliales sous

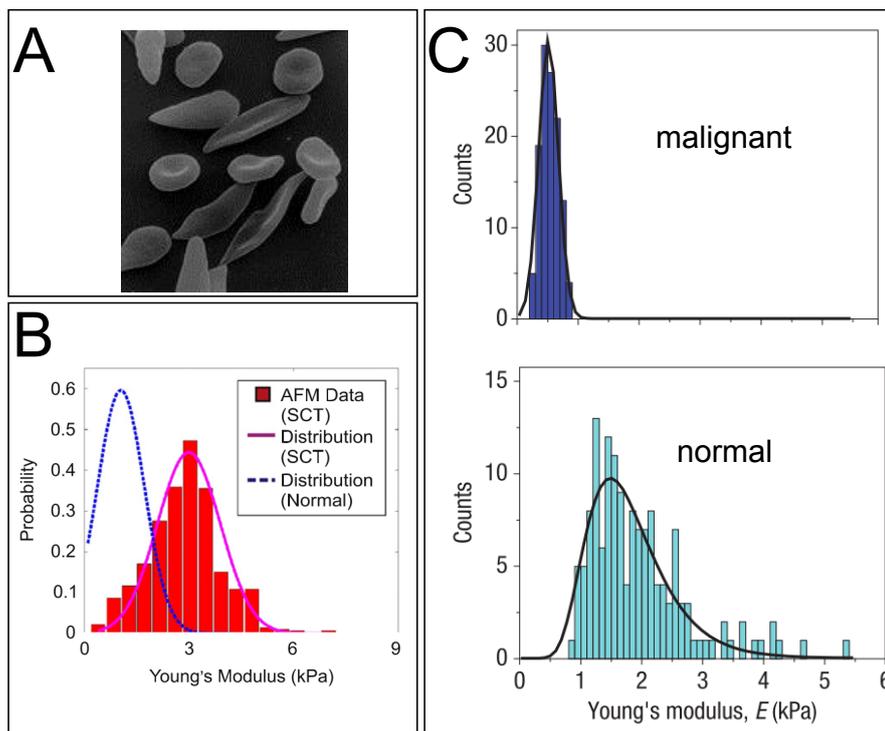


FIGURE 1.38 – **Implication de la mécanique cellulaire dans des pathologies**
 (A) Les érythrocytes de patients atteints d’anémie falciforme ont une forme altérée due à une polymérisation de l’hémoglobine dans leur cytoplasme (Image : wikimedia commons). (B) Cette altération conduit à une augmentation de la rigidité des cellules atteintes par rapport aux cellules normales [Maciaszek & Lykotrafitis, 2011]. (C) L’analyse de la rigidité de cellules provenant d’échantillons cancéreux humains a révélé une perte de rigidité des cellules cancéreuses [Cross *et al.* , 2007].

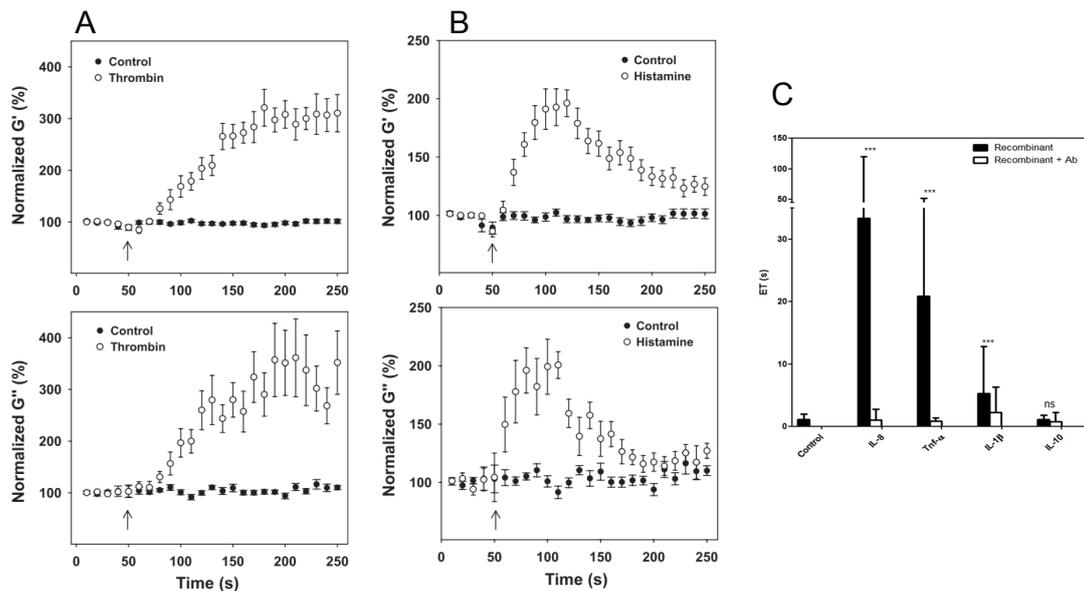


FIGURE 1.39 – Des cytokines inflammatoires peuvent influencer la rigidité cellulaire (A-B) Rigidification permanente de l'ordre de 300% lors de l'incubation de cellules alvéolaires épithéliales par la thrombine d'une part (A) et transitoire de l'ordre de 200% lors de l'incubation avec l'histamine d'autre part [Trepap *et al.* , 2005]. (C) Influence de certaines cytokines impliquées dans le syndrome de détresse respiratoire aiguë sur la rigidité de cellules d'une lignée monocyttaire [Preira *et al.* , 2012].

l'effet de la thrombine et de l'histamine, deux cytokines inflammatoires présentes en cas de réaction allergique. L'ajout de ces cytokines dans le milieu de culture a induit une augmentation rapide des modules de reprise élastique G' et de perte G'' ¹⁶, transitoire dans le cas de l'histamine mais persistante pour la thrombine (figure 1.39-A& B). Cette rigidification pourrait-être un des mécanismes conduisant à l'augmentation de la perméabilité épithéliale observée lors de l'atteinte pulmonaire aiguë, où thrombine et histamine sont impliquées. De façon similaire, des récents travaux conduits par Preira *et al.* [2012] ont montré qu'un certain nombre de cytokines impliquées dans le syndrome de détresse respiratoire aiguë induisait une rigidification cellulaire (figure 1.39-C), qui pourrait être responsable de la séquestration des leucocytes dans les réseaux capillaires, à l'origine de cette pathologie.

Mécanique cellulaire des cellules immunitaires

Des chercheurs se sont bien entendu penchés sur la caractérisation mécanique des cellules hématopoïétiques. Cela a commencé avec l'observation des neutrophiles, probablement parce que leur rôle de primo-arrivant sur les sites infectieux leur confère une attractivité intellectuelle particulière. Dès 1998, Lavkan *et al.* [1998] ont observé une baisse de déformabilité lorsque les neutrophiles étaient incubés en présence d'un certain nombre de cytokines, dont le $TNF\alpha$, en mesurant leur propension à passer un filtre de diamètre calibré [Lavkan *et al.* , 1998]. Cette méthode de filtre a largement été

16. Modules de reprise élastique et module de perte représentent rigidité et viscosité pour un matériau visco-élastique. Tout ceci est expliqué en détail au paragraphe 2.1.2.

utilisée et a permis par exemple à Tufail *et al.* [2000] d'identifier un temps de passage plus élevé pour des cellules infectées par le HIV que pour des cellules saines, qu'ils ont attribué à une perte de déformabilité. Roca-Cusachs *et al.* [2006] ont plus tard mesuré les propriétés mécaniques des neutrophiles par AFM, dont le module a été estimé à environ 900Pa.

En comparaison, il a été observé que les macrophages¹⁷ sont dix fois plus résistants à la déformation que les neutrophiles [Lam *et al.* , 2009], et des mesures effectuées par microplaques sur des macrophages alvéolaires de souris ont confirmé cette observation en mesurant un module de l'ordre de 2kPa, bien plus élevé que la moyenne des cellules uniques [Balland *et al.* , 2006]. Enfin, une étude publiée lors de la deuxième année de cette thèse a montré que le LPS et l'IFN γ induisaient une augmentation de la rigidité de macrophages issus d'une lignée murine¹⁸ [Patel *et al.* , 2012]. Bien qu'aucune quantification absolue ne soit donnée, ces résultats ont conforté en cours de route la pertinence de notre étude.

Plus généralement, l'équipe de Jochen Guck a mené des études sur l'évolution des propriétés mécaniques lors de la différenciation des cellules myéloïdes. Ils ont notamment étudié des cellules de leucémie lymphoblastique aiguë, utilisées comme un modèle pour la différenciation en neutrophiles. Ces cellules montrent une baisse de rigidité lorsqu'elles sont incubées en présence d'une molécule induisant leur différenciation [Lautenschläger *et al.* , 2009]. Dans une autre étude, parue encore une fois lors de la deuxième année de cette thèse, les auteurs ont comparé la déformabilité de monocytes, macrophages et neutrophiles primaires humains ainsi qu'une lignée utilisée couramment pour l'étude de la différenciation des cellules myéloïdes. Ils ont observé que les macrophages avaient une rigidité augmentée par rapport aux cellules de cette lignée, alors que monocytes et neutrophiles montraient au contraire une raideur plus faible, les neutrophiles étant encore plus mous que les monocytes [Ekpenyong *et al.* , 2012].

Ces considérations sur les propriétés mécaniques des cellules myéloïdes et leur réponse à l'inflammation constituent notre dernier indice motivant cette étude sur la mécano-sensibilité du lymphocyte T : celui-ci est donc *vraiment* susceptible de rencontrer des cellules de rigidité différente, et il ne semble pas fantaisiste de supposer qu'il pourrait y être sensible.

17. Lignée de macrophages J774 de souris

18. RAW 264.7.

1.4 Conclusions et objectifs de la thèse

Que nous reste-t-il, si nous faisons le bilan de ce long chapitre énumératif? Nous venons de voir d'une part que le système immunitaire est d'une extrême complexité, et que son bon fonctionnement requiert des dialogues cellulaires intenses. Plus particulièrement, l'activation du lymphocyte T, qui est l'évènement initiateur de la réponse immunitaire adaptative, requiert la mise en place d'une interface de contact très spécifique entre cellule présentatrice d'antigène et lymphocyte T. Ce contact est une zone de signalisation très intense, prolongée, et le bon dialogue intercellulaire nécessite la mise en place de structures très précises et hautement organisées.

D'autre part, le champ de la mécanique cellulaire nous apprend que les cellules sont sensibles aux propriétés mécaniques de leur environnement : le confinement géométrique et la rigidité du substrat peuvent en influencer le devenir, et elles sentent et répondent à des sollicitations mécaniques extérieures. De plus, de nombreux indices convergent pour suggérer la mécano-sensibilité du lymphocyte T lui-même, et certaines expériences démontrent que cette mécano-sensibilité serait présente jusque dans la structure même du TCR.

Par ailleurs, il est également possible d'accéder à des quantifications mécaniques du matériau cellule, et les propriétés visco-élastiques cellulaires sont si importantes dans le fonctionnement physiologique qu'elles peuvent être à l'origine de pathologies très sévères. En outre, les conditions inflammatoires qui accompagnent une infection sont susceptibles de modifier les propriétés mécaniques de certaines cellules, et provoquer ainsi des dysfonctionnements pouvant mettre en péril la vie de l'individu. Or les cellules myéloïdes sont en première ligne dans des environnements inflammatoires, et elles sont à même de voir leur rigidité affectée par un certain nombre de cytokines.

Alors comment la mécanique cellulaire intervient-elle dans l'activation du lymphocyte T? Les cellules présentatrices d'antigène ont-elles des propriétés mécaniques différentes? Ces propriétés mécaniques sont-elles modifiées en condition inflammatoires? Si le lymphocyte T est mécano-sensible, jusque dans la structure même du TCR, et si par ailleurs les cellules avec lesquelles il interagit ont des propriétés mécaniques diverses influencées par des conditions inflammatoires, alors est-il possible que l'activation du lymphocyte T soit sensible à la nature mécanique de la cellule avec laquelle il dialogue? En d'autres termes, la rigidité des cellules présentatrices constitue-t-elle un signal en soi pour l'activation du lymphocyte T? Ou, plus modestement, conditionne-t-elle le signal transmissible?

Voilà ce à quoi nous avons cherché à répondre : le but de cette thèse a été de mesurer les propriétés visco-élastiques de cellules hématopoïétiques humaines primaires isolées, d'évaluer l'influence de l'inflammation sur la rigidité de ces cellules présentatrices, et d'établir le lien fonctionnel entre rigidité des cellules présentatrices et activation du lymphocyte T.

Pour ce faire, notre premier objectif a été de dresser l'état des lieux sur les cellules dont nous disposons. Nous travaillons sur des cellules primaires humaines sur lesquelles des mesures de rigidité n'avaient pas été conduites auparavant. Nous avons donc commencé par mesurer, avec le dispositif à microplaques, les rigidités des monocytes, macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes T, ainsi qu'une lignée cellulaire appelée

Jurkat qui constitue un modèle pour l'étude des lymphocytes T en laboratoire. Ces résultats seront présentés au chapitre 1.

Ensuite, nous avons étudié l'influence de l'inflammation sur les propriétés mécaniques des cellules présentatrices d'antigène (macrophages et cellules dendritiques). Pour cela, nous avons identifié quelques cytokines dont les effets sur ces types cellulaires sont très importants : l'IFN γ , facteur de dialogue cellulaire intense et d'activation des macrophages, le cocktail TNF α +PGE $_2$ permettant d'obtenir des phénotypes de cellules dendritiques matures *in vitro*, et le LPS, facteur d'inflammation d'origine bactérienne. Nous verrons au chapitre 3 que ces cytokines ont bel et bien un effet sur la rigidité des cellules présentatrices, mais dont le degré est modulé en fonction de la pertinence physiologique du stimulus sur chaque type cellulaire. Nous avons notamment observé que les cellules dendritiques incubées en présence de TNF α +PGE $_2$ étaient celles dont la rigidité se rapproche le plus de la rigidité des cellules T. Ceci est très intéressant, dès lors qu'on se souvient que parmi les cellules présentatrices choisies, ce sont également le type cellulaire le plus efficace dans la présentation antigénique.

Au vu de ces résultats, nous avons exploré quelques pistes pour tenter de formuler une explication en terme de composition du cytosquelette pour expliquer les différences mécaniques observées entre cellules présentatrices d'antigène. Le chapitre 4 rassemblera ces tentatives d'interprétations et d'explications que nous avons fournies aux observations, parfois déconcertantes, réalisées lors de l'étude de l'influence des cytokines inflammatoires sur la rigidité des cellules dendritiques et macrophages. Le début de ces recherches a coïncidé avec l'arrivée dans l'équipe de M. Michael Saïtakis, chercheur post-doctorant fournissant l'expertise complémentaire à la mienne pour répondre à ces questions. Aussi un certain nombre des résultats présentés seront le fruit de son travail.

Pour finir, afin de déterminer si le lymphocyte T est susceptible de discriminer la nature de la cellule présentatrice en fonction d'informations d'origine mécanique, ou plutôt afin d'établir si la rigidité à laquelle il est confronté influence l'activation du lymphocyte T, nous avons, M. Saïtakis et moi, mis au point un protocole pour la fabrication de gels de poly-acrylamide de très faible rigidité. Ces gels ont été fonctionnalisés avec des protéines activatrices et co-stimulatrices du TCR, et nous avons mesuré plusieurs signaux d'activation des lymphocytes T en fonction de la rigidité du substrat sur lesquels ils étaient déposés. Ceci sera présenté au chapitre 5, à la suite duquel nous tenterons de fournir de nouvelles perspectives par une discussion autour de tous les résultats rassemblés dans cette étude.

CHAPITRE 2

Mesure des propriétés mécaniques de cellules présentatrices d'antigène et lymphocytes T

Sommaire

2.1	Le rhéomètre à cellule unique (ou dispositif à microplaques)	85
2.1.1	Dispositif expérimental	85
2.1.2	Les différents tests effectués	86
2.2	Mesure des propriétés mécaniques de différentes cellules présentatrices d'antigène	92
2.2.1	Préparatifs à l'expérience	92
2.2.2	Résultats expérimentaux	93
2.3	Propriétés mécaniques du lymphocyte T	100
2.4	Macrophages : de faibles propriétés contractiles	106
2.5	Conclusions du chapitre et perspectives	109

Nous rentrons désormais dans le vif du sujet, à savoir les premières mesures des propriétés mécaniques des cellules présentatrices d'antigène. La lignée monocyttaire que nous avons étudiée permet d'accéder, en laboratoire, à des populations de cellules dendritiques et de macrophages dont les caractéristiques sont semblables à celles des cellules dendritiques et macrophages circulant dans nos organes, sans avoir à les extraire de ces tissus profonds, mais en les différenciant à partir de monocytes directement prélevés dans le sang humain. Les lymphocytes T quant à eux sont présents en très grande quantité dans le sang, dont il suffit de les extraire. Ce sont ces cellules, monocytes, macrophages et cellules dendritiques de la lignée monocyttaire, et lymphocytes T primaires, que nous avons choisi d'étudier.

Nous consacrerons la première partie de ce chapitre à la description du dispositif expérimental que nous avons utilisé : le rhéomètre à cellule unique, ou dispositif à microplaques. Nous en présenterons brièvement le principe avant de détailler les différents tests mécaniques effectués au cours de cette thèse : analyse mécanique dynamique, compression simple et mesures de forces de traction cellulaire.

Nous présenterons ensuite les premiers résultats de cette étude. Nous verrons que les différences morphologiques entre monocytes, cellules dendritiques, macrophages et lymphocytes T chez l'être humain s'accompagnent de différences de propriétés mécaniques importantes. Enfin, nous nous attarderons sur le comportement contractile des macrophages, que nous mettrons en relation avec leur rôle de phagocyte.

2.1 Le rhéomètre à cellule unique (ou dispositif à microplaques)

2.1.1 Dispositif expérimental

Principe

Comme nous l'avons mentionné plus haut, le dispositif à microplaques permet de manipuler des cellules isolées et de déterminer leurs propriétés mécaniques. C'est un outil très versatile, grâce auquel il est possible d'effectuer différents tests rhéologiques sur des cellules isolées.

Les différentes expériences réalisables avec ce dispositif reposent toutes sur le même principe élémentaire aux études rhéologiques dont nous avons déjà parlé : appliquer une contrainte et mesurer une déformation, ou bien l'inverse, pour pouvoir les relier et établir ainsi une loi de comportement du matériau.

Pour cela, la cellule est capturée entre deux plaques parallèles dont une est rigide et indéformable, tandis que l'autre est flexible. Le module de flexion k de cette dernière est calibré, c'est à dire que l'on connaît la force appliquée pour obtenir une déflexion donnée. Au cours des expériences, un capteur optique mesure cette déflexion δ au plus proche de la cellule, et nous en déduisons la force qui s'y applique : $F = k\delta$. L'expérimentateur peut agir sur cette force afin de déformer la cellule de manière contrôlée, pour en tirer les informations qui l'intéressent selon le cas.

Accéder directement à la force en temps réel permet de s'affranchir de modélisations trop complexes et d'être au plus près du comportement du matériau. Une boucle de rétro-action permet par ailleurs d'agir sur les plaques souples et rigides en temps réel à travers une programmation logicielle. Ainsi nous pouvons réaliser une série de tests rhéologiques classiques (contrainte ou déformation imposées, analyse fréquentielle) semblables à ceux pratiqués depuis longtemps sur des matériaux inertes à l'échelle macroscopique.

Microplaques

Les microplaques sont fabriquées *in situ* en étirant des lamelles de verre en les chauffant. Les lamelles sont ensuite coupées et soudées à chaud sur des capillaires pour obtenir une forme coudée permettant de les positionner quasi-horizontalement au fond de la cuve (Figure 2.1). Ce processus est manuel, ce qui nous permet de contrôler précisément les caractéristiques des lamelles.

L'angle que fait la lamelle avec le capillaire peut-être modulé, mais surtout, la longueur de la lamelle souple permet de moduler sa raideur. La résistance des matériaux nous apprend en effet que, pour une poutre en porte-à-faux, la flèche δ , c'est à dire la déflexion maximale à l'extrémité libre de la poutre, s'exprime simplement en fonction de la force appliquée F :

$$\delta = \frac{FL^3}{3EI} \quad (2.1)$$

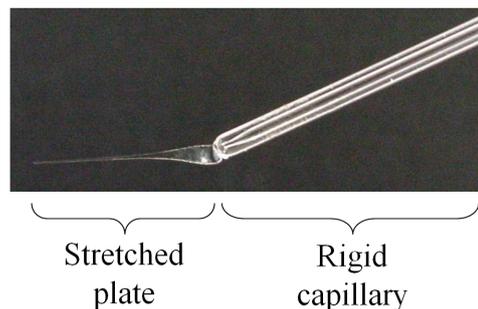


FIGURE 2.1 – **Microplaque** Les microplaques utilisées sont fabriquées à partir de lamelles en verre que l'on étire à travers une résistance chauffante. Elles sont ensuite soudées à des capillaires. Ce processus de fabrication est manuel, ce qui permet de leur donner une forme adaptée à l'appareil.

où L est la longueur de la poutre, E son module d'Young et I son moment quadratique, c'est à dire un coefficient prenant en compte sa géométrie¹. On voit donc que flèche et force sont reliés par un coefficient de proportionnalité, que l'on appelle module de flexion :

$$k = \frac{3EI}{L^3} \quad (2.2)$$

Ce module de flexion décroît donc avec la longueur, de manière très sensible puisqu'il est inversement proportionnel au cube de celle-ci, et nous utilisons cette propriété pour obtenir des lamelles de raideur variable.

A la fabrication, l'épaisseur, la largeur et surtout la longueur des lamelles ne sont pas finement contrôlées, et il est nécessaire de mesurer leur module de flexion avant de pouvoir les utiliser. C'est l'opération de calibration qui est décrite en Annexe A : la lamelle est calibrée contre une lamelle de référence, elle-même calibrée en posant à son extrémité des petits morceaux de fil de cuivre dont la masse est connue [Desprat *et al.*, 2006].

2.1.2 Les différents tests effectués

Analyse mécanique dynamique

L'analyse mécanique dynamique est une méthode très répandue en rhéologie des matériaux visco-élastiques. Elle consiste ici encore en l'application d'une contrainte ou d'une déformation contrôlée, et en la mesure de la grandeur complémentaire. Mais sa spécificité tient au fait que la sollicitation appliquée est sinusoïdale, ce qui permet d'accéder aux propriétés dynamiques du matériau : le module visco-élastique complexe. Dans le domaine de la biomécanique cellulaire, ce module visco-élastique complexe se note avec la lettre G , qui est en rhéologie traditionnelle classiquement associée à un module de cisaillement (forces appliquées parallèlement à la surface de l'échantillon).

1. Pour une poutre de section rectangulaire, $I = \frac{bh^3}{12}$ où b et h désignent la largeur et la hauteur de la section de la poutre, respectivement.

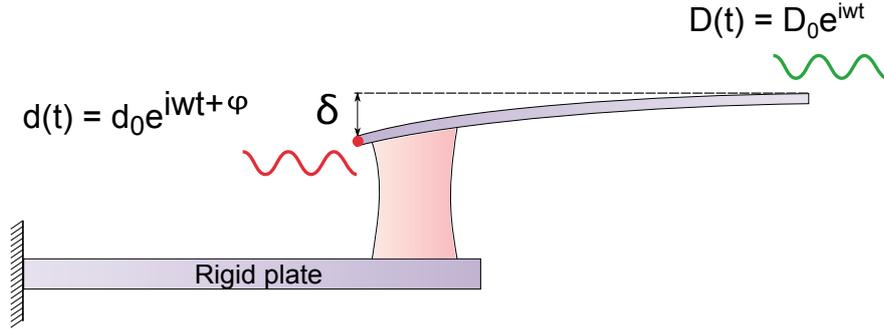


FIGURE 2.2 – **Analyse mécanique dynamique** Le principe de l’analyse mécanique dynamique est appliqué à une cellule unique par le dispositif à microplaques. Les plaques sont recouvertes de protéines promouvant l’adhésion cellulaire (fibronectine, par exemple). Une sollicitation sinusoïdale de pulsation ω , $D(t) = D_0 e^{i\omega t}$, est appliquée en entrée et la réponse au niveau de la cellule $d(t) = d_0 e^{i\omega t + \varphi}$ est enregistrée. Le rapport des amplitudes D_0/d_0 et la différence de phase φ permettent d’évaluer les modules de reprise élastique G' et de perte G'' (les détails du calcul sont présentés en Annexe B).

Il s’agit bien ici d’un module obtenu par des sollicitations normales (forces perpendiculaires à la surface), qu’il faudrait en toute rigueur noter E^* , mais que nous notons G^* par souci de cohérence avec la communauté scientifique. Les détails d’obtention de ce module sont donnés en Annexe B. Nous mentionnerons simplement ici que le module visco-élastique complexe G^* est, comme son nom l’indique, de nature complexe, et qu’il se décompose par essence en une partie réelle et une partie imaginaire :

$$G^* = G' + iG'' \quad (2.3)$$

La partie réelle G' est désignée par le terme de module de reprise élastique, et caractérise l’élasticité (stockage de l’énergie) de la cellule, tandis que G'' , module de perte, donne une information sur son caractère dissipatif. Ces deux modules sont homogènes à une pression, et s’expriment donc en Pascals. Comme il l’est décrit en Annexe B, ces modules peuvent-être directement déduits des rapports d’amplitude et de phase entre la sollicitation appliquée à la lamelle $D(t)$ et la réponse $d(t)$ mesurée au niveau de la cellule (Figure 2.2).

Par ailleurs, leur valeur dépend de la fréquence à laquelle la sollicitation sinusoïdale est appliquée. Nos expériences consistent donc à mesurer pour chaque cellule la valeur des modules G' et G'' en fonction de la fréquence f . Comme nous l’avons mentionné au premier chapitre (paragraphe 1.2.3), il se trouve que pour les cellules isolées, le module visco-élastique complexe varie en loi de puissance avec la fréquence de la sollicitation. Nous pouvons donc écrire :

$$\begin{cases} G'(f) = \overline{G'} f^\alpha \\ G''(f) = \overline{G''} f^\alpha \end{cases} \quad (2.4)$$

Il est remarquable que l’exposant α de cette loi soit le même pour les deux modules

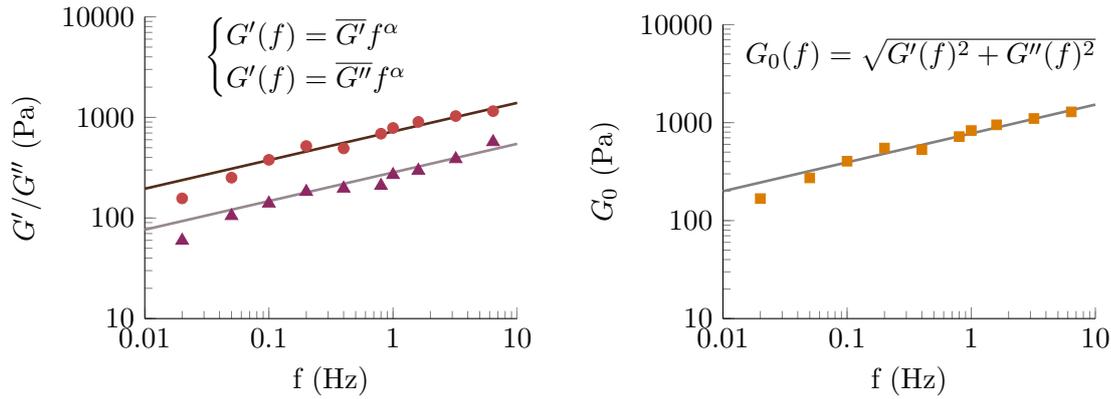


FIGURE 2.3 – **Exemple de résultats expérimentaux obtenus en analyse mécanique dynamique.** Gauche : Le module de reprise élastique G' et le module de perte G'' se comportent en loi de puissance de la fréquence, dont on extrait les pré-facteurs $\overline{G'}$ et $\overline{G''}$ ainsi que l'exposant α , qui, remarquablement, est le même pour les deux modules. Droite : La norme euclidienne de ces deux modules constitue le module effectif, qui lui aussi se comporte en loi de puissance de la fréquence, et dont on peut également extraire le pré-facteur $\overline{G_0}$, l'exposant α restant identique.

(Figure 2.3). Ainsi, pour chaque cellule, nous pouvons estimer les pré-facteurs $\overline{G'}$ et $\overline{G''}$ des modules de reprise élastique et de perte et l'exposant α de cette loi. Par souci de clarté, nous désignerons à partir d'ici ces grandeurs par les termes de "**module de reprise élastique**" et "**module de perte**", sans préciser qu'il s'agit du pré-facteur de leur loi de puissance.

Par ailleurs, il est possible de rassembler ces deux modules en un module effectif. En effet, comme G' et G'' représentent les parties réelles et imaginaires du module visco-élastique complexe, on peut calculer leur norme pour chaque fréquence :

$$G_0(f) = \sqrt{G'(f)^2 + G''(f)^2} \quad (2.5)$$

Le **module effectif** $G_0(f)$ se comporte également en loi puissance de la fréquence, dont l'exposant est toujours le même, ce qui est retrouvé expérimentalement (Figure 2.3). On peut alors exprimer de nouveau le pré-facteur de cette loi de puissance en fonction de $\overline{G'}$ et $\overline{G''}$:

$$G_0(f) = \sqrt{(\overline{G'}^2 + \overline{G''}^2) f^{2\alpha}} \Rightarrow G_0(f) = \overline{G_0} f^\alpha \quad (2.6)$$

avec

$$\overline{G_0} = \sqrt{\overline{G'}^2 + \overline{G''}^2} \quad (2.7)$$

Il nous faut encore introduire ici le facteur d'amortissement δ , qui est défini par :

$$\tan \delta = \frac{\overline{G''}}{\overline{G'}} \quad (2.8)$$

Ce facteur représente le rapport entre la fraction d'énergie dissipée sur celle qui est emmagasinée. En d'autres termes, il permet d'évaluer la propension à dissiper ou à

stocker l'énergie mécanique : δ sera égal à zéro pour un matériau purement élastique (un métal, un cristal) et égal à $\pi/2$ pour un matériau purement dissipatif (un liquide).

Si nous revenons maintenant au fait que nos deux modules $\overline{G'}$ et $\overline{G''}$ suivent une loi de puissance de la fréquence, on peut démontrer [Balland *et al.* , 2006] que le facteur d'amortissement δ et l'exposant α de la loi de puissance sont reliés par l'équation :

$$\delta = \frac{\pi}{2}\alpha \quad (2.9)$$

Ainsi, notre exposant α représente également la contribution relative de la dissipation du matériau, à ceci près que, si α sera toujours égal à zéro pour un matériau purement élastique, il sera cette fois égal à 1 pour un matériau purement dissipatif. Par la suite, nous utiliserons alternativement le module de reprise élastique $\overline{G'}$, le module de perte $\overline{G''}$, le module de raideur effectif $\overline{G_0}$ et l'exposant α pour caractériser les propriétés mécaniques des cellules et les comparer entre-elles.

Compression simple

Les lymphocytes T primaires humains auxquels nous nous intéressons présentent une taille très petite : leur diamètre moyen tel qu'il apparaît sous le microscope du dispositif à microplaques est de l'ordre de $\langle\phi\rangle = 6.7 \pm 0.1\mu\text{m}$. Par ailleurs, ce sont des cellules circulantes qui ne sont pas constitutives de tissus conjonctifs et par conséquent, leurs facultés d'adhésion sont assez faibles². Un certain nombre de limites techniques liées à ces propriétés particulières ont rendu impossible l'analyse mécanique dynamique sur ces cellules.

Tout d'abord l'amplitude maximale des oscillations permettant de rester dans le domaine des petites déformations est comparable à la résolution optique du capteur : une déformation de 10% correspondrait à des oscillations d'amplitude d'environ 600nm, et la résolution du capteur optique est de l'ordre de 200nm environ. Ensuite, nous avons vite remarqué que ces cellules semblaient être très molles, et il a fallu fabriquer des lamelles extrêmement souples pour qu'elles restent déformables par rapport à la cellule ($k < 1\text{nN}/\mu\text{m}^2$). Dans cette gamme de raideur, les lamelles sont très sensibles aux vibrations environnantes, et le rapport signal sur bruit dépassait difficilement l'unité. Enfin, quand bien même nous arrivions à obtenir un rapport signal sur bruit suffisant pour permettre une exploitation des données, les cellules n'adhéraient pas suffisamment aux plaques pour garantir une estimation correcte de la surface de contact au cours de l'expérience (risque de décollement dans les phases d'éloignement de la lamelle souple).

Nous nous sommes donc tournés vers une mesure du module d'Young statique, qui est le pendant statique du module de reprise élastique $\overline{G'}$ obtenu dans des conditions dynamiques (oscillations). Pour cela, nous avons simplement disposé une cellule T entre les deux plaques, et appliqué une compression séquentielle croissante en effectuant des sauts successifs d' $1\mu\text{m}$ avec la plaque rigide (Figure 2.4). La réponse de la cellule

2. Une des seules façons de les faire adhérer est de les faire interagir avec des molécules très spécifiques (anti-CD3, anti-CD28 ou ICAM-1), mais cela implique de modifier leur état physiologique, voire même de les activer, et donc de les éloigner de l'état dans lequel nous souhaitons les tester.

Module	Nom	Description	Unité
$\overline{G'}$	Module de reprise élastique	Elasticité	Pa
$\overline{G''}$	Module de perte	Dissipation	Pa
$\overline{G_0}$	Module effectif	Module global	Pa
α	exposant α	Rapport dissipation/stockage d'énergie	aucune
E	Module d'Young	Valeur du module en statique	Pa

TABLE 2.1 – Tableau récapitulatif des modules utilisés au cours de cette étude, de leur signification physique et de leur unité.

est enregistrée au travers de la déflexion $\delta(t)$ de la plaque souple (Figure 2.5), et la contrainte σ alors subie par la cellule s'exprime par :

$$\sigma(t) = \frac{F(t)}{S} = \frac{k\delta(t)}{S} \quad (2.10)$$

où S est la surface de contact entre la cellule et la plaque. Par ailleurs, en mesurant la longueur initiale L_0 puis la longueur $L(t)$ après chaque compression de la cellule sur les images enregistrées par la caméra couplée au microscope (ou en déduisant $L(t)$ des positions de la plaque rigide et de la plaque souple), il est possible d'accéder au taux de déformation de la cellule ε :

$$\varepsilon(t) = \frac{L_0 - L(t)}{L(t)} \quad (2.11)$$

On peut alors en déduire un module d'Young apparent E :

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{k\delta}{S\varepsilon} \quad (2.12)$$

qui donne accès à une estimation de la rigidité statique des cellules.

Mesures des forces de traction

Nous avons également effectué quelques expériences de traction simple sur des macrophages. Ce protocole consiste simplement à laisser la cellule s'étaler entre les plaques et exercer une force de traction, comme documenté dans l'étude de Mitrossilis *et al.* [2009]. Ici, une boucle de rétro-action est appliquée sur la lamelle souple de sorte que sa position soit maintenue tout au long de l'expérience. Le système de micro-manipulateurs compense en temps réel le déplacement dû à la traction de la cellule, ce qui permet de mesurer la force que la cellule exerce en condition de raideur infinie, puisqu'elle est alors face à un objet qu'elle ne peut jamais déformer. Dans ces conditions isométriques, on mesure la force maximale que la cellule peut générer.

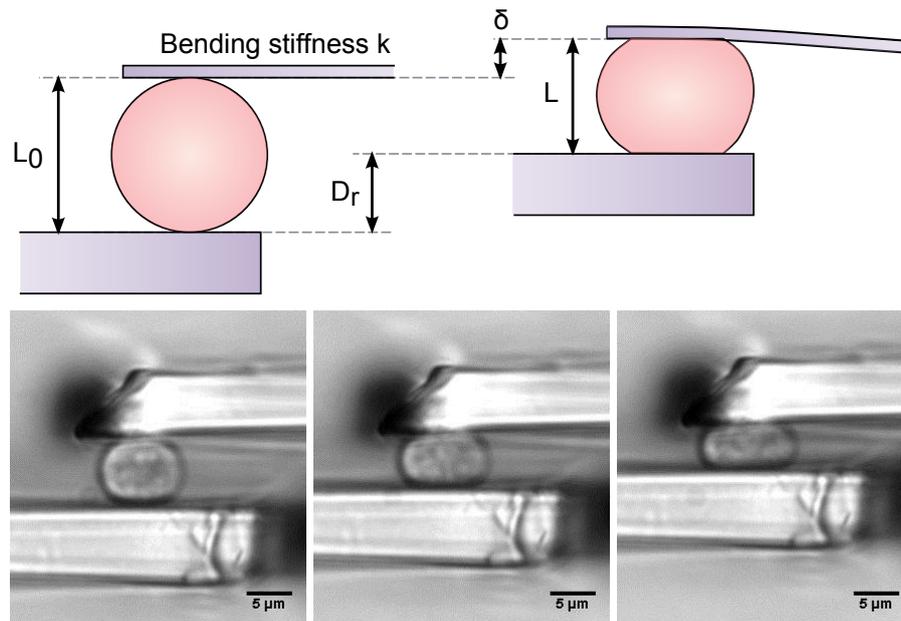


FIGURE 2.4 – **Compression simple.** La cellule T est disposée entre deux plaques, et des sauts de compression D_r sont appliqués par la lame rigide. La cellule, de taille initiale L_0 se comprime jusqu'à une longueur L mesurée d'après les clichés en lumière blanche. Ce faisant, elle défléchit la lamelle souple d'une amplitude δ , ce qui permet d'accéder à la contrainte appliquée. En reliant contrainte et déformation, on peut accéder à un module d'Young apparent donné par l'équation 2.12 (barre $5\mu\text{m}$).

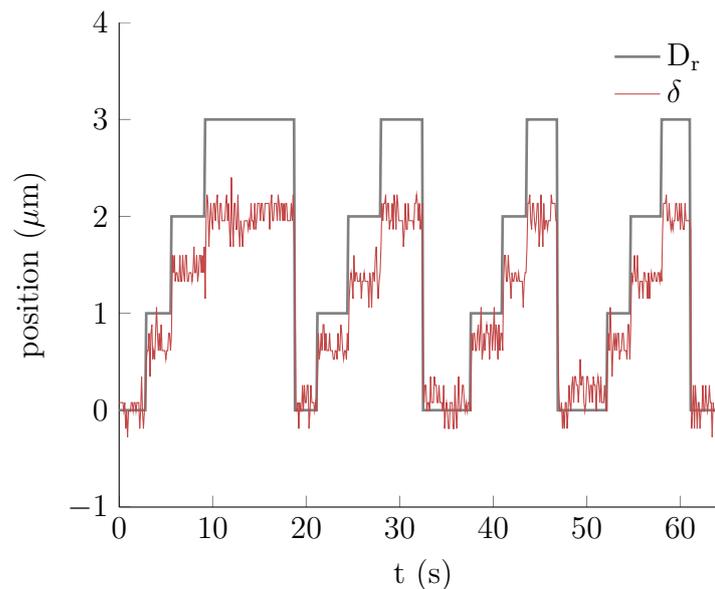


FIGURE 2.5 – **Expérience de compression simple sur cellules T CD4^+** : Exemples de données expérimentales à partir desquelles les grandeurs D_r et δ sont mesurées. δ est obtenu en effectuant la moyenne du signal au cours de la sollicitation.

2.2 Mesure des propriétés mécaniques de différentes cellules présentatrices d'antigène

2.2.1 Préparatifs à l'expérience

Les cellules proviennent toutes de donneurs sains, et ont été extraites à partir du sang circulant par un gradient de densité ficoll. Un kit d'isolation commercial a été utilisé pour extraire les monocytes exprimant le marqueur CD14 à leur surface (Miltenyi Biotech, Allemagne). Comme il a été introduit plus haut (paragraphe 1.1.2), il est possible de différencier ces monocytes en cellules dendritiques et macrophages. Les cellules ainsi obtenues possèdent des propriétés proches des cellules dendritiques et macrophages circulant *in vivo* [Merad *et al.* , 2013].

Ainsi, les cellules dendritiques ont été obtenues en cultivant les monocytes dans du milieu RPMI³+10%SVF auquel nous avons rajouté 10ng/mL de GM-CSF⁴ et 50ng/mL d'interleukine-4⁵. Au bout de 5 jours, les cellules présentaient le phénotype désiré, et étaient prêtes pour les expériences. Les macrophages ont été obtenus en utilisant le même milieu de culture mais dans lequel nous ajoutons 25 ng/ml M-CSF⁶, et ce pendant 6 jours. Leurs phénotypes respectifs ont été vérifiés en observant l'expression de marqueurs de surface spécifiques par cytométrie de flux [Blanchard *et al.* , 2004]. L'isolation et la préparation des cellules a été effectuée entièrement au laboratoire Immunité et Cancer, à l'institut Curie par Stéphanie Dogniaux et Armelle Bohineust dans un premier temps, puis Michael Saitakis.

Les cellules ainsi préparées étaient transférées au laboratoire Matières et Systèmes Complexes, Université Paris-Diderot, le matin des expériences. Pour les macrophages, qui sont des cellules adhérentes, les boîtes de culture étaient traitées à la trypsine⁷ (500mg/mL) pendant une vingtaine de minutes. La trypsine est un enzyme de digestion clivant les protéines, ici les intégrines, et détruisant ainsi le lien d'adhésion entre la cellule et le plastique. Les cellules ainsi détachées étaient re-suspendues dans du milieu complet et laissées sous agitation pendant au minimum deux heures pour assurer un recyclage complet des protéines d'adhésion à la membrane. Les cellules dendritiques et les monocytes, quant-à-elles, étaient simplement diluées dans du milieu complet quelques dizaines de minutes avant l'expérience. Il convient de souligner ici que les cellules n'étaient donc plus en présence de leurs facteurs de différenciation respectifs durant les expériences. Bien évidemment, toutes les expériences se déroulent dans une enceinte thermalisée à 37°C.

Un dernier préparatif concerne les lamelles utilisées pour l'expérience. Nous avons fabriqué une dizaine de paires de lamelles que nous utilisons à tour de rôle pour les expériences. Au cours de ces utilisations répétées, des débris (résidus cellulaires, micro-organismes, poussières, etc) peuvent se déposer sur les lamelles et il devient

3. Life Technologies, Carlsbad, US

4. Miltenyi Biotech, Bergish Gladbach, Germany

5. Miltenyi Biotech, Bergish Gladbach, Germany

6. Immunotools, Germany

7. Life Technologies, 0.05% Trypsin-EDTA (1X), phenol red

rapidement nécessaire de les nettoyer. Pour cela, nous utilisons une solution composée d'acide sulfurique à 70% et d'eau oxygénée à 30% (piranha), dans lesquelles nous laissons tremper les lamelles une trentaine de minutes. Ensuite, nous procédons à deux rinçages successifs en plongeant les lamelles dans un bain d'eau distillée, d'abord pour une trentaine de minutes, puis toute une nuit. Le jour de l'expérience, les lamelles étaient rapidement rincées une dernière fois à l'eau distillée avant d'être incubées dans une solution de fibronectine⁸ à 5 μ g/mL permettant l'adhésion cellulaire, et ce pendant au moins 30mn à 37°C.

2.2.2 Résultats expérimentaux

Nous y sommes presque. Mais cependant, il nous faut préciser une dernière chose avant de présenter les premiers résultats proprement dits : il s'agit d'explicitier la représentation qui a été choisie. Tout d'abord, il faut mentionner que les modules $\overline{G'}$, $\overline{G''}$ et $\overline{G_0}$ ne suivent pas une distribution normale mais une distribution log-normale [Fabry *et al.*, 2003; Balland *et al.*, 2006] : les données sont donc systématiquement ajustées par une loi de répartition log-normale. Par ailleurs, comme nous travaillons sur des petits échantillons, représenter un histogramme n'a pas vraiment de sens, comme on peut l'observer à la figure 2.6 : la gaussienne en pointillés correspond bien aux moyennes et écarts-types des données représentées par l'histogramme ! Pour s'affranchir de l'arbitraire dans le choix des intervalles de données, nous remplacerons donc la représentation en histogramme par celle de l'occurrence cumulée. Il s'agit de compter, pour une valeur de module donnée, combien de points ont été mesurés en dessous de cette valeur (voir figure 2.6). Techniquement, cette courbe (figure 2.6, trait plein) est en fait l'intégrale de la représentation gaussienne (trait pointillés, figure 2.6), puisque pour tout G donné, on fait la somme des valeurs distribuées entre 0 et G. En pratique, il suffit d'ordonner les points de données dans l'ordre croissant et de les tracer en fonction de leur rang, que l'on normalise pour que l'occurrence cumulée varie entre 0 et 1. Cela permet de visualiser directement les points de données, plutôt que de les confondre dans un histogramme peu précis. Par la suite, et contrairement à la figure 2.6, on remarquera que l'échelle des abscisses représentera directement la valeur du module en échelle logarithmique.

Les figures 2.8, 2.9 et 2.10 représentent les graphes d'occurrence cumulée des modules de reprise élastique $\overline{G'}$, de perte $\overline{G''}$, du module effectif $\overline{G_0}$ et l'exposant α pour les monocytes, cellules dendritiques et macrophages, respectivement. Sur ces graphes d'occurrence cumulée, chaque point représente une cellule testée. Sur ces trois panneaux, on voit que, bien que le nombre de point expérimentaux soit relativement faible ($N < 20$ dans la plupart des cas), cela suffit à avoir un échantillon représentatif d'une distribution statistique. En d'autres termes, nous avons la preuve visuelle que les données sont homogènes et représentent bien une distribution log-normale comme attendu, dont la moyenne et l'écart type sont suffisamment proches de la moyenne et l'écart-type réel de l'échantillon. Augmenter le nombre de points de données permettrait de réduire la barre d'erreur des résultats finaux (puisque l'erreur, dans notre cas, s'exprime par σ/\sqrt{N}) sans pour autant que la moyenne obtenue change significativement par rapport

8. Sigma-Aldrich F1141 Fibronectin from bovine plasma

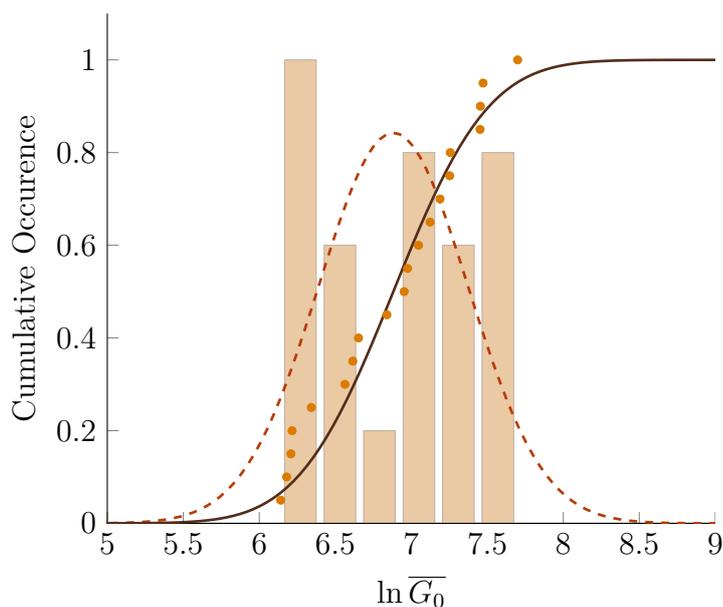


FIGURE 2.6 – **Correspondance gaussienne/ cumulative dans l'espace log.** L'histogramme tracé à partir du log des données représente mal la distribution log-normale (pointillés) et impose un arbitraire dans le choix du découpage de l'intervalle des données. Nous avons donc choisi de représenter les occurrences cumulées, qui est en fait l'intégrale de l'histogramme. L'adéquation entre données (points) et loi log-normale (trait plein) est ainsi plus facile à juger d'un seul coup d'oeil.

à celle estimée par ce nombre restreint de points.

Un autre point intéressant à souligner est le fait que ces expériences ont été réalisées, dans chaque cas, pour des cellules provenant d'au moins trois donneurs différents. Pourtant, les distributions observées montrent que les données sont homogènes sur tous les donneurs : il semblerait donc que les propriétés mécaniques de nos cellules aient une distribution comparable d'un individu à un autre. Autrement dit, des différences nettes apparaissent entre les propriétés mécaniques des monocytes et des cellules dendritiques d'une part, et celles des macrophages d'autre part, et ce malgré que chaque module ait été obtenu à partir des cellules d'au moins trois donneurs différents. Ceci indique que les variations individuelles sont inférieures à l'écart entre les valeurs moyennes entre types cellulaires, et par conséquent que ces valeurs moyennes ne sont pas aléatoires mais le fruit d'une régulation qui permet de les maintenir dans une certaine gamme. La conservation de ce trait phénotypique parmi les individus indique qu'il est probablement d'une importance évolutive, et qu'il confère par conséquent probablement des propriétés fonctionnelles importantes pour l'intégrité de l'organisme.

Si l'occurrence cumulée est une bonne représentation de la distribution des données, elle s'avère peu adaptée à la comparaison des moyennes entre populations cellulaires. Pour cela, nous avons tracé le graphique en figure 2.7. Nous y voyons immédiatement qu'au cours de cette différenciation effectuée *in vitro* par l'ajout de facteurs de croissance, seules les propriétés mécaniques des macrophages évoluent, vers une rigidification. Les cellules dendritiques ont des propriétés mécaniques comparables à celles

des monocytes, que ce soit en terme de $\overline{G'}$, $\overline{G''}$, $\overline{G_0}$ ou α (figure 2.7 et Tableau 2.2), qui restent dans des valeurs classiques obtenues pour différentes cellules animales [Balland *et al.*, 2006]. En revanche la différenciation en macrophage engendre une augmentation à la fois de $\overline{G'}$ et de $\overline{G''}$. Ces augmentations relatives par rapport au module initial des monocytes sont à peu près équivalentes pour le module de perte et le module de reprise élastique, et donc par conséquent l'exposant alpha n'est pas affecté, comme attendu par l'équation 2.9.

Ces observations corroborent les résultats publiés par Ekpenyong *et al.* [2012] au moment même où nous réalisons ces expériences. Grâce à la technique de l'étireur optique que nous avons brièvement décrite au paragraphe 1.2.3, les auteurs ont étudié les modifications rhéologiques lors de la différenciation de cellules de la lignée humaine de précurseurs myéloïdes HL60. Bien que leur méthode de mesure ne permette pas une comparaison quantitative directe avec nos résultats, ils ont néanmoins observé, comme ici, une déformabilité moindre des macrophages comparativement aux monocytes et neutrophiles. Et d'ailleurs, quelques années plus tôt, les macrophages alvéolaires de rat avaient déjà montré une rigidité accrue par rapport à un ensemble de cellules issues de tissus variés [Balland *et al.*, 2006].

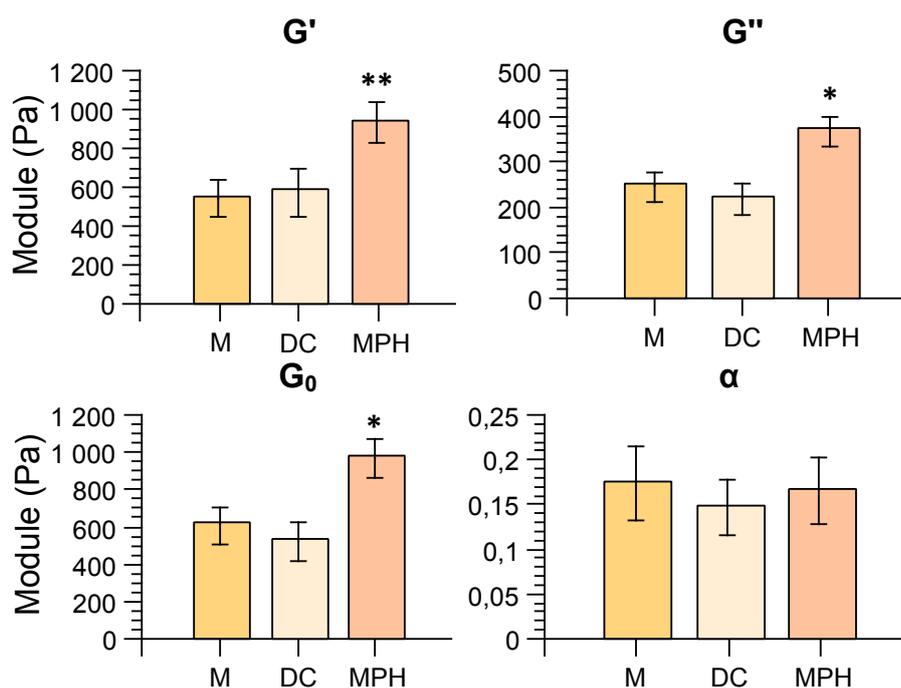


FIGURE 2.7 – **Evolution des propriétés mécaniques lors de la différenciation monocyttaire** : Au cours de la différenciation des monocytes primaires humains (M, N=18 cellules) en cellules dendritiques (DC, N=22 cellules) ou macrophages (MPH, N=20 cellules) par l'ajout de facteurs de croissance, seules les propriétés mécaniques des macrophages évoluent. Les étoiles indiquent les résultats obtenus par le test statistique Mann-Whitney-U entre monocytes et cellules "filles" (* pour $p < 0.05$, ** si $p < 0.01$ et *** pour $p < 0.001$).

Type cellulaire	N	$\overline{G'}$ (Pa)	$\overline{G''}$ (Pa)	$\overline{G_0}$ (Pa)	α
Monocytes	18	520 +90/-80	240 +40/-30	610 +100/-90	0.17 ±0.02
Cellules Dendritiques	22	440 +110/-90	190 ±30	530 +110/-90	0.15 ±0.01
Macrophages	20	900 +110/-100	350 ±30	970 +110/-100	0.16 ±0.04

TABLE 2.2 – Tableau récapitulatif des données obtenues par analyse mécanique dynamique des cellules dérivées des monocytes

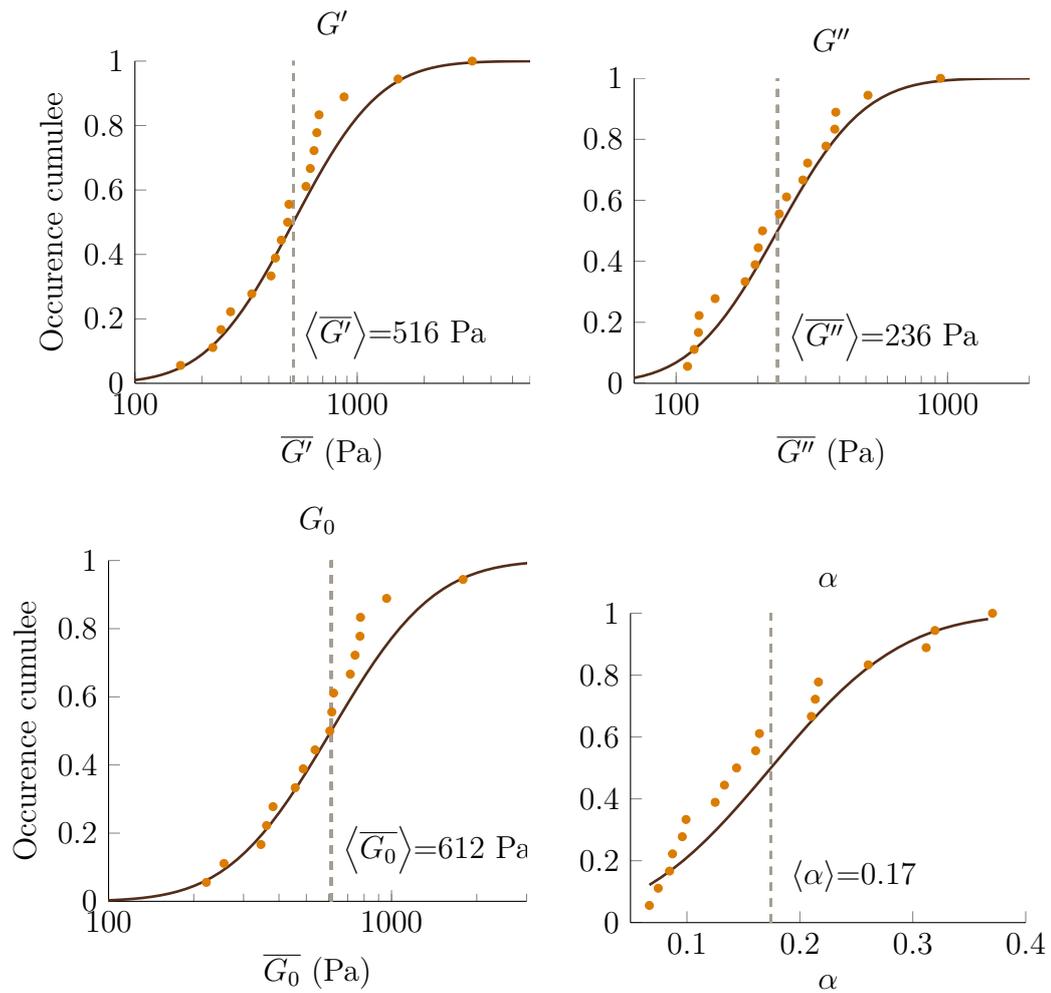


FIGURE 2.8 – Distribution cumulatives pour les monocytes. Chaque point représente les valeurs obtenues pour une cellule testée.

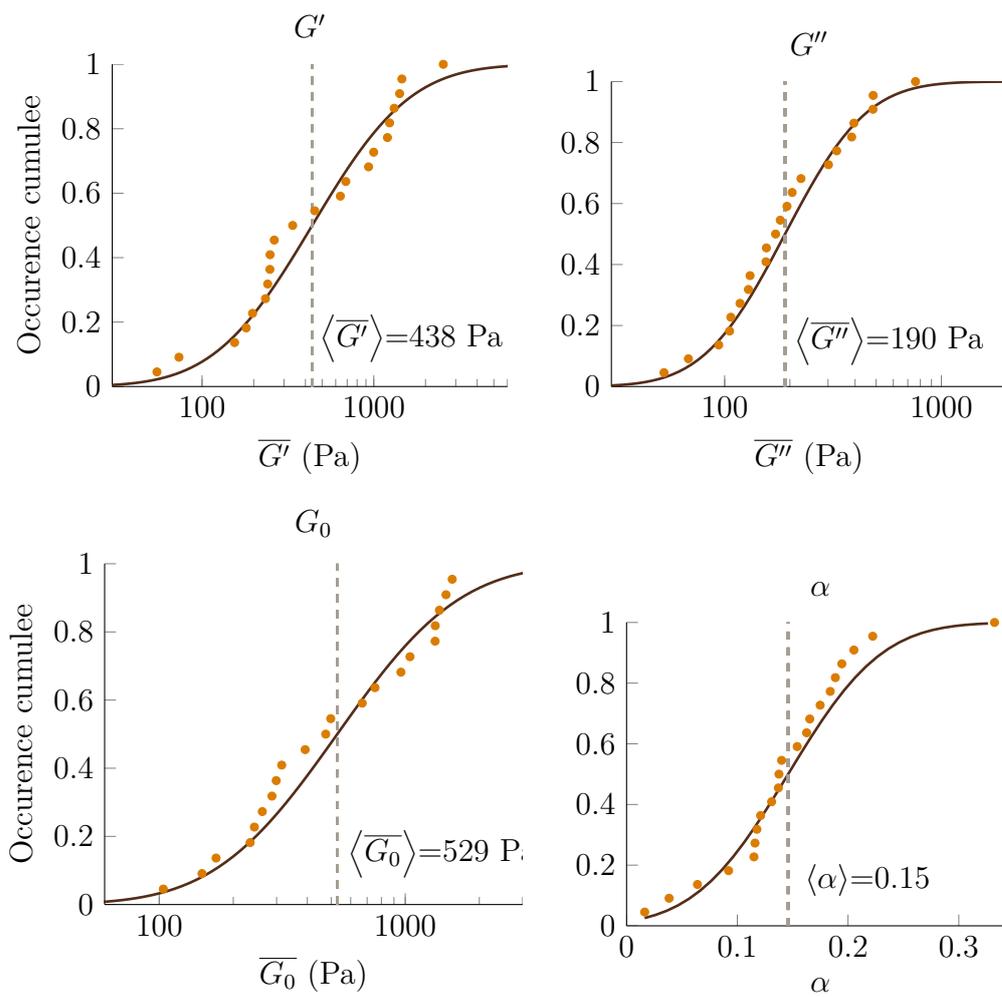


FIGURE 2.9 – Distribution cumulative pour les cellules dendritiques.

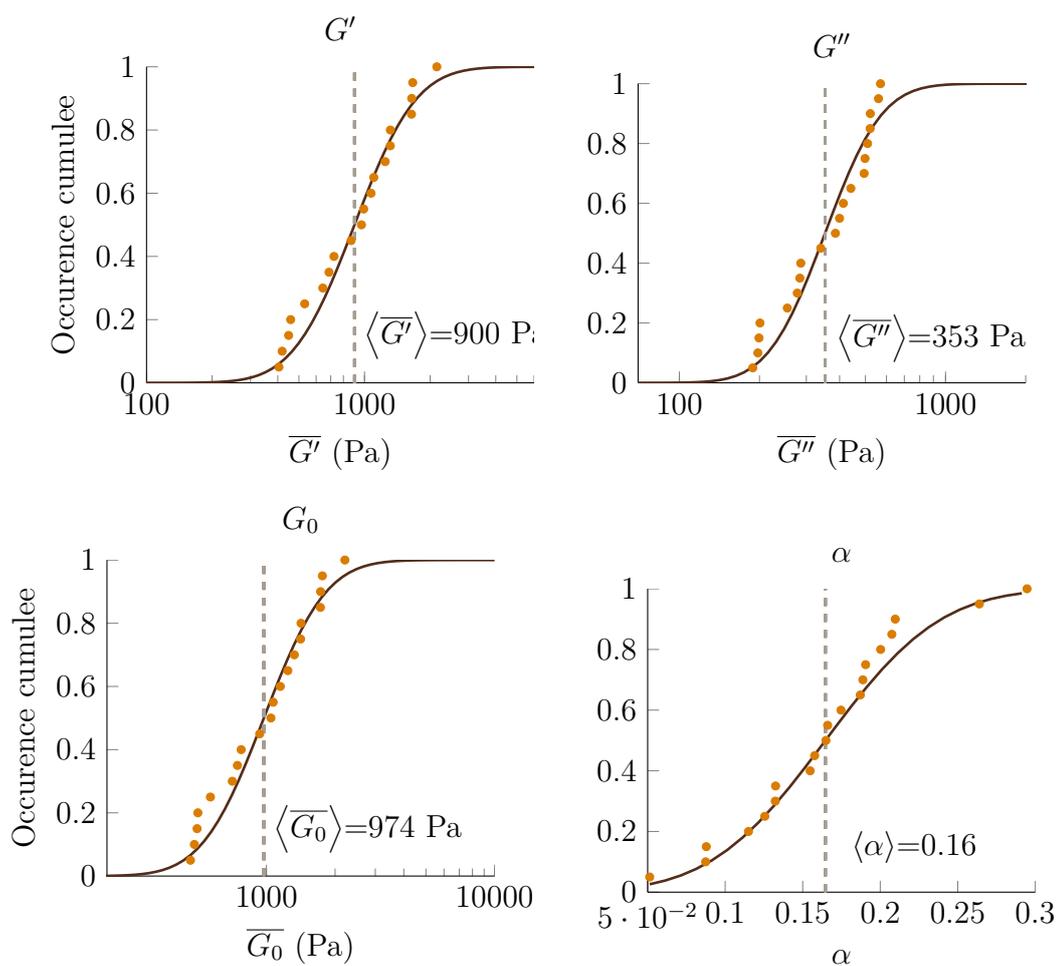


FIGURE 2.10 – Distributions cumulatives pour les macrophages.

2.3 Propriétés mécaniques du lymphocyte T

Jurkat et CD4⁺

Les mesures présentées précédemment nous ont permis de savoir quelles sont les propriétés mécaniques des cellules myéloïdes avec lesquelles le lymphocyte T est susceptible d'interagir. Cependant, si l'on veut pouvoir interpréter ces résultats en termes fonctionnels, il nous faut connaître les propriétés mécaniques du lymphocyte T lui-même. En effet, si le lymphocyte T est très rigide par rapport aux cellules présentatrices, alors il pourra aisément les déformer lors de leur interaction. Inversement, s'il s'avère être très mou par rapport aux cellules avec lesquelles il dialogue, il subira plus facilement des déformations imposées par celles-ci. Plus que la rigidité des cellules présentatrices, c'est le rapport entre les rigidités du lymphocyte T et de la cellule présentatrice qu'il faut considérer si l'on veut étudier l'influence des contraintes physiques sur les interactions entre deux cellules, ici dans le cas de la synapse immune.

Nous avons donc choisi de mesurer les propriétés mécaniques de deux types de lymphocytes T : les lymphocytes T primaires d'une part, directement prélevés à partir du sang de donneurs sains, et les cellules que l'on appelle Jurkat d'autre part, une lignée cellulaire leucémique.

Le lymphocyte T primaire est exactement celui dont nous avons si longuement parlé au chapitre 1. En effet, dès que celui-ci quitte le thymus où il s'est différencié, le lymphocyte T naïf rejoint le circuit sanguin et parcourt tous les organes lymphoïdes de l'organisme, où pourraient se nicher les cellules dendritiques matures possédant le complexe MHC-peptide complémentaire à son TCR. Ce sont donc des cellules circulantes très abondantes dans le sang. On retrouve également dans le sang de donneurs adultes des lymphocytes T mémoire : les populations que nous avons testées sont donc un mélange, environ pour moitié, de lymphocytes T naïfs et mémoire. Ces cellules ont été directement extraites à partir du sang de donneur sain en utilisant des techniques similaires à celles mises en oeuvre pour l'isolation des monocytes. Ces cellules étaient donc extraites 24h avant l'expérience à l'Institut Curie par nos collaborateurs et transférées le jour de l'expérience au laboratoire Matières et Systèmes Complexes, où elles étaient diluées quelques heures avant utilisation.

Les cellules Jurkat quant à elles, proviennent en fait d'un patient présentant une leucémie aiguë⁹. Comme toutes les lignées utilisées en laboratoire, ce sont donc des cellules cancéreuses dans le sens où elles sont capables de se diviser indéfiniment, ce qui est très pratique pour leur culture. En laboratoire, elles sont utilisées comme modèle pour les études portant sur la signalisation du lymphocyte T ou sur les leucémies aiguës du lymphocyte T. Au niveau de la préparation, elle est on ne peut plus simple : comme ces cellules sont à la fois non-adhérentes et immortelles, nous les avons simplement diluées dans leur milieu de culture au début de l'expérience, et directement utilisées. Enfin, il faut préciser ici que les mesures d'analyse mécanique dynamique sur les Jurkat ont été effectuées par Oscar Buschinger, alors stagiaire au laboratoire.

9. le terme de leucémie désigne de manière générale le cancer des lymphocytes.

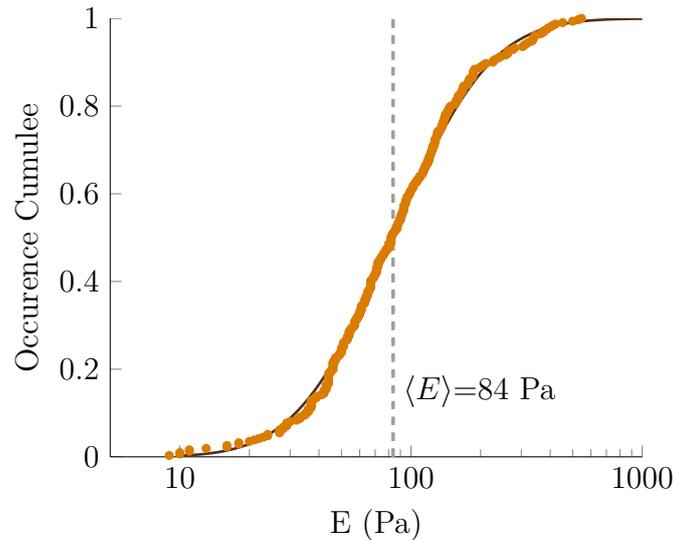


FIGURE 2.11 – CD4^+ Représentation en occurrence cumulée des points de mesures de module d'Young E effectués sur les cellules T CD4^+ primaires par la méthode de compression simple ($N=64$ cellules, plusieurs points par cellule). La courbe noire représente la loi de distribution log-normale idéale correspondant à la moyenne et à l'écart-type de l'ensemble des valeurs mesurées

Résultats expérimentaux

Comme nous l'avons mentionné au paragraphe 2.1.2, les cellules T CD4^+ sont trop petites ($\langle \phi \rangle = 6.7 \pm 0.1 \mu\text{m}$) et trop peu adhérentes pour que l'analyse dynamique mécanique aie pu être possible. En revanche, l'étude statique en compression simple a le mérite d'être une expérience bien plus facile à réaliser, et nous avons pu tester un nombre très important de cellules ($N=64$). Ceci étant, il nous a toutefois fallu un certain temps avant d'obtenir ces résultats. La raideur des cellules était tellement basse qu'il a fallu utiliser des lamelles souples de module de flexion k très bas¹⁰, et qui de fait étaient très sensibles aux vibrations environnantes. Comme nous le voyons sur la figure 2.11, les points de données sont tout à fait log-normalement distribués, avec une moyenne étonnamment faible : seulement $85 \pm 5 \text{ Pa}$!

Par ailleurs, la figure 2.4 montre un exemple des sollicitations appliquées. Pour chaque cellule, plusieurs amplitudes de déformation ont été appliquées. Nous voyons figure 2.12 que le module mesuré a tendance à augmenter avec l'amplitude de la sollicitation appliquée, mais de manière non significative. De plus, il faut noter que la figure 2.11 contient tous les points de données obtenus, indépendamment de la déformation appliquée, et qu'il ne semble pas que plusieurs populations se superposent, au vu de la régularité de la distribution. La régularité de cette distribution suggère par ailleurs qu'il n'y a pas de différence entre lymphocytes T naïfs et mémoire en terme de propriétés mécaniques, puisque les deux populations sont présentes pour environ moitié dans les cellules circulantes prélevées. Pour confirmer cette hypothèse, nous pourrions

10. les deux lamelles utilisées pour ces expériences avaient un module de flexion de 0.4 et 0.12 $\text{nN}/\mu\text{m}^2$ pour être précis, ce qui est très faible en comparaison aux 5, 10 ou 20 $\text{nN}/\mu\text{m}^2$ que nous utilisons habituellement

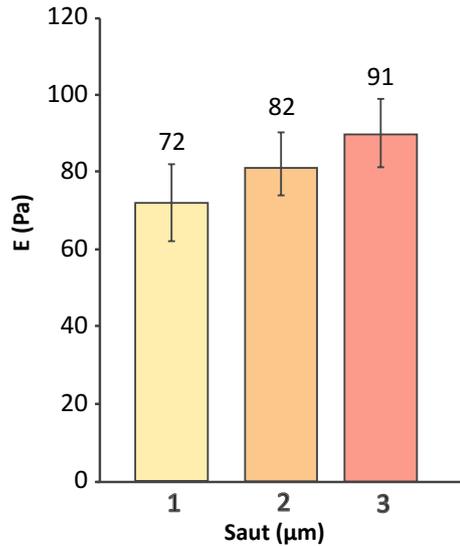


FIGURE 2.12 – Evolution du module en fonction de la compression appliquée. On remarque une légère tendance à la rigidification sous contrainte, mais qui reste non-significative

effectuer des expériences indépendantes sur lymphocytes T naïf et mémoire, qu'il est possible de trier.

Les cellules Jurkat sont de taille nettement plus grande que les lymphocytes T ($\langle\phi\rangle = 9.2 \pm 0.4\mu\text{m}$), ce qui a permis d'effectuer une analyse mécanique dynamique dont les résultats sont présentés sur le panneau de la figure 2.13. On y note immédiatement que, malgré leur plus grande taille, les modules obtenus sont d'ordre de grandeur comparables au module d'Young effectif des lymphocytes T primaire ($\overline{G}' = 80 \pm 10 \text{ Pa}$, $\overline{G}'' = 60 \pm 10 \text{ Pa}$, $\overline{G}_0 = 110 \pm 20 \text{ Pa}$ et $\alpha = 0.23 \pm 0.02$; contre $E = 85 \pm 5 \text{ Pa}$).

Cependant, les résultats de cette expérience ne sont pas directement comparables au module d'Young obtenu par compression progressive des lymphocytes T, puisqu'il s'agit dans un cas d'une mesure statique, et dans l'autre d'une mesure dynamique. Il est toutefois possible de prédire les résultats d'une expérience de compression pour les Jurkat, à partir de \overline{G}_0 et α obtenus en analyse mécanique dynamique sur les Jurkat, et de calculer un module d'Young équivalent. Cette méthode a été publiée au tout début de l'existence du rhéomètre à microplaque, comme preuve de concept d'une équivalence entre mesures quasi-statiques et mesures dynamiques [Desprat *et al.*, 2005]. Nous pouvons rappeler ici les manipulations mathématiques qui nous permettent d'obtenir un module d'Young à partir de données d'analyse mécanique dynamique pour les Jurkat, afin de les comparer directement aux cellules T CD4⁺.

Le module d'Young équivalent s'obtient en traçant, pour un temps donné, la contrainte et la déformation d'une Jurkat soumise à une expérience de compression linéaire imaginaire. La contrainte $\sigma(t)$ et la déformation $\varepsilon(t)$ à tout instant t de cette expérience imaginaire peuvent s'exprimer comme suit [Desprat *et al.*, 2005] :

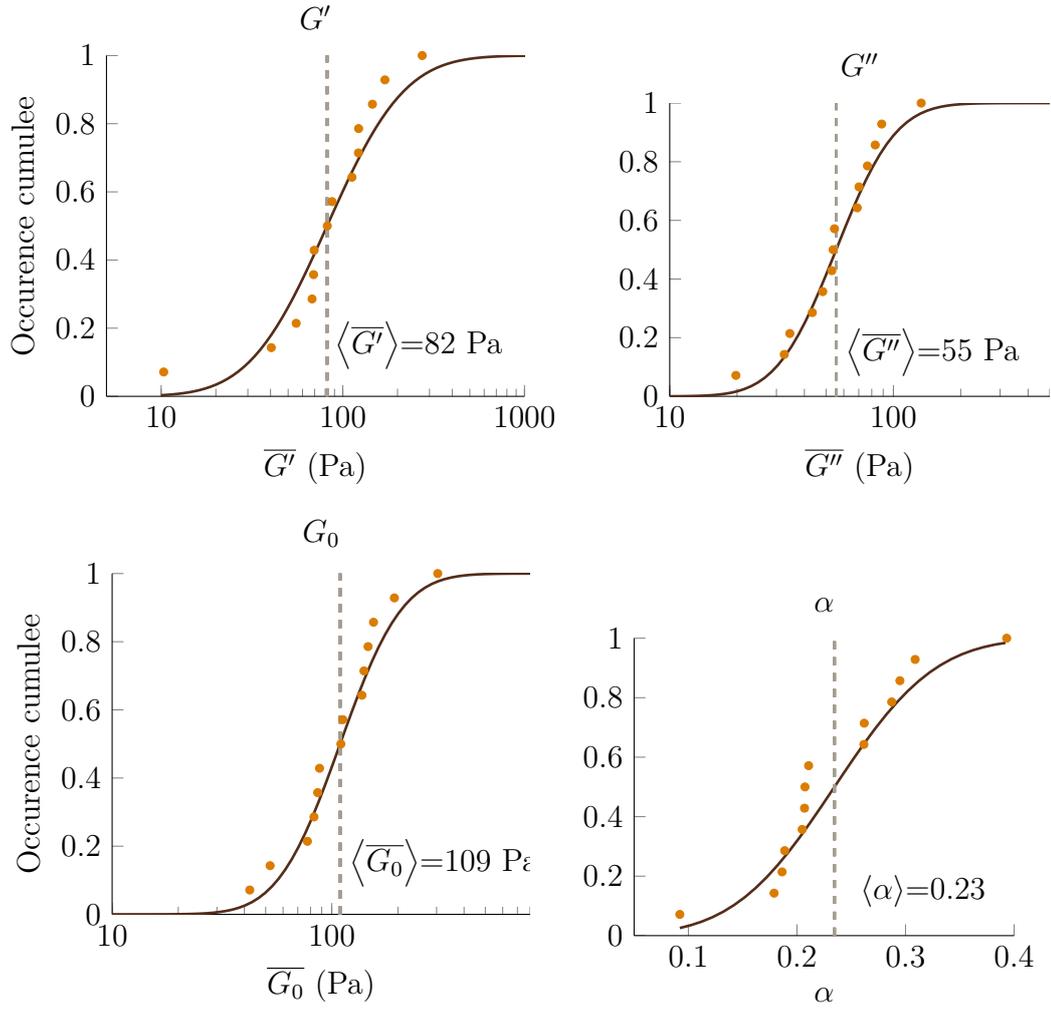


FIGURE 2.13 – Jurkat

$$\sigma(t) = \sigma_* \frac{t}{\tau_*} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{[-\Gamma(1+\alpha)\sigma_* A t^\alpha]^n}{\Gamma(2+n\alpha)} \quad (2.13)$$

$$\varepsilon(t) = \frac{t}{\tau_*} \left(1 - \sum_{n=0}^{\infty} \frac{[-\Gamma(1+\alpha)\sigma_* A t^\alpha]^n}{\Gamma(2+n\alpha)} \right) \quad (2.14)$$

où les grandeurs σ_* et τ_* désignent une contrainte caractéristique et un temps caractéristique de l'expérience de compression, respectivement, et sont déduits de paramètres moyens issus des expériences sur les lymphocytes T CD4⁺ :

$$\sigma_* = \frac{kL_0}{S_0} \quad (2.15)$$

où k est la raideur de la lamelle utilisée ($k=0.12 \text{ nN}/\mu\text{m}$); L_0 la longueur initiale moyenne entre les plaques (avant compression, $L_0=6.6\mu\text{m}$) et S_0 la surface de contact moyenne, calculée à partir des diamètres de contacts moyens (mesurés comme en figure B.3) ($S_0 = 16.6 \mu\text{m}^2$); et

$$\tau_* = \frac{L_0 \tau_0}{D_0} \quad (2.16)$$

où τ_0 est le temps moyen sur lequel la compression d'amplitude D_0 est appliquée à la cellule (dans le cas d'une marche, le temps effectif d'application est de 0.08 ± 0.001 s pour un saut de $1 \mu\text{m}$). Par ailleurs, la grandeur A des équations 2.13 et 2.14 peut-être déduite des mesures de $\overline{G_0}$ et α effectuées sur les Jurkat en analyse mécanique dynamique :

$$A = \frac{(2\pi)^\alpha}{G_0 \Gamma(1 + \alpha)} \quad (2.17)$$

la fonction Γ étant définie ici comme $\Gamma(1 + \alpha) = \int_0^\infty e^{-t} t^\alpha dt$.

A partir des valeurs des modules des Jurkat obtenus en analyse mécanique dynamique, nous pouvons donc évaluer la contrainte et la déformation subies par la cellule à n'importe quel temps t d'une expérience de compression statique imaginaire, ayant pour paramètres ceux de l'expérience effectuée sur les cellules T CD4⁺ (σ_* et τ_*). Il se trouve qu'à partir de $n \leq 3$, les termes de la série alternée des équations 2.13 et 2.14 suffisent à estimer $\sigma(t)$ et $\varepsilon(t)$ avec une précision inférieure à 1%. Nous avons donc calculé, pour un certain nombre de points temporels t , les valeurs de la contrainte $\sigma(t)$ et de la déformation $\varepsilon(t)$, que nous avons tracées l'une en fonction de l'autre. La pente de cette courbe nous donne le module d'Young équivalent des Jurkat (figure 2.14). Pour les valeurs expérimentales données plus haut, ce module vaut $E_{Jurkat} = 90 \pm 10$ Pa, strictement comparable au module d'Young des cellules T CD4⁺ ($E_{CD4^+} = 85 \pm 5$ Pa).

Ceci indique que malgré leurs différences avec les lymphocytes primaires, les Jurkat semblent avoir conservé des propriétés mécaniques remarquables, à savoir une raideur extrêmement faible comparativement aux cellules myéloïdes testées, mais aussi à l'ensemble des cellules du corps humain. On peut en tirer deux observations. La première, c'est que les Jurkat offrent un modèle valide pour l'étude biophysique du lymphocyte T primaire, puisque leurs propriétés mécaniques, du moins au niveau cellulaire, sont identiques. La seconde, c'est que la conservation des propriétés mécaniques entre le modèle et la cellule primaire suggère que cette grande déformabilité puisse être un marqueur phénotypique et fonctionnel primordial pour les lymphocytes T, peut-être pour leur capacité de migration exceptionnelle à travers des tissus très denses.

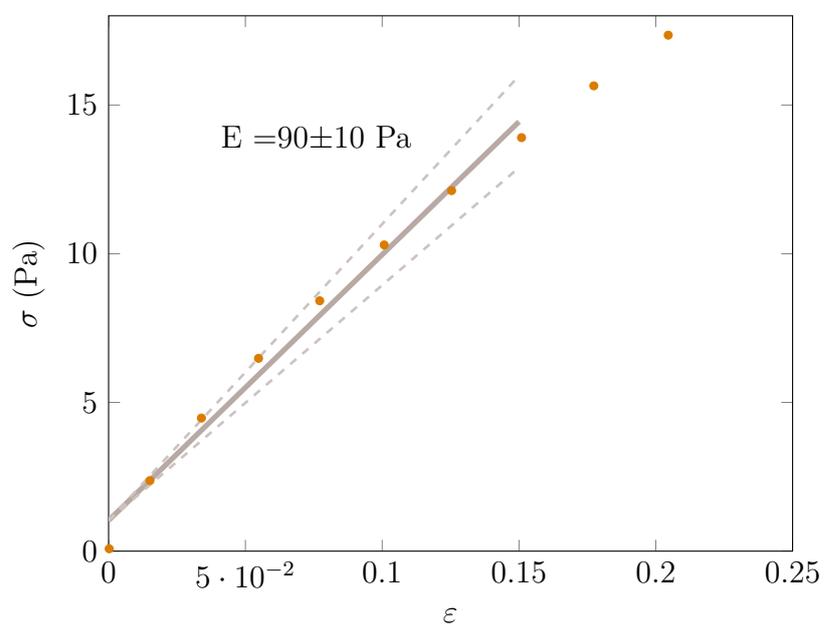


FIGURE 2.14 – **Calcul du module d’Young équivalent des Jurkat** : le module d’Young est la pente de la courbe contrainte (σ) - déformation (ϵ). Le fit a été effectué dans la portion $0 \leq \epsilon \leq 0.15$ pour se conformer aux conditions d’expérience où la déformation ne dépasse pas 15%.

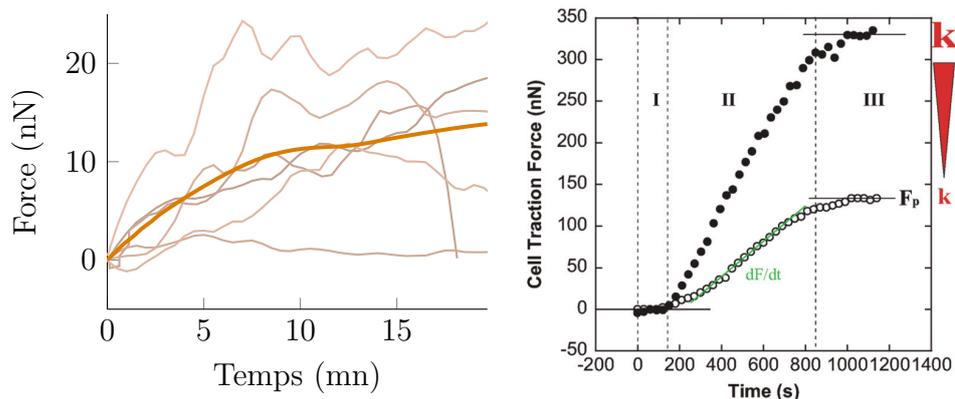


FIGURE 2.15 – Forces de traction développées par des macrophages (gauche) et un myoblaste C2.7 en environnement indéformable (droite, cercles pleins). Bien que sa rigidité soit largement plus élevée, le macrophage exerce des forces dix fois moins grandes que le myoblaste [Mitrossilis *et al.*, 2009].

2.4 Macrophages : de faibles propriétés contractiles

Au vu de la rigidité accrue des macrophages par rapport aux cellules dendritiques et aux monocytes, nous nous sommes demandés si cette rigidité ne pouvait pas être liée à leur rôle de phagocytes. En effet, s'il faut exercer des forces pour pouvoir ingérer bactéries, débris ou autres particules, et puisque pour une déformation donnée, la force est d'autant plus grande que la raideur est élevée, ne serait-il pas plus avantageux d'avoir une rigidité cellulaire au-dessus de la moyenne ?

Nous avons donc mesuré le comportement contractile des macrophages. Le protocole, décrit au paragraphe 2.1.2, consiste à placer la cellule dans un environnement strictement indéformable pour voir quelles forces de tractions maximales elle est capable d'exercer (test de traction isométrique). Comme les macrophages sont des cellules très adhérentes, elles ont bien entendu été traitées à la trypsine puis laissées sous agitation pendant deux heures, exactement comme lorsqu'elles étaient destinées à une mesure en analyse mécanique dynamique.

Nous nous attendions à ce que ces cellules, particulièrement rigides et dont la fonction nécessite d'exercer des forces sur des objets extérieurs pour les phagocyter, développent des forces de traction supérieures à la normale. Or les résultats sont totalement opposés à ces hypothèses. Sur les 17 cellules testées, seulement 6 ont développé une force. La figure 2.15 montre ces six courbes, beaucoup plus irrégulières que ce que Mitrossilis *et al.* [2009] avaient observé sur des myoblastes (figure 2.15). Surtout, la force maximale développée excède rarement les 20nN, là où un myoblaste ou un fibroblaste développe plus rapidement des forces de l'ordre de 300nN (figure 2.15) [Fouchard, 2012].

Nous avons un moment pensé que la protéine utilisée pour fonctionnaliser les microplaques pour l'adhésion cellulaire, la fibronectine, n'était peut-être pas adaptée pour l'étude des forces mises en jeu pour la phagocytose. Nous avons alors effectué les mêmes expériences en recouvrant cette fois les microplaques d'anticorps humain, que les ma-

crophages reconnaissent comme opsonine et qui déclenche la phagocytose. Rapidement pourtant nous avons vu que les résultats ne seraient pas modifiés. Sur les premières cellules testées, nous observions encore une traction très faible dans très peu de cas, aussi avons-nous très rapidement cessé ces expériences.

Nous avons ensuite supposé que la forme des microplaques pouvait être un frein au développement de forces de phagocytose. En effet, il a été observé que la forme de la cible influence, plus que la taille, la capacité de macrophages alvéolaires (issus de lignée murine) à phagocyter [Champion & Mitragotri, 2006]. Aussi avons-nous supposé que la forme des lamelles, grandes et planes, n'étaient pas optimales pour un mécanisme de phagocytose efficace.

Nous avons alors modifié l'extrémité de la plaque rigide pour qu'elle présente une sphère de rayon inférieur au rayon cellulaire des macrophages, comme on le voit sur la figure 2.16. Cette fois, la cellule semblait envelopper davantage la surface présentée comme pour la phagocyter, sans que les forces globales entre les deux plaques n'en soit affectée (amplitude maximum autour de 20 nN, figure 2.17). Cette idée n'était pourtant pas totalement aberrante, puisqu'en plus de l'étude de Champion & Mitragotri [2006], il a été montré un an après nos expériences que la vitesse d'encerclement dépend de la forme de la cible et que celle-ci est plus grande pour des cibles sphériques par rapport à des cibles ellipsoïdes [Paul *et al.* , 2013].

Mais si la forme semble influencer la vitesse et la qualité d'encerclement, la force de traction maximale générée par la cellule entière n'est pas affectée (figure 2.17). Ceci est étonnant, lorsqu'on sait que l'encerclement phagocytaire repose sur la formation d'une coupelle par polymérisation d'actine [Clarke *et al.* , 2010; Herant *et al.* , 2006], et que la fermeture du phagosome dépend d'une activité contractile [Swanson *et al.* , 1999], dans laquelle la myosine est impliquée [Tsai & Discher, 2008]. D'après les observations décrites plus haut, il semblerait alors que la phagocytose repose plutôt sur des mécanismes locaux ne se répercutant pas à l'échelle de la cellule entière. Notamment, la cellule doit être capable de mobiliser et déformer énormément sa membrane à la synapse phagocytaire, alors même que ses propriétés mécaniques lui confèrent une faible déformabilité globale. Ceci est particulièrement contre-intuitif : on s'attendrait à ce qu'une cellule si rigide soit moins déformable, et qu'elle utilise sa raideur importante pour exercer des forces conséquentes à moindre coût énergétique. Chez le macrophage, rigidité cellulaire et comportement de la membrane sont donc forcément découplés d'une manière ou d'une autre, et l'on peut envisager un rôle important des protéines ERM liant cytosquelette et membrane dans la régulation de ces mécanismes. Libérer localement la membrane par leur intermédiaire pourrait permettre le recrutement local d'actine néo-polymérisée et de myosine, ce qui permettrait en retour d'atteindre une grande déformabilité locale pourtant si contradictoire avec l'extrême rigidité globale du macrophage.

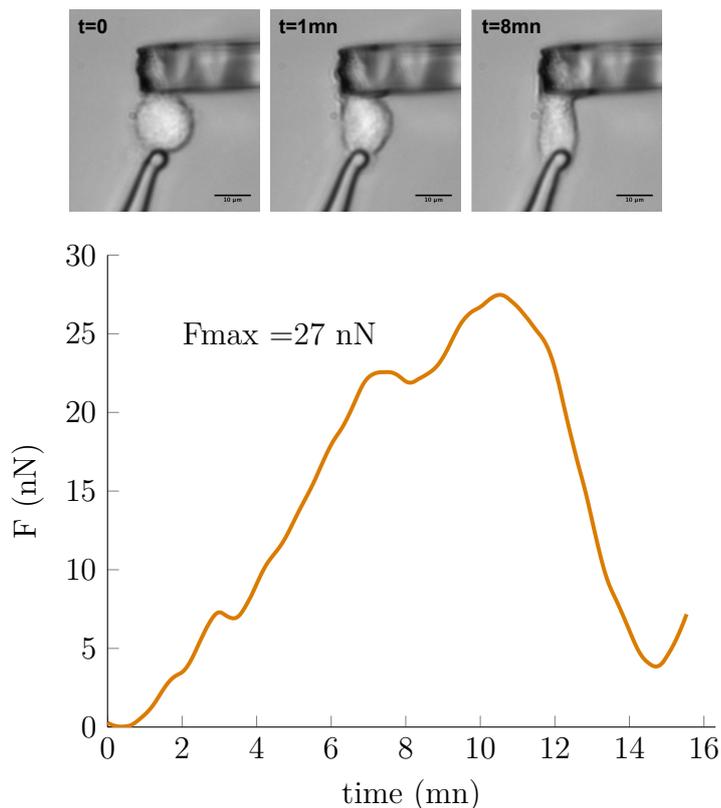


FIGURE 2.16 – Macrophage phagocytant une pseudo-cible en forme de boule. Bien que la cellule englobe totalement la cible (haut), les forces développées n’excèdent jamais 30 nN (bas), c’est à dire dix fois moins que la force moyenne développée par un myoblaste en conditions de rigidité infinie entre les deux plaques

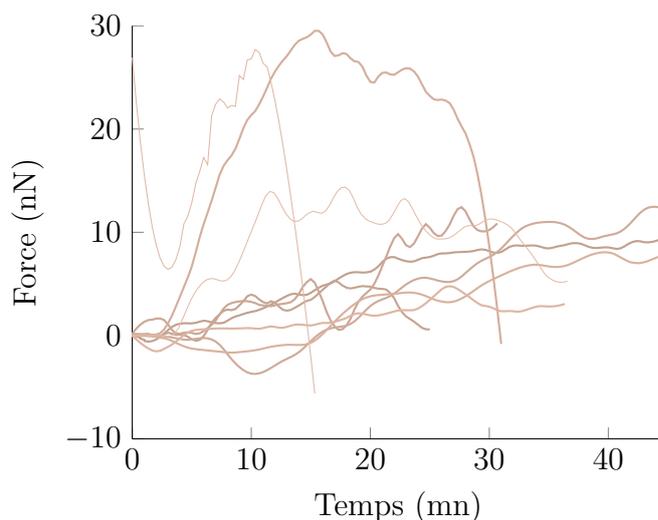


FIGURE 2.17 – Le changement de forme de la lamelle n’influence pas la traction globale des macrophages, dont l’amplitude maximale reste de l’ordre de la dizaine de nN, un ordre de grandeur en dessous des forces développées par des myoblastes [Mitrossilis *et al.* , 2009] ou des fibroblastes [Fouchard, 2012] en conditions de rigidité infinie.

2.5 Conclusions du chapitre et perspectives

Type cellulaire	N	$\overline{G'}$ (Pa)	$\overline{G''}$ (Pa)	$\overline{G_0}$ (Pa)	α	E (Pa)
Monocytes	18	520 +90/-80	240 +40/-30	610 +100/-90	0.17 ±0.02	– –
DC	22	440 +110/-90	190 ±30	530 +110/-90	0.15 ±0.01	– –
Macrophages	20	900 +110/-100	360 +30/-30	970 +110/-100	0.16 ±0.04	– –
Jurkat	15	80 ±10	60 ±10	110 ±20	0.23 ±0.02	90 ±10
CD4 ⁺	64	– –	– –	– –	– –	85 ±5

TABLE 2.3 – Tableau récapitulatif des données obtenues par analyse mécanique dynamique sur les monocytes, cellules dendritiques (DC), macrophages, lymphocytes T primaires (CD4⁺) et Jurkat.

Le tableau ci-dessus récapitule les données obtenues jusqu'ici en terme de propriétés mécaniques des cellules présentatrices d'antigène et des lymphocytes T. Nous savons désormais que le macrophage est bien plus rigide que les cellules dendritiques et les monocytes, mais que cette rigidité ne lui confère pas pour autant des propriétés contractiles plus développées, au contraire. Nous avons cherché à comprendre l'origine moléculaire (en terme de composition du cytosquelette) de la rigidité élevée des macrophages, et des éléments de réponse seront apportés au chapitre 4.

Nous savons également maintenant que les lymphocytes T sont extrêmement mous, et que cette propriété est retrouvée par les cellules Jurkat, lignée modèle d'étude du lymphocyte T humain. Pour ce qui est des Jurkat, on peut toutefois préciser que la part de la dissipation ($\overline{G''}$) par rapport à l'élasticité ($\overline{G'}$) est plus grande que pour les autres types cellulaires : $\overline{G''} / \overline{G'} \simeq 2/3$ quand ce rapport est plutôt de l'ordre de 1/2 pour les autres types cellulaires. Ceci se traduit par un exposant α supérieur aux autres cellules. Ceci confère donc aux Jurkat une capacité d'écoulement accrue en comparaison aux autres cellules étudiées ici, ce qui pourrait être impliqué dans leur adaptabilité à la circulation sanguine. Notons tout de même que, bien qu'il soit amoindri par rapport aux autres cellules observées ici, l'exposant α des Jurkat est d'ordre comparable à ce que l'on observe sur myoblastes ou fibroblastes [Balland *et al.*, 2006], dont les déplacements sont bien moindres à ceux des lymphocytes T. A ce sujet, il serait intéressant de mesurer les propriétés mécaniques des lymphocytes B, pour savoir si ces différences de rigidité élastique et de dissipation sont conservées au sein des lignées myéloïdes et lymphoïdes. Les lymphocytes B sont également des cellules présentatrices et circulantes, capables de former des zones de contact très particulières avec le lymphocyte T (figure 1.13 p.28). Cette forme particulière est-elle conditionnée par une égalité des propriétés mécaniques des deux cellules ?

Mais si les lymphocytes T interagissent avec monocytes, cellules dendritiques et macrophages, le phénotype des cellules présentatrices peut être affecté par les conditions inflammatoires qu'elles ont pu rencontrer. Ces modifications phénotypiques, comme nous l'avons vu au chapitre 1, peuvent impliquer une baisse de la phagocytose et l'acquisition d'un caractère activateur pour les macrophages et peuvent induire jusqu'à un

changement morphologique et fonctionnel majeur des cellules dendritiques, qui, de sentinelles deviennent cellules vecteur d'alerte migrant aux ganglions lymphatiques pour solliciter le lymphocyte T. Mais ces changements phénotypiques s'accompagnent-ils d'une modification de leurs propriétés mécaniques ? C'est ainsi que nous avons étudié l'influence de certains facteurs inflammatoires sur les propriétés mécaniques des cellules dendritiques et des macrophages, que nous allons présenter dans le chapitre qui suit.

CHAPITRE 3

L'inflammation modifie les propriétés mécaniques des cellules présentatrices d'antigène

Sommaire

3.1	TNFα+PGE$_2$ diminue la rigidité cellulaire	115
3.1.1	Effet sur les cellules dendritiques	115
3.1.2	Effet sur les macrophages	118
3.1.3	Discussion	121
3.2	l'IFNγ induit une rigidification globale	123
3.2.1	Effet sur les macrophages	123
3.2.2	Effet sur les cellules dendritiques	126
3.2.3	Discussion	127
3.3	Le LPS affecte peu la rigidité cellulaire	131
3.3.1	Effet sur les macrophages	132
3.3.2	Effet sur les cellules dendritiques	133
3.3.3	Discussion	136
3.4	Effet des cytokines sur le comportement adhésif des macrophages	137
3.5	Conclusions du chapitre et perspectives	139

Ce chapitre est consacré à l'étude de l'influence de certains facteurs inflammatoires sur les propriétés mécaniques des cellules dendritiques et des macrophages. Le point de départ de cette idée est venue de l'observation des cellules dendritiques. En effet, celles-ci sont capables, dans certaines conditions, notamment inflammatoires, d'acquérir un phénotype "mature" qui se traduit par une capacité migratoire accrue et des facultés de présentation antigénique exacerbées. Nous nous sommes donc posés la question : si les facteurs inflammatoires sont capables d'induire de tels changements phénotypiques, cela se traduit-il sur les propriétés mécaniques de ces cellules ?

Nous avons donc étudié dans un premier temps l'effet d'un mélange de cytokines permettant aux cellules dendritiques d'acquérir ce phénotype mature, $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$, sur les propriétés mécaniques des cellules dendritiques. Nous avons observé une modification très importante des propriétés mécaniques, présentée au paragraphe 3.1.1. A la suite de ces observations, nous avons voulu savoir si ces cytokines, utilisées spécifiquement pour induire une maturation des cellules dendritiques [Rieser *et al.*, 1997] induisaient les mêmes modifications sur des macrophages. La réponse est oui, mais avec des nuances. Au vu de ces résultats contrastés, nous avons sélectionné deux autres facteurs inflammatoires pour tenter de voir si cette tendance à une réponse plus importante sur un type cellulaire spécifique pouvait se retrouver.

Le premier de ces deux autres candidats est l'interféron γ ($\text{IFN}\gamma$), un puissant activateur des macrophages. Le second est un facteur exogène, le LPS. C'est un composant essentiel de la paroi des bactéries gram-négatives, et non présent chez les vertébrés, pour lequel les cellules myéloïdes possèdent un récepteur spécifique. L'étude de l'évolution des propriétés mécaniques des cellules traitées par ces facteurs a permis de montrer que, l'effet d'un facteur inflammatoire, s'il impose une tendance générale (rigidification ou ramolissement), affecte les cellules avec une amplitude qui dépend à la fois du facteur choisi et du type cellulaire ciblé. Si les modifications des propriétés mécaniques ne se produisent que lorsque l'expression des molécules activatrices à la surface des cellules augmente, elles peuvent être à la hausse ou à la baisse, sans que cela ne transparaisse sur les concentrations en molécules stimulatrices à la surface. Cette indépendance entre la nature de l'altération mécanique et l'augmentation systématique de la concentration en molécules activatrices indique que les propriétés mécaniques peuvent agir comme un signal supplémentaire dans la réponse à l'inflammation des cellules myéloïdes.

Bien entendu, cette étude n'est pas exhaustive, mais combien d'années faudrait-il pour recenser les effets de tous les facteurs inflammatoires sur les propriétés mécaniques de tous les types cellulaires susceptibles de les rencontrer ? Ceci est évidemment impossible dans le cadre d'une simple thèse, mais nous présentons toutefois ici un certain nombre d'observations qui, intégrées dans une vision globale de l'immunologie, apportent un éclairage nouveau sur le fonctionnement du système immunitaire humain.

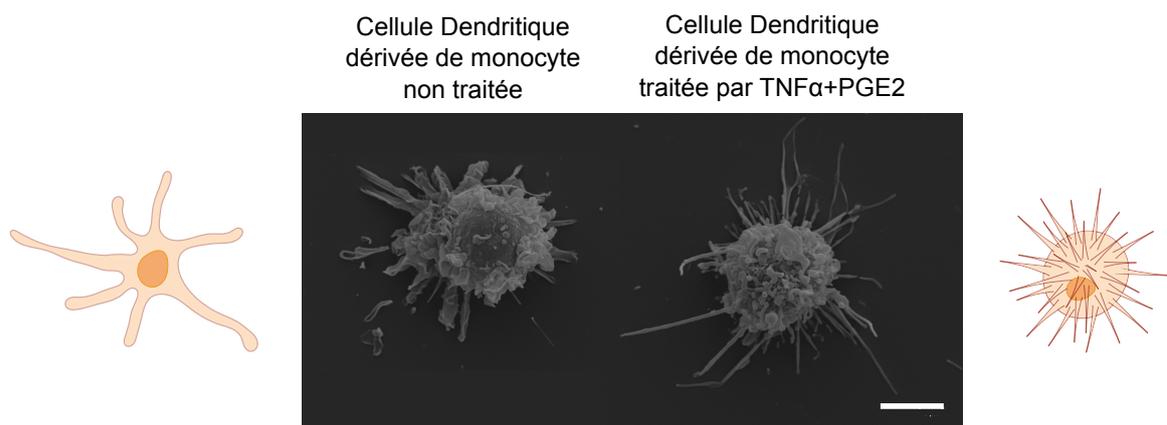


FIGURE 3.1 – **Maturation des cellules dendritiques** La maturation classique des cellules dendritiques en présence de TNF α +PGE $_2$ induit un changement morphologique assez particulier : plus sphériques et hérissées de dendrites, ces cellules deviennent également moins adhérentes. (Clichés obtenus par microscopie électronique à balayage par M.Saitakis, IBPS, Université Pierre et Marie Curie).

3.1 TNF α +PGE $_2$ diminue la rigidité cellulaire

3.1.1 Effet sur les cellules dendritiques

Comme nous l'avons vu au premier chapitre, les deux cytokines TNF α et PGE $_2$ permettent, lorsqu'ajoutées ensemble, de modifier le phénotype de la cellule dendritique vers un phénotype de cellule dendritique mature. La cellule dendritique devient alors sécrétrice de l'interleukine 12, une cytokine pro-inflammatoire, et surtout, devient un activateur très puissant du lymphocyte T [Rieser *et al.*, 1997]. C'est en fait un processus de maturation assez classique en laboratoire [Blanchard *et al.*, 2004], et nous voulions savoir si cette maturation s'accompagnait de changements de propriétés mécaniques des cellules.

Les cellules dendritiques, dérivées de monocytes CD14 $^+$ circulant comme décrit au paragraphe 2.2.1, ont donc été incubées en présence de TNF α ¹ et de PGE $_2$ ² aux concentrations de 10ng/mL et 1 μ g/mL respectivement, pendant 24h. A la suite de ce traitement, les cellules apparaissent plus sphériques et moins adhérentes (voir figure 3.1).

Nous avons également mesuré par cytométrie de flux l'expression de certains marqueurs de surface, caractéristiques de la présentation antigénique : les marqueurs CD80, CD86 et CD40 sont des co-stimulateurs du TCR nécessaires pour l'activation du lymphocyte T [Van Gool *et al.*, 1996], HLA-DR n'est autre que la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité qui, avec son peptide, se lie au TCR du lymphocyte T, et ICAM1 est la molécule de surface qui se lie à LFA1, l'intégrine du lymphocyte T, et dont l'engagement est nécessaire pour la mise en place des cascades de signalisation initiales. La sur-expression de ces marqueurs indique donc une capacité de présentation

1. R&D Systems

2. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO

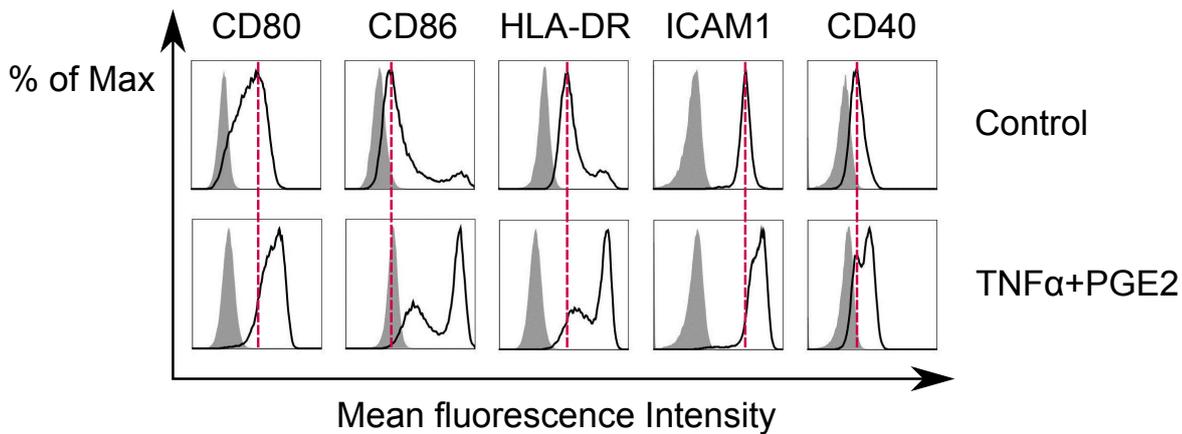


FIGURE 3.2 – Évolution des marqueurs de surface après traitement des cellules dendritiques à $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$. Seule l'intensité de fluorescence de la protéine de surface CD80 augmente légèrement (échelle log) par rapport aux cellules non traitées. Données obtenues par M. Saitakis, Institut Curie.

antigénique *a priori* accrue. Pour les cellules dendritiques, $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$ augmente l'expression de tous ces marqueurs de manière significative (figure 3.2).

Ensuite, une expérience d'analyse mécanique dynamique fut effectuée en suivant le même protocole que précédemment (paragraphe 2.2.1). La figure 3.3 affiche les graphes d'occurrence cumulée obtenus sur $N=22$ cellules issues d'au moins 3 donneurs différents. La répartition de ces points de données, tout à fait homogène, se situe autour de valeurs moyennes plus faibles que pour les cellules non traitées $\overline{G}' = 190 \pm 20$ Pa $\overline{G}'' = 120 \pm 10$ Pa, $\overline{G}_0 = 230 \pm 20$ Pa et $\alpha = 0.26 \pm 0.01$. La valeur relativement élevée de α traduit une baisse plus importante (en proportions) sur la partie élastique que sur la dissipation du module visco-élastique complexe (56% de baisse pour \overline{G}' contre 38% pour \overline{G}''). L'augmentation de la capacité de présentation antigénique et d'activation du lymphocyte T induite par une sur-expression des ligands et co-stimulateurs du TCR s'accompagne donc ici d'une baisse de rigidité, légèrement supérieure sur \overline{G}' que sur \overline{G}'' .

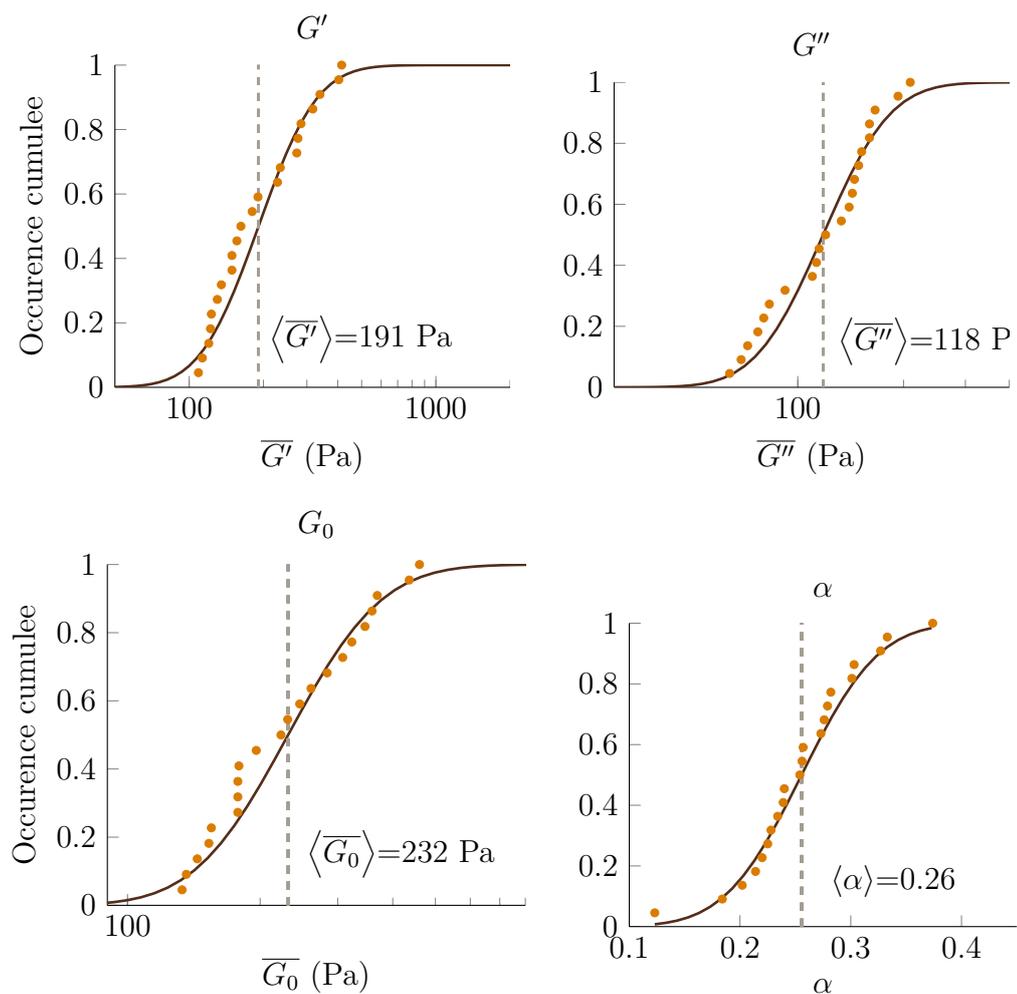


FIGURE 3.3 – Occurrences cumulées pour les Cellules Dendritiques incubées en présence de TNF α +PGE $_2$

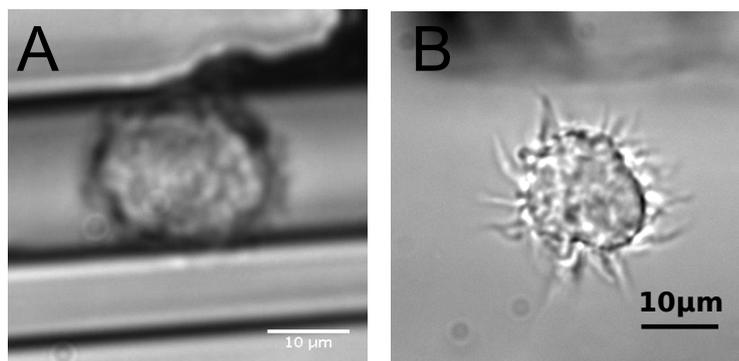


FIGURE 3.4 – **Effet du TNF sur MPH.** Clichés en lumière blanche de macrophage non traité entre les microplaques (A) et traité à $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$ juste avant la capture avec les microplaques (B). Lorsque les macrophages sont incubés en présence de $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$, ils perdent leur forme sphérique pour acquérir une morphologie anisotrope caractéristique des cellules dendritiques. Certaines cellules s'hérissent même de dendrites (B), phénotype propre aux cellules dendritiques et rarement observé chez les macrophages.

3.1.2 Effet sur les macrophages

Au vu de la baisse de raideur importante induite par $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$, nous nous sommes demandés si la réponse était particulière aux cellules dendritiques, ou si ce cocktail cytokinique était susceptible d'induire une baisse de raideur sur d'autres types cellulaires. Pour répondre à cette question, nous avons appliqué le même protocole aux macrophages.

L'effet de la combinaison $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$ sur les macrophages est peu documenté, car il est moins spectaculaire que sur les cellules dendritiques et ne semble pas engendrer de modification fonctionnelle aussi profonde. Cependant les macrophages peuvent évoluer dans les mêmes endroits que les cellules dendritiques, ils sont donc aussi susceptibles de rencontrer ces deux cytokines et d'y répondre. D'un point de vue de l'observation pure, les macrophages traités avec $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$ ont une morphologie particulière, plus irrégulière et présentent de nombreuses protrusions ressemblant aux "dendrites" des cellules dendritiques et suggérant que leur phénotype s'oriente vers quelque chose qui ressemblerait plus à des cellules dendritiques (figure 3.4).

Ces modifications morphologiques ne s'accompagnent pourtant que d'une très faible variation des ligands et co-stimulateurs du TCR (seul CD80 augmente légèrement, figure 3.5), indiquant que les macrophages, en présence de $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$, ne voient pas leur efficacité de présentation antigénique significativement augmenter.

Similairement, la visco-élasticité des macrophages est moins affectée par $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$ que celle des cellules dendritiques dans les mêmes conditions. La figure 3.6 représente les graphes d'occurrence cumulées effectués à partir de $N=18$ cellules provenant de 3 donneurs différents. Les modules sont affectés d'une chute relativement faible, mais toutefois significative par rapport aux cellules non-traitées (chute de 32% pour $\overline{G'}$,

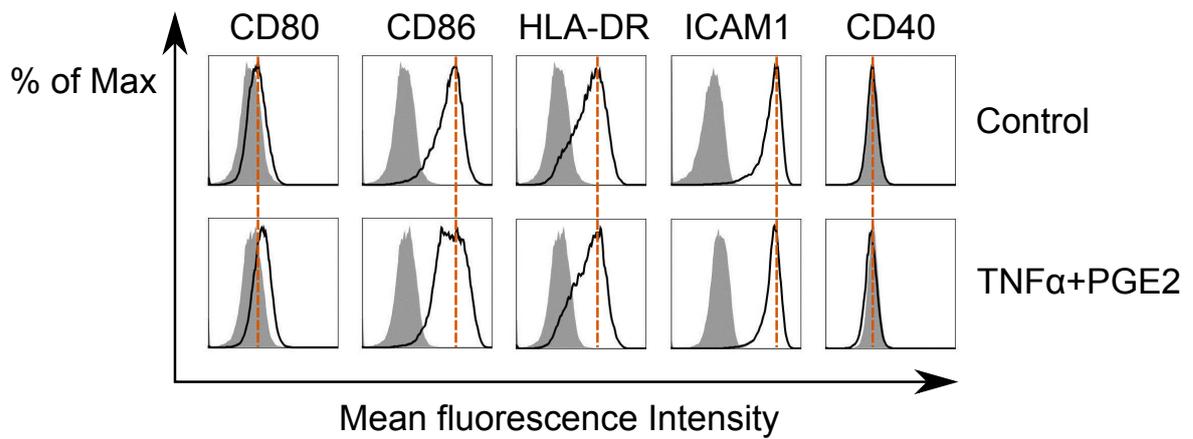


FIGURE 3.5 – Évolution des marqueurs de surface après traitement des macrophages à TNF α +PGE $_2$. Seule l'intensité de fluorescence de CD80 augmente (échelle log).

23% pour $\overline{G''}$ ce qui se traduit par une chute de 30% de $\overline{G_0}$ et aucun effet significatif sur α ; figure 3.7).

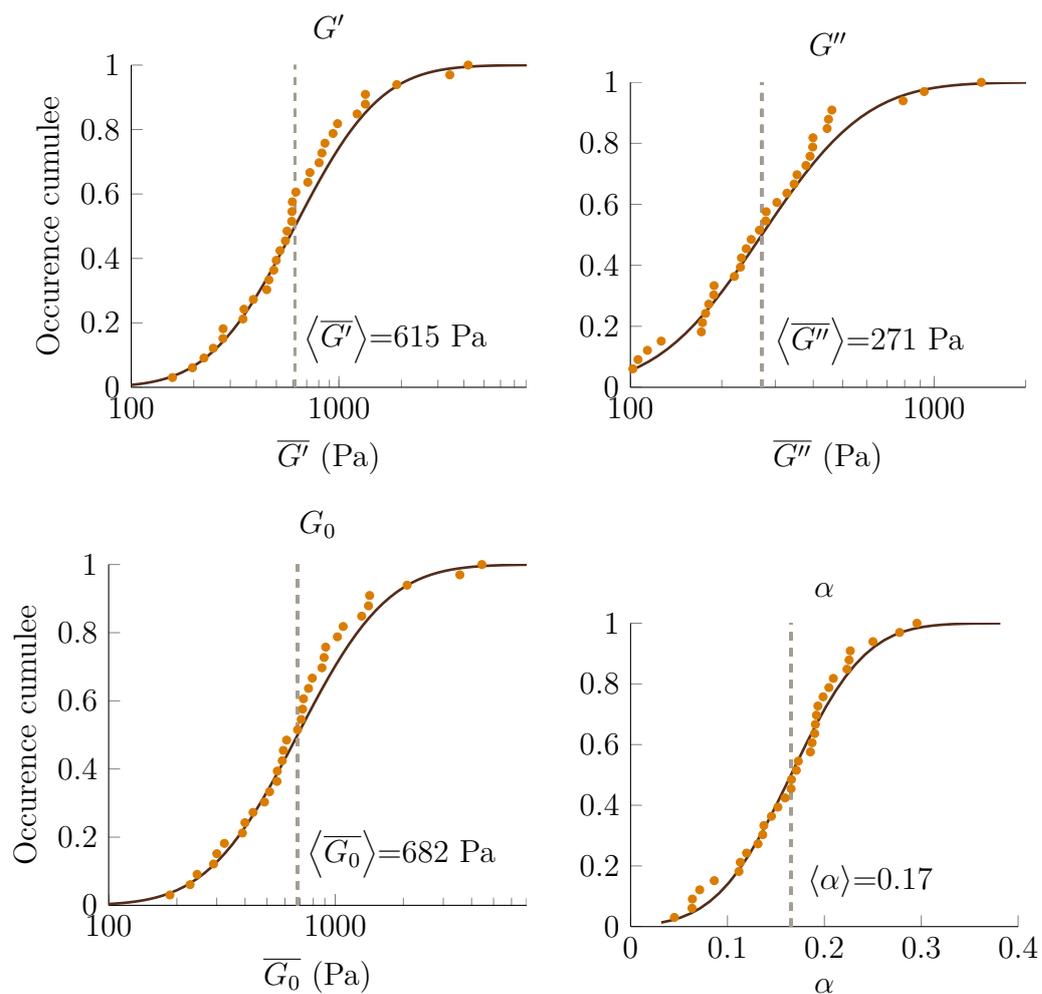


FIGURE 3.6 – Occurrences cumulées des macrophages incubés en présence de $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$

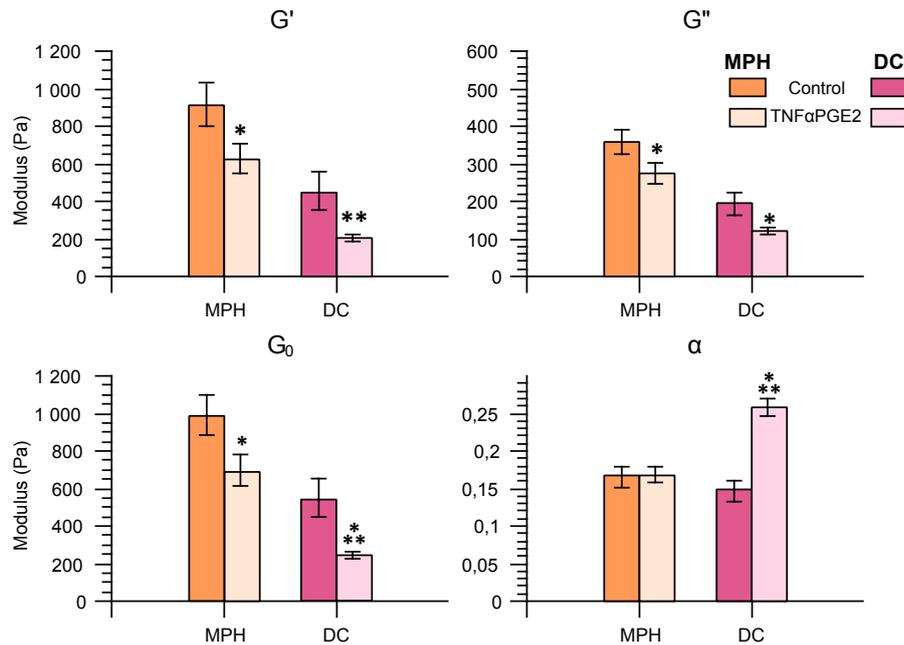


FIGURE 3.7 – **Effet du TNF α +PGE $_2$ sur cellules dendritiques (DC) et macrophages (MPH).** Les symboles * représentent la valeur des p-valeurs obtenues par le test statistique de Mann-Whitney-U (* pour p<0.05, ** pour p<0.01, *** pour p<0.001).

3.1.3 Discussion

Comme le récapitule la figure 3.7, il semblerait donc que l'effet des cytokines sur la rigidité des cellules soit plus important sur des cellules qui, par ailleurs, ont une modification profonde de leurs facultés de présentation antigénique. Si les macrophages voient leur diminution de rigidité en présence de TNF α +PGE $_2$ s'accompagner de modifications morphologiques, l'effet est nettement moindre que sur les cellules dendritiques, tout comme l'expression des marqueurs de surface est peu modifiée. Celles-ci semblent plus sensibles du point de vue mécanique à la présence de TNF α +PGE $_2$, qui, par ailleurs, induit des modifications non seulement morphologiques mais surtout fonctionnelles. On peut s'attendre en effet à ce que, si TNF α +PGE $_2$ induit sur les cellules dendritiques un remodelage très important du paysage moléculaire à la membrane plasmique, ces modifications passent par des voies de régulation, des activations génétiques profondes qui peuvent s'accompagner de l'activation ou interférer avec des voies de signalisation menant à une baisse de la rigidité cellulaire, d'autant plus que ces modifications des propriétés mécaniques peuvent apparaître comme avantageuses pour les fonctions de la cellule dendritique devenue mature.

En effet, nous avons mentionné désormais plusieurs fois que les cellules dendritiques ainsi amenées à maturation deviennent des activateurs puissants du lymphocyte T [Rieser *et al.*, 1997]. Or rappelons-nous des résultats présentés au chapitre précédent : le lymphocyte T primaire, comme les cellules Jurkat, présentent une rigidité extrêmement basse. Les cellules dendritiques incubées en présence de TNF α +PGE $_2$ présentent également une rigidité très basse en comparaison à la moyenne des cellules

des différents tissus, qui se trouve plutôt autour de 500-600 Pa. Nous pouvons imaginer plusieurs fonctions à ce trait phénotypique.

Premièrement, il se peut que la proximité des raideurs de ces deux types cellulaires soit un avantage pour l'activation : si les cellules T sont extrêmement molles, et si les cellules dendritiques matures, leur activateur le plus efficace, présentent également une rigidité considérablement basse, ceci a-t-il un rôle dans l'efficacité de la présentation antigénique de la cellule dendritique mature ? Nous avons souhaité répondre à cette question au Chapitre 5, où nous avons cultivé des cellules T sur des gels de raideur très basse, pour voir si un environnement mou pouvait amplifier la réponse des lymphocytes T.

Ensuite, nous savons que les cellules dendritiques matures acquièrent, conjointement à leur faculté de présentation antigénique accrue, des capacités migratoires très importantes [Lehner *et al.*, 2008]. Elles sont capables de migrer hors des tissus où elles résident pour rejoindre la lymphe jusqu'au ganglion lymphatique. Une faible raideur devient alors un avantage sélectif considérable lorsqu'il s'agit de se glisser à travers la matrice extra-cellulaire ou entre des cellules épithéliales connectées de manière très dense, puisque la résistance à la déformation en est d'autant plus diminuée. Un autre point remarquable de l'effet de $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$ sur les cellules dendritiques est l'augmentation de α jusqu'à une valeur semblable à celle des Jurkat : 0.26. Cette dissipation augmentée pourrait favoriser la migration, tout comme pour les Jurkat et peut-être les lymphocytes T de façon générale.

Le changement de forme des macrophages illustré sur la figure 3.4 est également intéressant à discuter. En effet, ces cellules prennent une forme hybride entre cellule dendritique et macrophage, comme si l'ajout de $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$ permettait de remonter la voie de différenciation, tout en gardant certaines séquelles. En effet, on peut argumenter que les valeurs de rigidité obtenues par ailleurs se rapprochent de celles des cellules dendritiques ($\overline{G}' = 620 + 90 / - 80$ Pa, $\overline{G}'' = 270 \pm 30$ Pa pour les macrophages contre 440 (+110/-90) Pa et 190 (± 30) Pa pour les cellules dendritiques). Ceci n'est pas totalement inconcevable, car il a été observé que l'ajout d' $\text{IFN}\gamma$, dont nous allons parler très vite, dans le milieu de monocytes en cours de différenciation en cellules dendritiques changeait la voie de différenciation pour donner des macrophages [Delneste *et al.*, 2003]. Nous pouvons imaginer un processus similaire qui modifierait l'état des macrophages pour les orienter vers les cellules dendritiques voisines. Le fait que l'ajout de ces cytokines ait eu lieu bien après la différenciation en macrophages, contrairement à l'étude sus-citée, pourrait expliquer les résidus phénotypiques observés : haute granulosité, raideur un peu plus élevée, signes d'une réversibilité pas totalement accomplie.

Mais ceci n'est qu'une hypothèse que nous n'avons pas cherché à vérifier au cours de cette thèse. Plus généralement, on peut concevoir que les cellules myéloïdes, du moins celles issues de la lignée monocyttaire dont nous traitons ici, présentent en fait un continuum d'états faits de traits phénotypiques empruntés aux deux classes cellulaires (cellules dendritiques et macrophages), selon l'environnement inflammatoire qu'elles rencontrent [Geissmann *et al.*, 2010]. A tout bien réfléchir, ces appellations ne sont jamais qu'un nom posé sur un ensemble de traits observables par les chercheurs, pour les aider à mieux classer et se représenter le vivant. Si cette classification rend difficile

la formulation conceptuelle d'états intermédiaires, elle n'est qu'une classification, qui, bien qu'elle soit à même d'évoluer, ne rendra jamais compte de l'immense complexité et diversité des phénotypes observés.

Bien entendu, cette vision peut s'étendre à l'ensemble des cellules du système immunitaire, que l'on peut imaginer comme très plastiques, capables d'emprunter un nombre infini de traits phénotypiques variés en une combinaison unique, qui dépendrait à la fois de l'environnement dans lesquelles elles se trouvent, et de l'historique des modifications induites par les diverses situations environnementales qu'elles ont rencontrées depuis leur différenciation à partir de la cellule souche.

En tout état de cause, nous sommes ici face à des résultats qui indiquent que l'effet des cytokines TNF α +PGE $_2$ sur la rigidité cellulaire est d'autant plus grand que la cellule ciblée est sensible sur d'autres traits phénotypiques (ici, l'expression des molécules membranaires activatrices du lymphocyte T) à la présence de ces facteurs inflammatoires. A ce stade de l'étude, nous nous sommes demandés si cette tendance était spécifique aux cytokines TNF α +PGE $_2$, ou si elle se retrouvait plus généralement avec d'autres cytokines. Par exemple, est-il possible qu'une autre cytokine, dont l'effet en terme de changement fonctionnel est plus important sur les macrophages, ait une influence importante sur les propriétés mécaniques du macrophage, et moindre sur celles des cellules dendritiques ?

3.2 l'IFN γ induit une rigidification globale

3.2.1 Effet sur les macrophages

L'IFN γ est un bon candidat pour tester cette hypothèse. Comme nous l'avons mentionné dans la partie introductive de ce manuscrit, c'est une cytokine omniprésente lors de la réponse inflammatoire. Sécrétée majoritairement par les lymphocytes T et les cellules NK ("tueuses"), elle agit comme un activateur puissant des macrophages (son appellation originelle est d'ailleurs "facteur d'activation des macrophages"). Entre autre, sa présence induit sur ces derniers une augmentation de leurs propriétés antimicrobiales et antitumorales directes, ainsi qu'un renforcement de leur faculté d'ingestion et de présentation antigénique [Schroder *et al.* , 2004b].

Nous avons donc cultivé les macrophages une fois différenciés en présence d'IFN γ ³ à 1 μ g/mL pendant 24h. Ce traitement a induit, comme attendu, une augmentation de l'expression des marqueurs surfaciques de présentation antigénique, comme on le voit sur la figure 3.8.

Pour les mesures d'analyse mécanique dynamique, nous avons appliqué un protocole en tout point pareil à celui décrit précédemment (traitement à la trypsine, agitation pendant 2h, traitement des lamelles à la fibronectine). La figure 3.9 rassemble les graphes d'occurrences cumulées obtenus pour ces expériences effectuées sur N=18 cellules issues de plus de 3 donneurs différents. Nous y voyons que l'effet de l'IFN γ sur la visco-élasticité des macrophages est, tout comme celui de TNF α +PGE $_2$ sur les cellules dendritiques, assez fort, mais induit au contraire une rigidification des cellules. Ainsi $\overline{G'}$

3. Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany

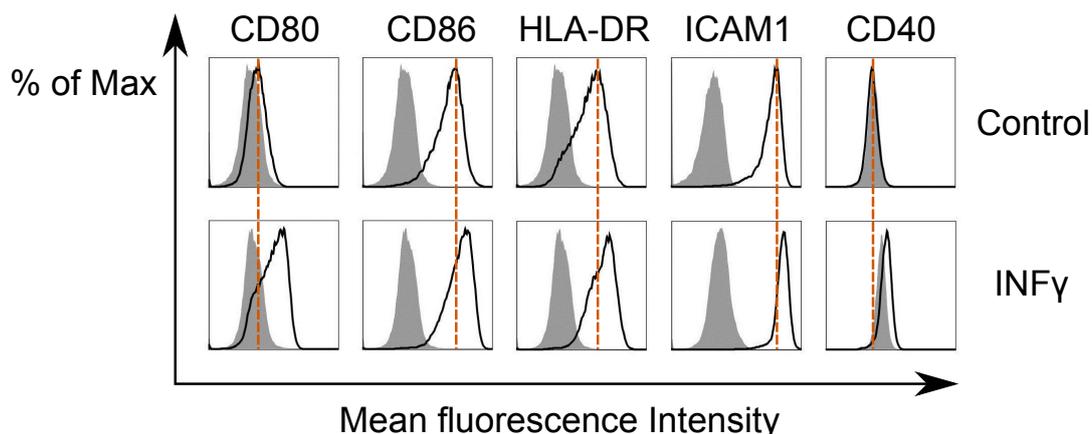


FIGURE 3.8 – Evolution des marqueurs de surface après traitement des macrophages à l'IFN γ . L'intensité de fluorescence des protéines de surface CD80, CD86, HLA-DR, CD40 et ICAM1 augmente (échelle log). Données obtenues par M. Saitakis, Institut Curie.

passe de 900 (+110/-100) Pa à 1450 (+160/-150) Pa (+61%) ; $\overline{G''}$ de 350 (± 30) Pa à 530 (± 40) Pa (+51%) ce qui se traduit sur $\overline{G_0}$ qui augmente de 970 (+110/-100) Pa à 1540 (+170/-150) Pa (+58%) et α de 0.16 (± 0.04) à 0.19 (± 0.01) (+19%). Ces résultats sont en accord avec une étude publiée quelques mois après ces expériences par [Patel *et al.*, 2012] sur des macrophages d'une lignée murine, montrant une augmentation de 70% de la rigidité cellulaire après incubation avec IFN γ , mesurée par pinces magnétiques. Ici encore, on voit que lorsque les concentrations en co-stimulateurs et ligands du TCR augmentent à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène, sous l'effet d'un facteur inflammatoire, on observe en parallèle une modification des propriétés mécaniques de la cellule. Toutefois, cette modification est ici dans le sens contraire à l'effet induit par TNF α +PGE $_2$ sur les cellules dendritiques (augmentation de la rigidité au lieu de la baisse observée pour TNF α +PGE $_2$).

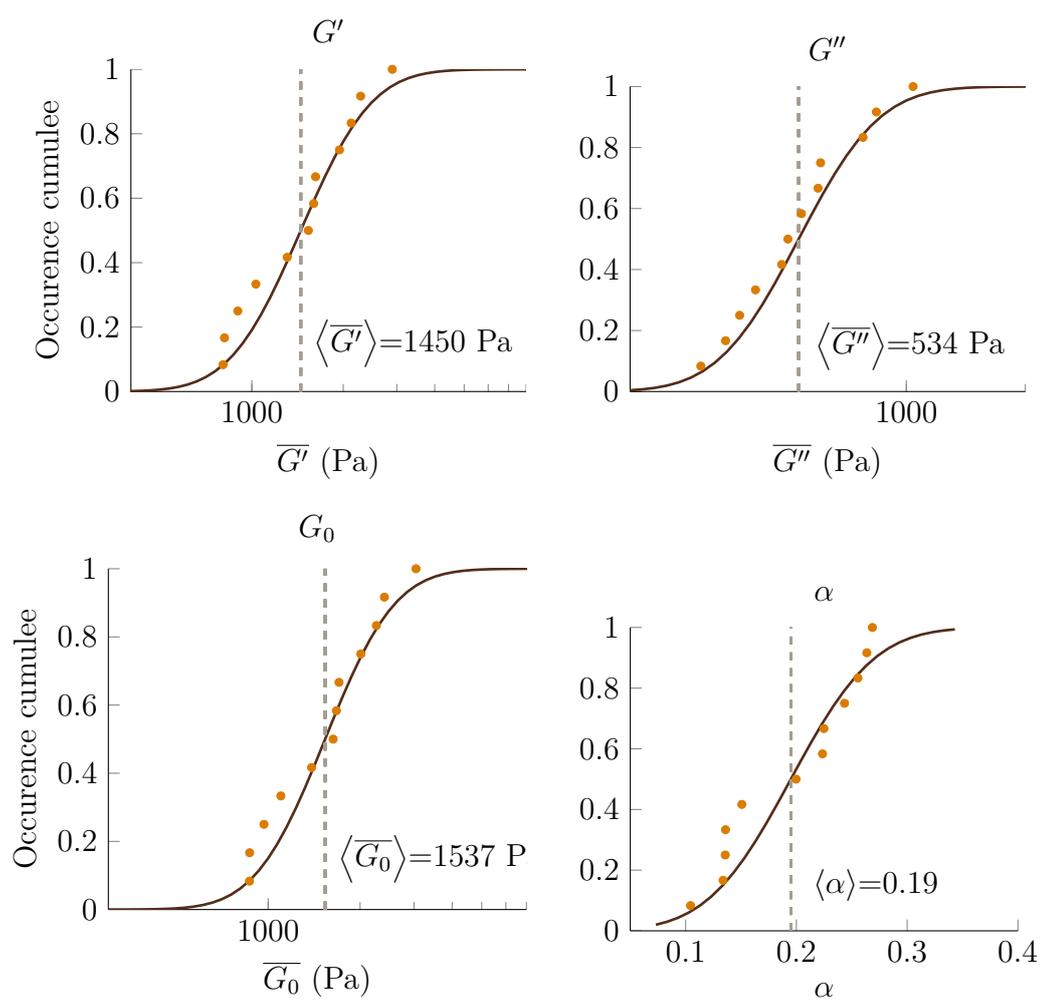


FIGURE 3.9 – Occurrences cumulées pour les Macrophages incubés en présence d'IFN γ

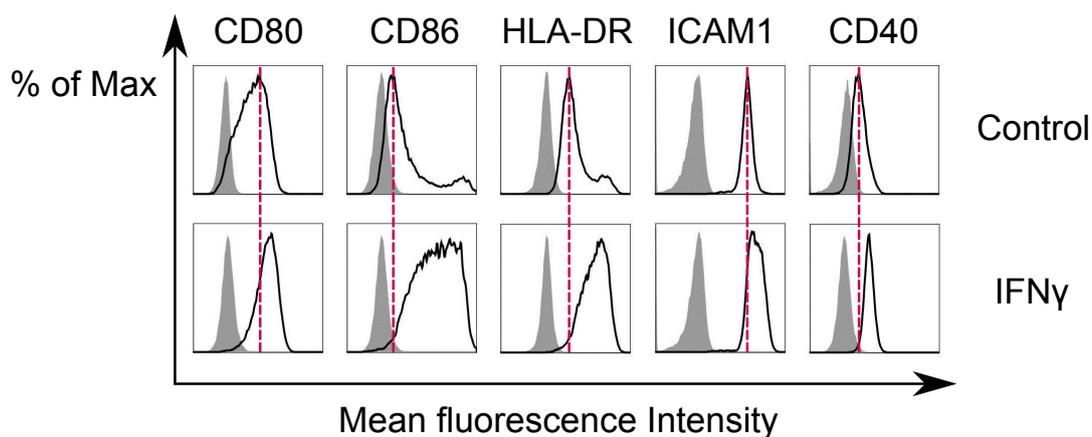


FIGURE 3.10 – **Evolution des marqueurs de surface après traitement des cellules dendritiques à l'IFN γ** . L'intensité de fluorescence des protéines de surface CD80, CD86, HLA-DR, CD40 et ICAM1 augmente (échelle log). Données obtenues par M. Saïtakis, Institut Curie.

3.2.2 Effet sur les cellules dendritiques

Nous avons ensuite soumis les cellules dendritiques dérivées de monocytes aux mêmes conditions. Après incubation pendant 24h en présence d'IFN γ à la même concentration que celle administrée aux macrophages, l'expression des marqueurs surfaciques impliqués dans la présentation antigénique est augmentée, indiquant qu'une modification des cellules dendritiques a eu lieu, au moins au niveau du paysage moléculaire qu'elles présentent à leur surface (figure 3.10).

Ces modifications de l'expression des marqueurs de présentation antigénique s'accompagnent de traits phénotypiques (morphologiques) variés. Nous pouvons les regrouper en trois populations différentes. Premièrement, nous avons remarqué qu'une partie des cellules devenaient adhérentes et collaient au fond de la boîte. Nous avons donc divisé les cellules selon qu'elles étaient présentes dans le surnageant ou non.

Les cellules collées au fond de la boîte étaient décollées en cisailant vigoureusement mais avec précaution à l'aide d'une pipette. La population de cellules présentes dans le surnageant semblait encore se diviser en deux sous-populations : une première sous-population rassemble des cellules rondes, lisses et peu adhérentes aux microplaques du rhéomètre. La seconde présente des cellules plus anisotropes capables d'une certaine adhérence aux microplaques, mobiles et rampant entre les plaques (ce qui n'aidait pas à la prise de mesures!!).

Dans la population adhérente au fond de la boîte, le comportement statique et motile était aussi observé, sans pour autant que des différences morphologiques ne les distinguent. La comparaison des résultats en terme de viscoélasticité pour ces quatre populations est donnée en figure 3.11. Nous y voyons que, si dans la population adhérente, les deux sous-populations statique et motile observent la même distribution de module, les propriétés mécaniques des cellules statiques ou motiles de l'autre parmi les cellules non adhérentes ont deux distributions bien distinctes (figure 3.11).

Notre interprétation est que la différenciation par IFN γ n'est pas complète pour les cellules rondes et statiques parmi la population non adhérente, dont l'aspect est plutôt semblable à celui des cellules non traitées, qui se traduit par une rigidité différente, en l'occurrence plus basse. Par ailleurs, il a été montré sur une lignée monocyttaire humaine que l'IFN γ augmente l'adhésion cellulaire [Chang *et al.*, 2002], ce qui donne un argument supplémentaire pour la non-différenciation de ces cellules rondes et statiques, qui par ailleurs adhèrent très peu aux microplaques. Ceci est renforcé par les résultats d'analyse de FACs effectués par M. Saïtakis⁴ où on voit que l'expression du marqueur CD86, co-stimulateur du TCR, n'est pas homogène dans la population (figure 3.10, distribution étalée et non gaussienne). Finalement, pour comparer l'effet de l'IFN γ sur les cellules dendritiques, nous avons donc conservé les résultats des populations motiles du surnageant et celles adhérant au fond de la boîte, décollées par cisaillement. Comme nous avons longtemps tâtonné avant d'arriver à cette conclusion, le nombre de cellules testées au final est assez conséquent. Cela nous a amené à une distribution comprenant N=55 cellules prélevées sur de nombreux donneurs (environ 10), et dont les graphes d'occurrence cumulée sont représentés en figure 3.12.

Nous y voyons que l'IFN γ augmente également la rigidité des cellule dendritiques : $\overline{G'}$ passe de 440 (+110/-90) Pa à 770 (+110/-100) Pa (+75%); $\overline{G''}$ de 190 (± 30) Pa à 300 (± 30) Pa (+61%) ce qui donne une augmentation de 530 (+110/-90) Pa à 870(+110/-100) Pa pour $\overline{G'}$ (+64%) et aucun effet sur α qui passe de 0.15 (± 0.01) à 0.16 (± 0.01). Cet effet est comparable, sinon plus important, à celui observé sur les macrophages : ici encore, l'acquisition de fonctions présentatrices d'antigène après stimulation par l'IFN γ s'accompagne d'une modification de la rigidité cellulaire, dans le sens d'une augmentation.

Lorsqu'on s'attarde à la simple morphologie de ces cellules, nous observons une propriété intéressante. De la même façon que les macrophages traités à TNF α +PGE₂ montrent des traits phénotypiques caractéristiques des cellules dendritiques, ces dernières, lorsqu'elles sont incubées en présence d'IFN γ acquièrent des ressemblances au macrophages. La figure 3.13 l'illustre : si elles gardent leur anisotropie, leur aspect est beaucoup plus granuleux, ce qui est caractéristique des macrophages par rapport aux cellules non traitées qui sont rondes et lisses et présentent des excroissances (les dendrites). Ici, l'ajout d'une cytokine activatrice qui influence les fonctions microbicides des macrophages semble infléchir le phénotype des cellules dendritiques vers celui des macrophages, tandis que plus haut, l'ajout d'une cytokine qui promeut les facultés de présentation antigénique et migratoires des cellules dendritiques infléchissait le phénotype des macrophages vers celui des cellules dendritiques.

3.2.3 Discussion

Ainsi, contrairement aux cytokines TNF α +PGE₂, l'IFN γ induit une réponse à peu près équivalente chez les cellules dendritiques (dont on a toutefois retiré celles dont la morphologie indiquait une différenciation incomplète) et les macrophages, comme il est récapitulé sur la figure 3.14. Cette fois, l'effet n'est donc pas différent sur les cellules

4. Les profils d'expression de fluorescence étaient semblables pour la population adhérente et non-adhérente, et les résultats présentés en figure 3.10 ont été obtenus sur les deux populations mélangées.

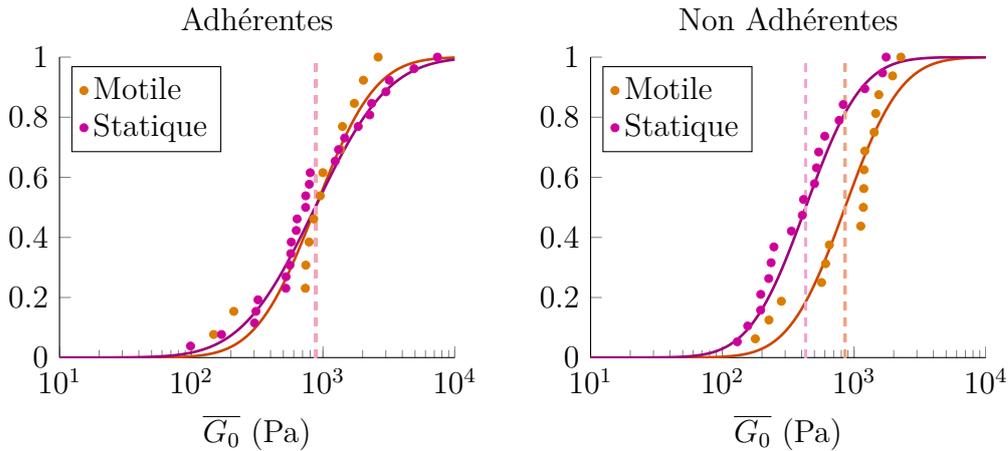


FIGURE 3.11 – **Différentes population de cellules dendritiques après traitement à l'IFN γ** : La différence entre les cellules statiques et motiles des cellules adhérant au fond de la boîte (à gauche) ne semble pas avoir d'impact sur le module effectif ($p=0.57$), alors que pour celles non adhérentes que l'on retrouve dans le surnageant (à droite), ces distinctions phénotypiques entre cellules motiles et statiques s'accompagnent d'une différence de module effectif ($p=0.019$).

dendritiques et les macrophages, que ce soit en terme d'expression de marqueurs surfaciques ou en terme de modification des propriétés mécaniques à l'échelle de la cellule entière.

Les cellules dendritiques qui rencontrent l'IFN γ dans leur environnement ne sont pas les mêmes que celles qui sont devenues matures sous l'effet de TNF α +PGE $_2$. Ce sont plutôt des cellules stationnaires, chargées de la sécrétion d'IL12 *in situ*, qui induit la production d'IFN γ par les lymphocytes Th1 auxquelles elles sont donc exposées en retour. Plusieurs études indiquent que l'IFN γ régule négativement la migration des cellules myéloïdes [Robson *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2008], et en particulier celle des cellules dendritiques de lignée monocyttaire, chez la souris [Wu *et al.*, 2006]. Ce phénomène pourrait se retrouver chez l'humain, et la baisse de capacité migratoire pourrait s'expliquer par l'augmentation de la rigidité cellulaire que nous observons ici, qui réduit la déformabilité de la cellule. Il a même été observé que l'IFN γ peut moduler l'activité de Rac et Cdc42 chez des monocytes primaires humains [Hu *et al.*, 2008], ce qui laisse entendre que la baisse de capacités migratoires peut-être due à une modulation de l'activité ou de l'organisation du cytosquelette.

L'influence de l'IFN γ sur la phagocytose des macrophages reste assez floue, certaines études montrant une capacité microbicide accrue (macrophages : [Schroder *et al.*, 2004b; Ely PK Givan, AL Graziano, RF Guyre, PM Fanger, MW, 1996], neutrophiles : [Schiff *et al.*, 1997; Marchi *et al.*, 2014]), et d'autres le contraire (macrophages monocytaires : [Frausto-Del-Río *et al.*, 2012; Schlesinger & Horwitz, 1991])⁵. Sous notre microscope, on peut observer que les macrophages activés par l'IFN γ ont morphologi-

5. Une capacité microbicide accrue n'est cependant pas forcément corrélée avec une augmentation de la phagocytose

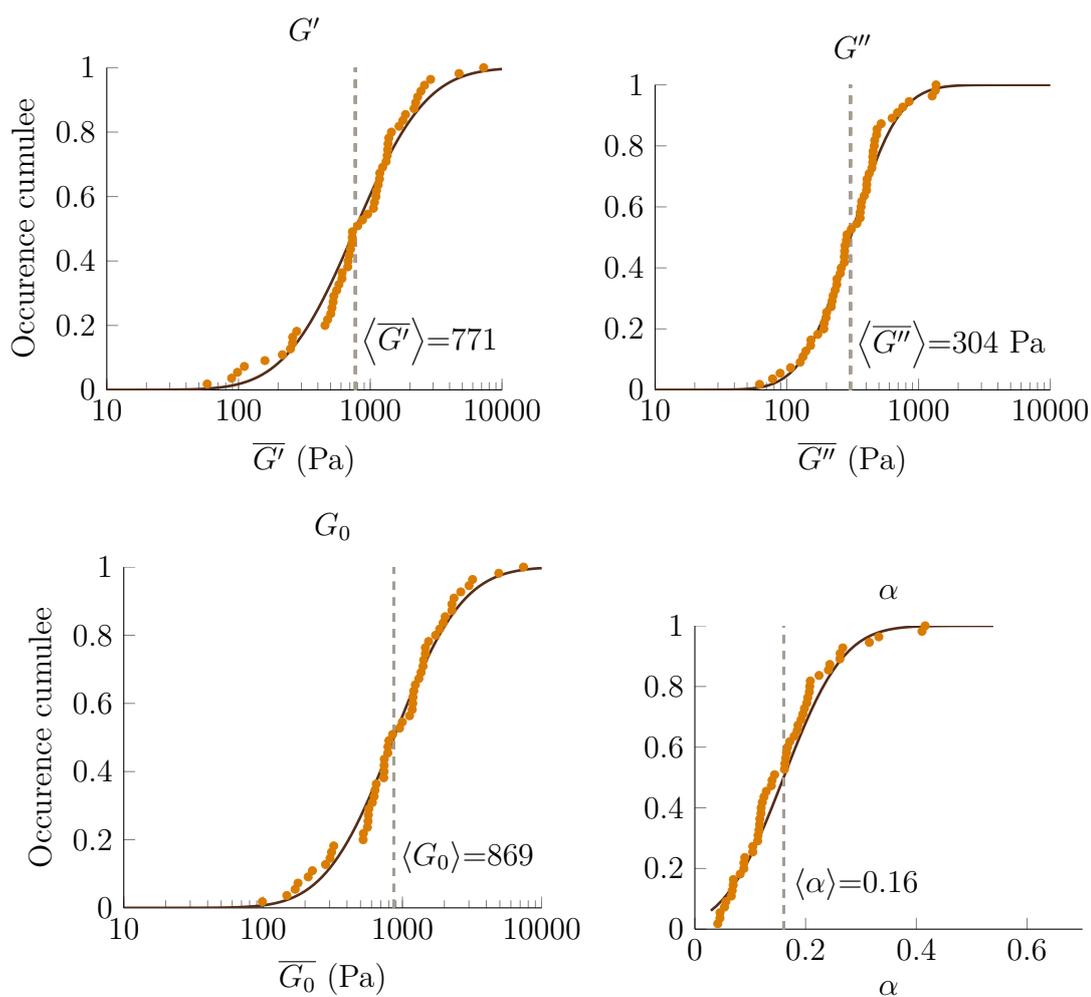


FIGURE 3.12 – Occurrences cumulées pour les cellules dendritiques incubées en présence de IFN γ . Les points de données rassemblent chaque cellule testée parmi la population adhérente et décollées de la boîte de culture par cisaillement doux, plus les cellules motiles de la population non-adhérente dans la boîte de culture.

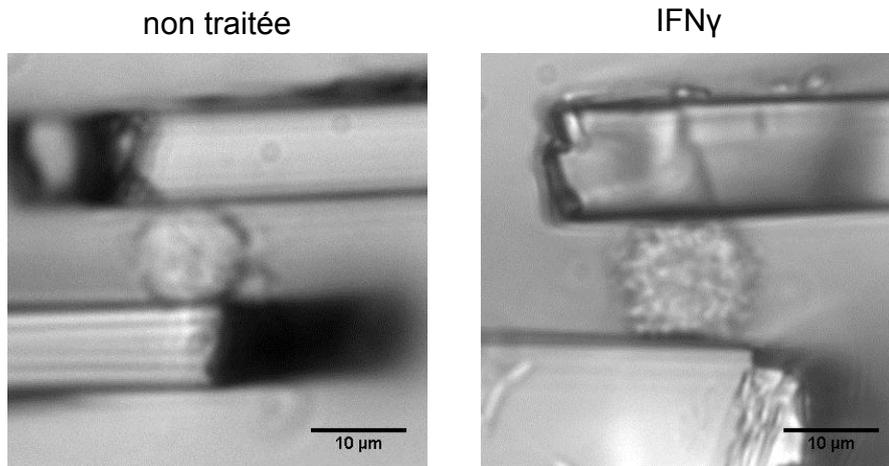


FIGURE 3.13 – **IFN γ change la morphologie des cellules dendritiques.** Images en lumière blanche d'une cellule dendritique non traitée et traitée à l'IFN γ , à l'instant initial d'une mesure d'analyse mécanique dynamique. De la même façon que les macrophages traités avec TNF α +PGE $_2$ montrent des traits phénotypiques des cellules dendritiques, les cellules dendritiques incubées en présence d'IFN γ montrent une granulosité accrue, trait phénotypique caractéristique des macrophages.

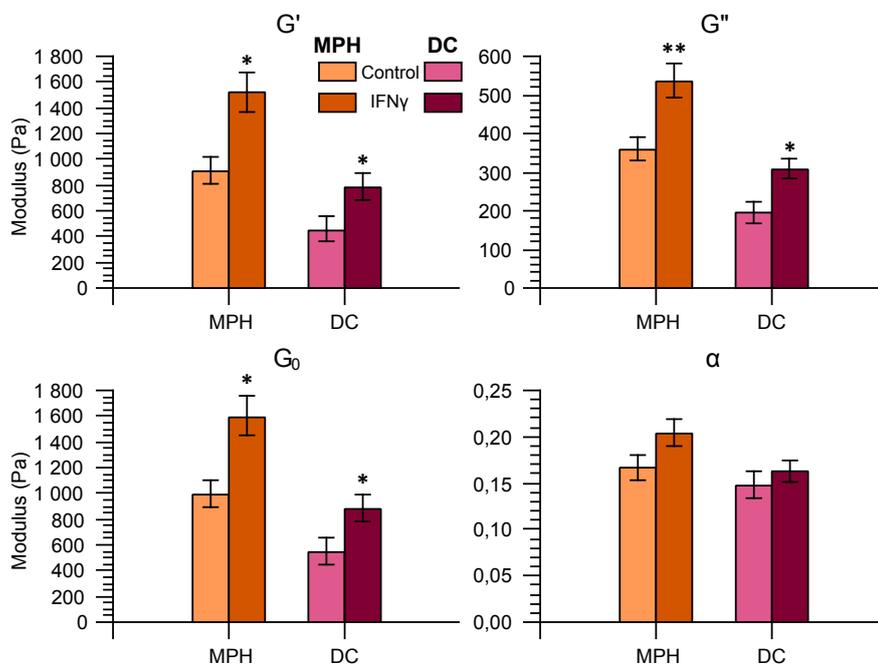


FIGURE 3.14 – **Effet de l'IFN γ sur cellules dendritiques (DC) et macrophages (MPH).** Les symboles * représentent les p-valeurs obtenues par le test statistique de Mann-Whitney-U (* pour $p < 0.05$, ** pour $p < 0.01$, *** pour $p < 0.001$).

quement un aspect beaucoup plus rond et nous verrons un peu plus loin qu'ils s'étalent moins fréquemment entre les plaques (voir paragraphe 3.4, figure 3.21 p.138).

Pour estimer le lien avec la phagocytose, nous avons également tenté de voir si la rigidité accrue des macrophages s'accompagnait d'une augmentation de la traction cellulaire. Mais les résultats étaient peu concluants : sur 13 cellules testées, seulement deux ont produit une force mesurable, dont la moyenne s'élève à 40nN. Cette valeur est certes plus élevée que la valeur moyenne développée par les cellules non traitées (20nN), mais étant effectuée sur seulement deux cellules, ne peut permettre de conclure. Mais l'observation d'une perte d'étalement drastique que nous discuterons plus en détail au paragraphe 3.4 mène à penser que l'effet de l'IFN γ est plutôt délétère sur la phagocytose. En effet, nous avons observé que la phagocytose ne semble pas reposer sur une capacité de traction accrue potentiellement liée à la grande rigidité des cellules au travers d'une contractilité augmentée, mais serait plutôt due à une grande plasticité locale de la membrane. Une rigidité encore plus élevée accompagnée d'une perte de faculté d'étalement ne pourrait, dans ce scénario, qu'entraver la phagocytose.

Ainsi, chez les cellules dendritiques comme chez les macrophages, IFN γ augmente la rigidité cellulaire, ce qui pourrait avoir une incidence sur la migration des cellules dendritiques d'une part, et la phagocytose du macrophage d'autre part. Pour tester ces hypothèses, nous pourrions quantifier la migration des cellules dendritiques, soit sur un substrat plan, soit dans des canaux microfluidiques de dimension comparables aux vaisseaux lymphatiques, soit dans des substrats en trois dimensions plus ou moins denses, en présence ou non d'IFN γ . Nous aurions alors accès à une corrélation directe, s'il y en a entre rigidité cellulaire et propension migratoire. Nous pourrions également assez facilement mesurer les capacités phagocytiques des macrophages, en présence ou non d'IFN γ , par des protocoles similaires à ceux mis en place par Cannon & Swanson [1992], Champion & Mitragotri [2006] ou Paul *et al.* [2013]. Un projet plus ambitieux, qui pourrait constituer le point de départ d'une thèse, serait d'essayer d'élucider la décorrélation entre déformabilité locale et rigidité globale des macrophages. Mesurer la rigidité corticale locale par pinces optiques ou magnétiques, étudier l'effet des protéines ERM par des inhibiteurs ou des knock-out sur la phagocytose, mesurer la tension membranaire par des expériences d'aspiration locale (comme mis en place par Gauthier *et al.* [2011]), et ce en présence ou non d'IFN γ pourrait constituer un programme d'expériences préliminaires pour l'élucidation de ces questions.

3.3 Le LPS affecte peu la rigidité cellulaire

Le LPS est une molécule présente à la surface des parois des bactéries gram-négatives. Contrairement à TNF α +PGE $_2$ et IFN γ , c'est un facteur inflammatoire exogène : il n'est pas synthétisé par l'organisme au cours d'une réponse inflammatoire, mais est un signal extérieur, provenant des bactéries, et indiquant leur présence dans l'organisme. Comme nous l'avons expliqué en introduction (paragraphe 1.1.1), le LPS peut ensuite être dégradé et servir de marqueur chimiotaxique pour la signalisation inflammatoire.

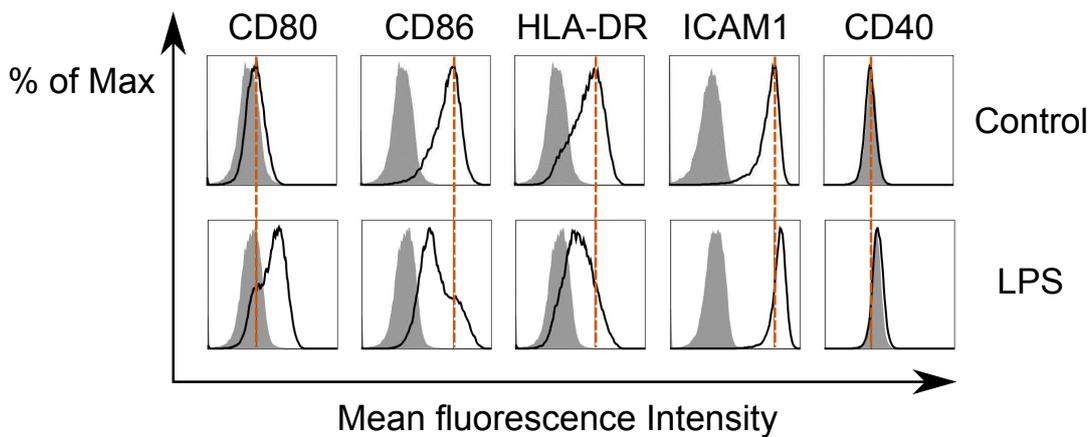


FIGURE 3.15 – Evolution des marqueurs de surface après traitement des macrophages au LPS (échelle log). Données obtenues par M. Saïtakis, Institut Curie.

3.3.1 Effet sur les macrophages

Les macrophages détectent un fragment de cette longue molécule, ce qui déclenche leur activation : ils acquièrent alors leurs fonctions microbicides, et sécrètent des cytokines. La réponse au LPS est plus importante en présence d'IFN γ [Schroder *et al.*, 2004a], aussi avons-nous voulu étudier si l'activation des macrophages par le LPS conduisait également à une augmentation de la rigidité.

Les macrophages obtenus par le protocole décrit en paragraphe 2.2.1 ont donc été incubés pendant 24h en présence de 5 μ g/mL de LPS⁶. L'incubation des macrophages en présence de LPS conduit à une légère augmentation des molécules CD40 et ICAM1 (co-stimulateurs du TCR), une augmentation plus importante de CD80, et plus étonnamment une diminution de CD86 (qui se lie à CD28) et de HLA-DR (molécule du complexe majeur d'histocompatibilité liant le TCR) (figure 3.15). Les effets du LPS sur la faculté de présentation antigénique des macrophages sont donc contrastés.

Les graphes d'occurrence cumulée sont présentés en figure 3.16. On y voit, comme d'accoutumée, une distribution uniforme. Les valeurs des modules ne semblent pas être modifiés aussi amplement que lors de l'incubation avec l'IFN γ . Ainsi, $\overline{G'}$ passe de 900 (+110/-100) Pa à 960 (+130/-110) Pa (+6%), $\overline{G''}$ de 350 (\pm 30) Pa à 410 (\pm 40) Pa (+17%), ce qui résulte en une variation de $\overline{G_0}$ de 970 (+110/-100) Pa à 1060 (+140/-120) Pa (+8%) et une variation de α de 0.16 (\pm 0.04) à 0.21 (\pm 0.02) (+25%). Contrairement à IFN γ , l'activation des macrophages par le LPS ne s'accompagne pas d'augmentation significative de la rigidité cellulaire globale (voir figure 3.19). Ces résultats sont en contradiction avec les observations de Patel *et al.* [2012] qui, sur des macrophages alvéolaires de souris, ont observé une augmentation de 2.7 fois de la rigidité cellulaire. Ces mesures ont été effectuées par pinces optiques, et sondent plutôt la rigidité du cortex que celle de la cellule dans son ensemble, que mesure le rhéomètre à cellule unique dont nous disposons. La concentration de LPS utilisée par cette équipe était de 1 μ g/mL pendant 24 heures, c'est à dire cinq fois moins que ce que nous avons

6. Invivogen, San Diego, US

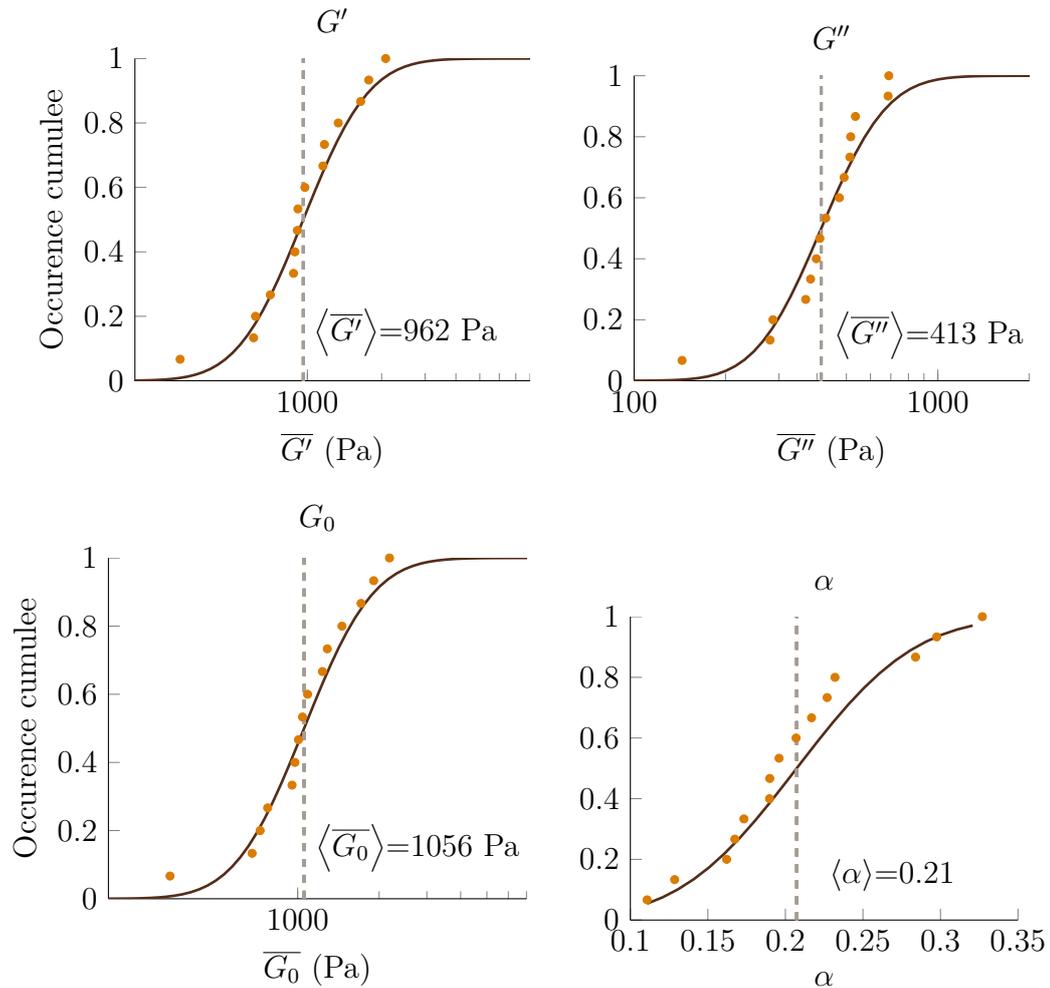


FIGURE 3.16 – Occurrences cumulées des macrophages incubés en présence de LPS

administré, mais pendant la même durée. Ceci peut indiquer que l'effet du LPS sur la rigidité des macrophages serait dose-dépendant, et plus important aux faibles concentrations. Cependant, il est probable que la divergence des observations proviennent de l'éloignement des deux types cellulaires (macrophages alvéolaires murins contre macrophages dérivés de monocytes primaires humains). En tout état de cause, on peut noter ici que, en ce qui concerne nos propres mesures, ces modifications non significatives de la rigidité des macrophages corrélaient avec une évolution contrastée de l'expression des marqueurs de surface (figure 3.15).

3.3.2 Effet sur les cellules dendritiques

Ici encore, nous avons voulu savoir si le LPS pouvait avoir un effet différent sur les propriétés mécaniques des cellules dendritiques par rapport aux macrophages. L'effet du LPS sur les cellules dendritiques est important : il induit, à court terme, une perte de capacités migratoires et une augmentation de la capture antigénique [Faure-André *et al.*, 2008], mais à plus long terme ($t > 4h$, où nous nous plaçons), il induit progressivement une perte de l'activité de capture antigénique et un recouvrement de fonctions migratoires [Granucci *et al.*, 1999]. Sur les cellules dendritiques dérivées de monocytes,

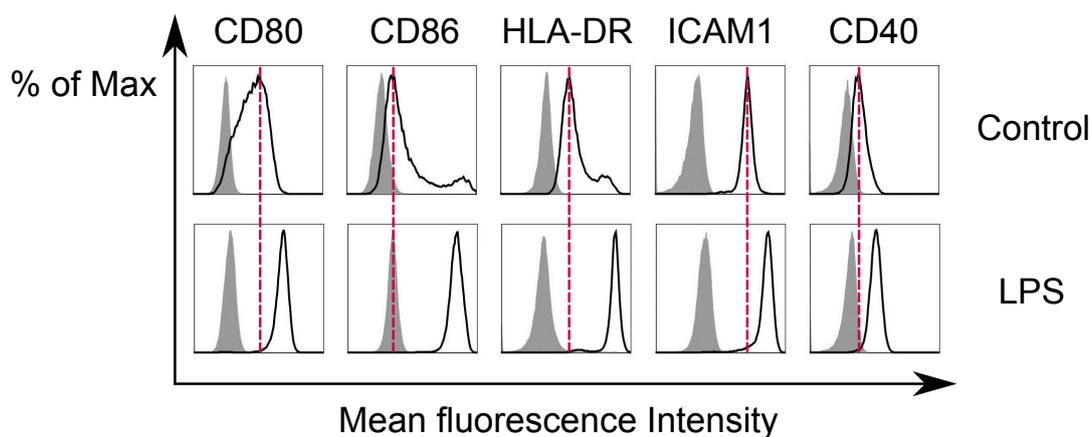


FIGURE 3.17 – Evolution des marqueurs de surface après traitement des cellules dendritiques au LPS. Données recueillies par M. Saïtakis, Insitut Curie (échelle log). Données obtenues par M. Saïtakis, Institut Curie.

similaires à celles de cette étude, il a été observé que les cellules ayant été en présence de LPS induisaient une activation efficace des lymphocytes T [Kwan *et al.* , 2007]. Une autre étude a rapporté que sur des cellules de souris, le LPS peut induire une activité sécrétrice de cytokines, mais pas une maturation en activatrice du lymphocyte T efficace [Nolte *et al.* , 2007]. Enfin, une étude menée *in vivo* sur patients sains a montré que la respiration de hautes concentrations de LPS induisait une maturation des cellules dendritiques [Alexis *et al.* , 2005].

Nous avons donc soumis les cellules dendritiques issues de monocytes primaires au même protocole d'incubation au LPS que les macrophages. Les résultats de cytométrie de flux, présentés en figure 3.17 sont en accord avec la littérature, puisqu'on y voit que toutes les molécules de surface observées sont très nettement sur-exprimées (échelle log).

Les résultats d'analyse mécanique dynamique obtenus pour $N=32$ cellules sont présentés sous forme de graphe d'occurrence cumulée en figure 3.18. On y note une variation de $\overline{G'}$ de 440 (+110/-90) Pa à 690 (+130/-110) Pa (+56%), de $\overline{G''}$ de 190 (± 30) Pa à 310 (± 40) Pa (+63%), ce qui résulte en une augmentation de $\overline{G_0}$ de 530 (+110/-90) Pa à 790 (+140/-120) Pa (+48%) et aucune incidence sur α (de 0.15 (± 0.03) à 0.14 (± 0.01)), traduisant le fait que $\overline{G'}$ et $\overline{G''}$ sont affectés de la même façon. Il faut toutefois noter que ces différences, hormis pour G'' , ne sont pas significatives (voir figure 3.19), probablement à cause de distributions trop dispersées, et qu'il faut donc considérer ces résultats avec précaution. On voit donc ici que, malgré la très nette augmentation des marqueurs de surface, l'effet du LPS sur la rigidité des cellules dendritiques est mineur. On peut noter toutefois que, comparativement aux macrophages, l'effet du LPS est plus marqué sur les cellules dendritiques pour lesquelles l'expression marqueurs de surface augmente suite à l'incubation au LPS.

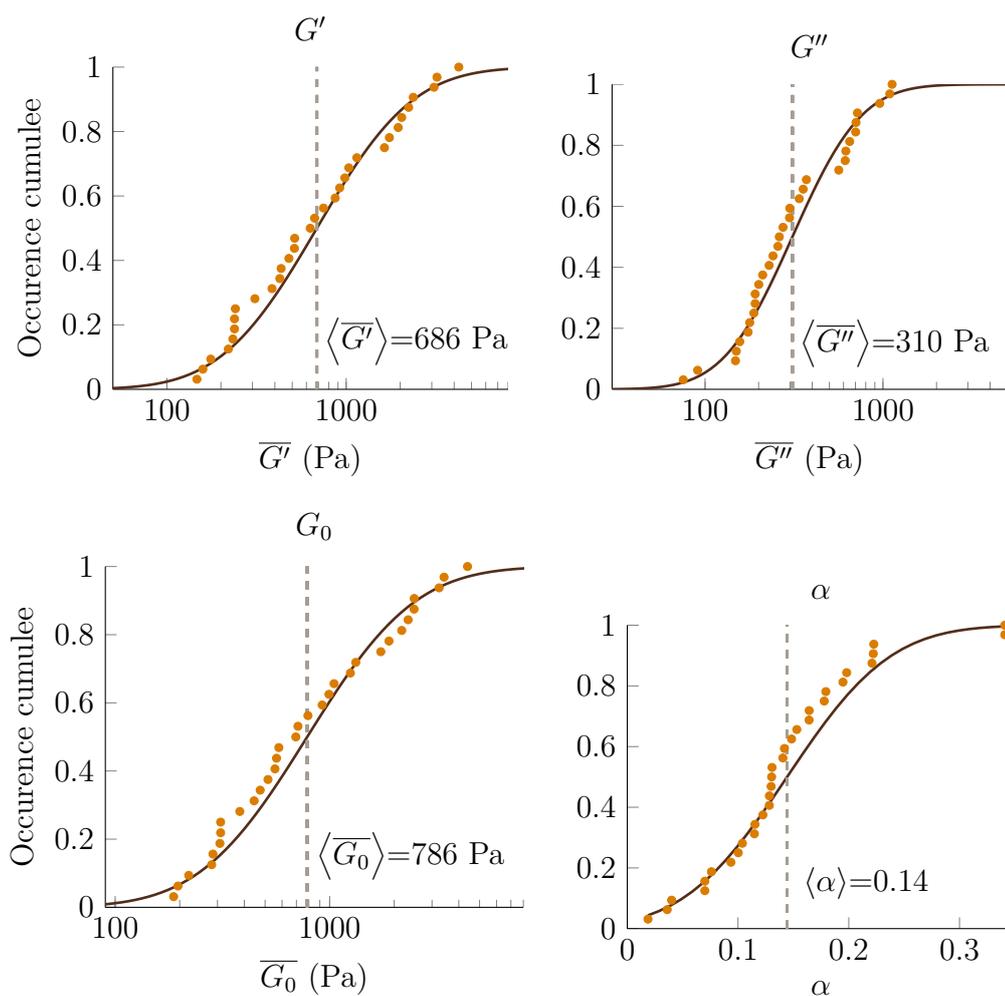


FIGURE 3.18 – Occurrences cumulées des cellules dendritiques incubées en présence de LPS.

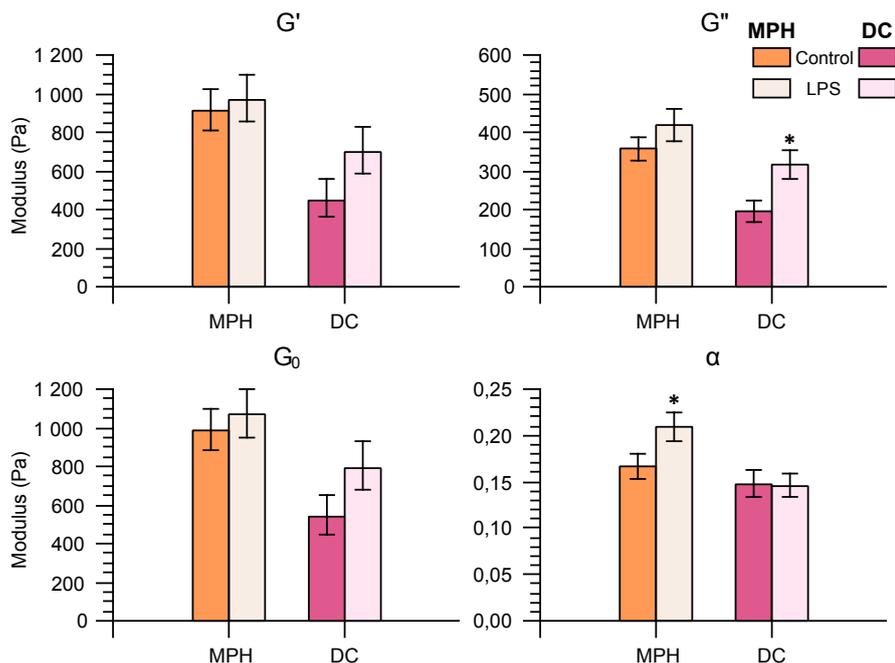


FIGURE 3.19 – Effet du LPS sur cellules dendritiques (DC) et macrophages (MPH). Les symboles * représentent la valeur des p-valeurs obtenues par le test statistique de Mann-Whitney-U (* pour $p < 0.05$, ** pour $p < 0.01$, *** pour $p < 0.001$).

3.3.3 Discussion

Nous avons rassemblé en figure 3.19 les résultats des expériences d'analyse mécanique dynamique effectuées sur les deux types cellulaires traitées au LPS. Sur les cellules dendritiques, seules les statistiques obtenues sur $\overline{G''}$ apparaissent comme significativement différentes du cas non traité. Un ?il averti peut déclarer discerner la même tendance sur les macrophages, mais l'augmentation du module de perte n'apparaît pas comme significative. Nous voyons donc que pour ce troisième type de facteur inflammatoire, qui a la particularité d'être exogène, l'effet semble être plus marqué sur les cellules dendritiques, qui sont également celles dont l'expression des marqueurs de surface est la plus amplifiée.

En tout état de cause, le LPS semble avoir un effet moindre et non significatif sur la rigidité cellulaire que les deux autres molécules pro-inflammatoires que nous avons étudiées, malgré le fait qu'il induit une augmentation nette de l'expression des molécules de surface sur les cellules dendritiques. On peut le comprendre par le fait que ce facteur est exogène, c'est-à-dire, qu'il n'est pas synthétisé par l'organisme mais qu'il provient au contraire de l'extérieur. Il se peut que du LPS soit dans l'organisme par hasard, et d'ailleurs, parmi les bactéries qui résident dans le tube digestif, nombreuses sont celles de type gram-négatives qui présentent donc du LPS à leur paroi. Le LPS n'est donc qu'un marqueur de présence bactérienne, qui peut conduire à l'amplification de l'effet de facteurs inflammatoires. Au contraire, $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$ et $\text{IFN}\gamma$ sont des molécules de signalisation synthétisées par l'organisme : elles ne proviennent pas d'un organisme extérieur mais sont endogènes, et ne sont donc pas présentes par hasard. En outre, la

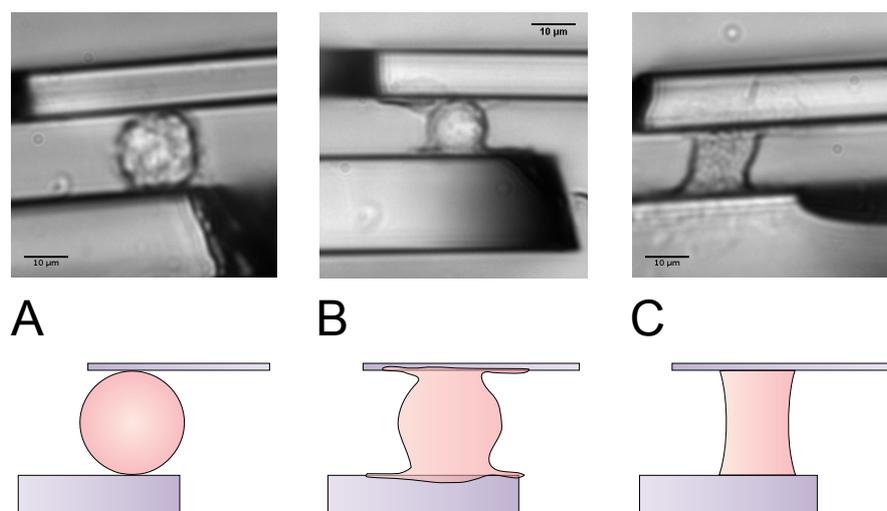


FIGURE 3.20 – **Différents comportements d'étalement des macrophages** : A) la cellule, ronde et granuleuse, adhère entre les plaques sans changer de forme. B) La cellule développe des projections de membrane locales au niveau des microplaques. C) la cellule, en plus de l'étalement membranaire, opère à une modification de la courbure globale pour atteindre une forme de caténoïde. C'est seulement ce dernier cas qui permet l'apparition de forces de tractions.

mise en place de ces signaux inflammatoires internes nécessite la présence cumulée de plusieurs signaux d'alerte, dont le LPS fait partie. Contrairement au LPS, la présence de ces cytokines révèle donc systématiquement un état particulier d'alerte, dans lequel l'organisme se doit réellement de réagir, et une très forte sensibilité à ces signaux paraît logique.

On peut également argumenter que les modifications que le LPS engendrent n'ont peut-être aucun avantage à interférer avec les propriétés du cytosquelette chez le macrophage. Si le $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$ permet aux cellules dendritiques d'acquérir des capacités migratoires accrues, et l' $\text{IFN}\gamma$ de les diminuer, alors diminuer ou augmenter la raideur cellulaire, respectivement, est un moyen direct d'y parvenir. De la même façon, si au bout de 24h d'incubation en présence de LPS les cellules dendritiques ont des capacités migratoires peu affectées alors que ce n'est pas le cas dans les temps courts après stimulation [Faure-André *et al.*, 2008; Granucci *et al.*, 1999], et si l'on convient qu'à l'heure actuelle aucun effet n'est documenté sur la migration des macrophages après incubation au LPS, mais que seule l'augmentation des facultés sécrétoires et microbicides a été démontrée, alors le fait que les rigidités cellulaires ne soient que modérément modifiées n'est pas dénué de sens.

3.4 Effet des cytokines sur le comportement adhésif des macrophages

Parmi les cellules que nous avons étudiées, les macrophages sont les seules à parvenir, dans un certain nombre de cas, à ce que l'on peut qualifier un étalement total entre

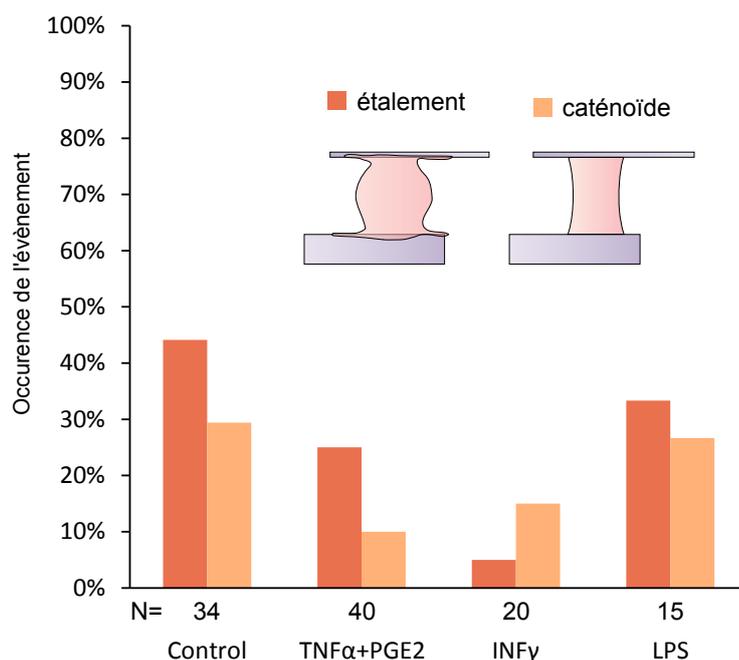


FIGURE 3.21 – Statistiques sur le comportement en étalement des macrophages : Sur toutes les cellules observées aux microplaques, nous avons compté combien formaient le phénotype B (étalement) et C (caténoïde). Les résultats sont exprimés en terme de pourcentage par rapport au nombre total de cellules testées dans chaque condition.

les deux plaques. Trois cas de figure se distinguent, et sont répertoriés en figure 3.20. Premièrement, un certain nombre de cellules restent en place sans montrer le moindre signe d'étalement (figure 3.20-A) : c'est en fait ce qui se produit dans la majorité des cas. Ensuite, il arrive que certaines cellules forment des projections membranaires, et recouvrent une grande partie des microplaques sans pour autant modifier la forme sphérique de leur corps cellulaire : c'est ce qui est illustré en figure 3.20-B. Enfin, certaines cellules parviennent à s'étaler complètement et à former la caténoïde que nous observons d'habitude systématiquement lorsque nous faisons cette expérience sur des fibroblastes ou des myoblastes (figure 3.20-C). Si les macrophages sont les seules à avoir un comportement similaire aux myoblastes et fibroblastes, celui-ci n'apparaît cependant pas systématiquement, mais dans moins de la moitié des cas : leur propension à l'étalement est donc toute relative.

Nous avons donc compté la fréquence d'occurrence des phénotypes B et C (étalement et caténoïde) pour les macrophages cultivés ou non en présence de TNF α +PGE $_2$, d'INF γ et de LPS. Les résultats sont présentés en figure 3.21. On y observe que, dans le cas sans traitement, seule moins de la moitié des cellules produisent les phénotypes B et C (44 et 29% des cellules observées, respectivement, sur N=34 cellules testées).

L'ajout de TNF α +PGE $_2$ diminue ces occurrences : 25% des cellules étendent leur membrane (N=40), et seulement 10% atteignent la forme de caténoïde. Cela signifie que, bien que les cellules soient un peu moins rigides par rapport au cas non traité, la

baisse de rigidité ne s'accompagne pas d'une augmentation de la propension à l'étalement, mais plutôt d'une diminution de celle-ci. Le $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$ rend donc les macrophages moins actifs mécaniquement : moins prompts à s'étaler, moins susceptibles d'exercer des forces.

Mais lorsque les cellules sont traitées à l' $\text{IFN}\gamma$, la fréquence baisse encore, et la tendance s'inverse. Seules 5% des cellules forment les projections de membranes seules, et 15% seulement atteignent la forme de caténoïde ($N=20$). Cela veut dire que, si peu de cellules sont capables de s'étaler, celles qui y parviennent atteignent quasi systématiquement la forme de caténoïde. Cela recoupe les observations que nous avons faites sur la traction des macrophages : en effet, nous avons observé, et récemment montré, que l'acquisition de cette forme de caténoïde est nécessaire pour produire des forces de traction [Fouchard, 2012]. L'occurrence de ces forces de traction est bien moindre lorsque les cellules sont traitées à l' $\text{IFN}\gamma$, mais l'amplitude semble être plus élevée (voir paragraphe 3.2.3) : on peut imaginer que, pour les cellules traitées à l' $\text{IFN}\gamma$, l'étalement est à la fois plus rare et plus efficace, et la production de force plus exceptionnelle, mais d'amplitude peut-être plus élevée. Peut-être qu'ici, les protéines ERM jouent un rôle prépondérant en renforçant la cohésion entre membrane et cortex cellulaire, hypothèse qui pourrait être facilement vérifiée en effectuant des expériences semblables, mais en inhibant les ERM.

En outre, nous pouvons conclure qu'en sus d'augmenter la raideur, l' $\text{IFN}\gamma$ diminue drastiquement les facultés d'étalement des macrophages : nous avons là un argument supplémentaire en faveur de la baisse des capacités phagocytiques des macrophages activés par l' $\text{IFN}\gamma$, au profit, probablement, de facultés de présentation antigénique et de sécrétion cytokinique accrues.

Enfin, le traitement au LPS ne semble affecter que modérément le comportement d'étalement des cellules, les occurrences des événements d'étalement diminuant de 44 à 33% et de formation de caténoïde de 29 à 27 % ($N=15$). L'augmentation de $\overline{G''}$ (dissipation) s'accompagne d'une baisse de la formation de projections de membrane sans déformation du corps cellulaire, sans que l'occurrence des événements d'étalement complet avec forme de caténoïde ne soit significativement affectée. On peut remarquer qu'ici encore, ces observations corrént avec l'effet mineur qu'a le LPS sur les molécules de surfaces, du moins sur celles que nous avons considérées. Les modifications de propriétés mécaniques ou de comportement adhésif semblent, dans le cadre de cette étude, être en étroite corrélation avec les modifications observées au niveau des ligands et co-stimulateurs du TCR permettant l'activation efficace du lymphocyte T : mécanique cellulaire et fonctions activatrices sont étroitement liées.

3.5 Conclusions du chapitre et perspectives

A l'issue de ces expériences, nous voyons que l'effet des facteurs inflammatoires étudiés illustre bien la complexité de l'immunologie. Les figures 3.22, 3.23 ainsi que le tableau p.144 et le schéma 3.24 récapitulent les informations amassées dans ce chapitre.

De manière générale, on peut conclure avec suffisamment de certitude que les cytokines $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$ induisent une perte de rigidité cellulaire et une augmentation de

la dissipativité, ce qui est probablement favorable à l'acquisition de faculté migratoires des cellules dendritiques. Inversement, l'IFN γ engendre une augmentation de la rigidité cellulaire, ce qui diminue la déformabilité et de ce fait, réduit les capacités migratoires. L'étude du comportement à l'étalement des macrophages a permis d'apporter un éclairage supplémentaire sur la relation entre IFN γ et phagocytose : comme il engendre une diminution drastique de la propension à l'étalement, nous sommes plutôt enclins à conclure que l'IFN γ devrait réduire la capacité des cellules à phagocyter. Enfin, le LPS, qui est un facteur inflammatoire exogène, semble avoir un effet moindre comparé aux deux autres cytokines. Les cellules seraient-elles plus sensibles aux messagers endogènes ? Étudier l'effet d'autres facteurs inflammatoires, pour compléter la vision très partielle de la réponse de la rigidité à l'inflammation pourrait aider à conclure. Que se passe-t-il, par exemple, dans le cas d'une infection virale ? Les cellules tueuses ont-elles des propriétés mécaniques particulières ? Si oui, quand les acquièrent-elles dans leur différenciation ? Ces questions appellent à un grand travail d'inventaire et de classification, qui, bien que titanesque, permettrait de mieux comprendre les liens entre mécanique cellulaire et fonctions immunes.

Dans l'ensemble, nous pouvons en retenir que trois cas de figure différents s'illustrent : un cocktail de cytokines, TNF α +PGE $_2$, qui induit une baisse de rigidité cellulaire, une cytokine, IFN γ , qui au contraire augmente la rigidité cellulaire (mais dont nous avons extrait, pour les cellules dendritiques, une sous-population sur laquelle l'effet était nul), et un facteur inflammatoire exogène dont l'effet est plus mitigé. Dans tous les cas de figure, les cellules dont l'expression des marqueurs de surface est la plus fortement augmentée sont également celles dont la rigidité est la plus affectée par les différents traitements inflammatoires. Là où il y a modification des molécules membranaires, l'impact sur la rigidité est plus grand, comme par exemple pour le LPS, pour lequel le seul effet significatif est observé sur les cellules dendritiques, pour lesquelles l'expression des marqueurs de surface est très fortement augmentée, contrairement aux macrophages. Mais ce qui est intéressant, c'est que le sens dans lequel ces modifications de rigidité opèrent est variable, alors que l'expression des molécules de surface est quasiment toujours dans le sens de l'augmentation. Si TNF α +PGE $_2$, IFN γ et LPS induisent tous trois une augmentation des molécules à la surface des cellules dendritiques, l'un la rend plus molle, l'autre plus rigide, et la dernière n'a qu'un effet mineur.

Ceci est un phénomène très intéressant : une exposition à des facteurs inflammatoires est susceptible d'avoir un effet sur les propriétés mécaniques des cellules, qui, s'il s'accompagne systématiquement d'une hausse de la concentration en molécules activatrices du lymphocyte T, peut soit augmenter, soit baisser la rigidité des cellules. Le fait que le sens des modulations de la rigidité (augmentation ou baisse) semble indépendant des modifications des molécules de surface est une information très importante pour l'immunologie. En effet, cela ajoute un élément dans le paysage fonctionnel que ces facteurs inflammatoires permettent d'explorer. Non seulement les marqueurs de surface, l'activité sécrétoire et le métabolisme cellulaire sont susceptibles d'être modifiés, mais nous savons désormais que les propriétés mécaniques peuvent aussi évoluer en fonction de l'environnement inflammatoire. Ces modifications de la mécanique cellulaire ne sont pas sans conséquence sur le devenir individuel des cellules, et peuvent avoir un impact fonctionnel considérable, sur la propension migratoire, par exemple. Nous voyons ici

que les propriétés mécaniques des cellules présentatrices sont susceptibles de constituer, à elles seules, un signal supplémentaire dans la réponse à l'inflammation.

Pour avoir une compréhension plus profonde des modifications engendrées par les facteurs inflammatoires étudiés sur la mécanique cellulaire, nous avons entrepris d'évaluer leur effet sur les composants du cytosquelette. Ce sont ces résultats que nous vous proposons d'explorer au chapitre à venir.

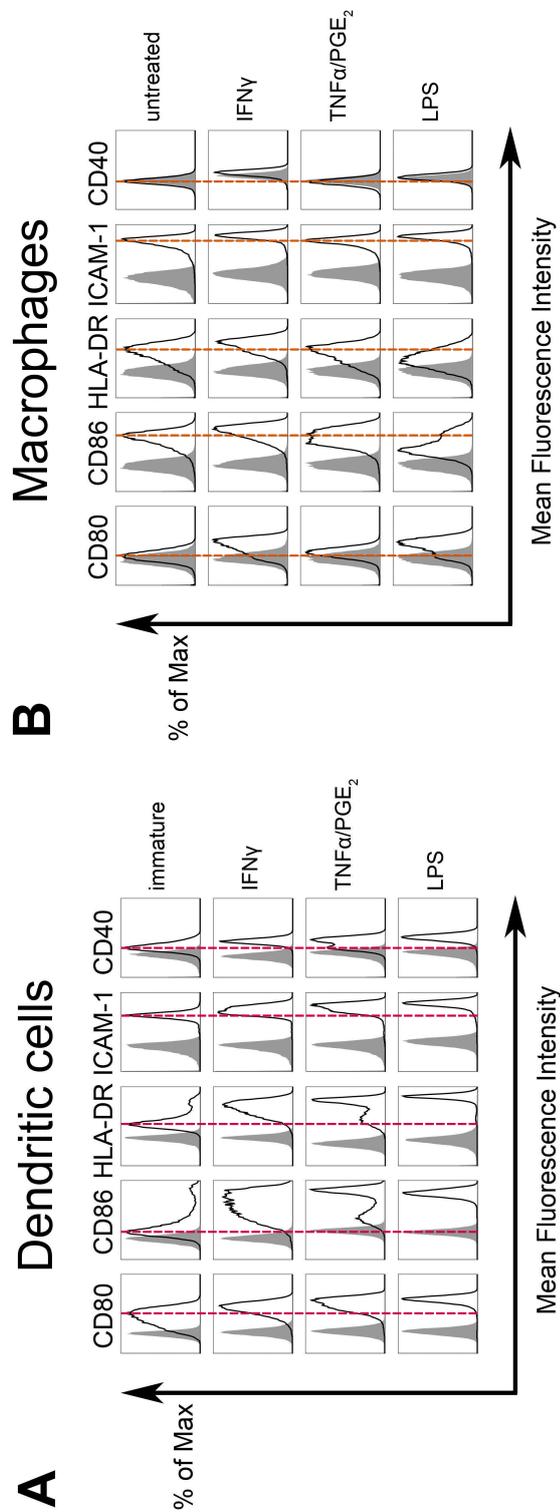


FIGURE 3.22 – Cytométrie de flux sur cellules dendritiques (A) et macrophages (B) pour l'expression de CD86, CD80, HLA-DR, ICAM1 et CD40, molécules nécessaires pour la présentation antigénique et l'activation du lymphocyte T, après incubation avec les différents facteurs inflammatoires étudiés ici. Données obtenues par M. Saitakis, Institut Curie.

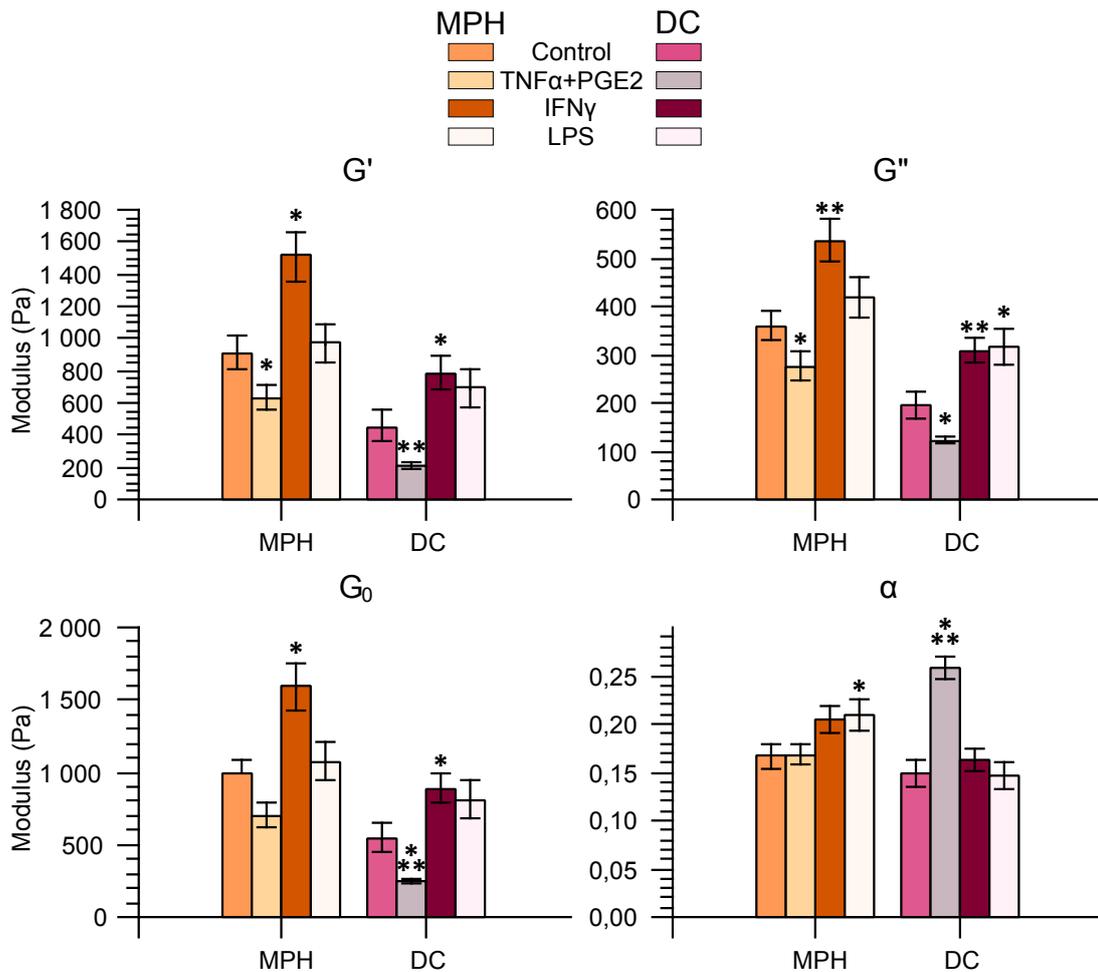


FIGURE 3.23 – Comparaison de l'effet des différents facteurs inflammatoires étudiés : TNF α +PGE₂ a tendance à diminuer la rigidité cellulaire, IFN γ à l'augmenter tandis que l'effet de LPS est plutôt neutre, bien que probablement plus prononcé sur les cellules dendritiques.

Tableau récapitulatif des données obtenues par analyse mécanique dynamique sur les cellules dendritiques et macrophages soumis aux facteurs inflammatoires TNF α +PGE $_2$, IFN γ et LPS.

Type cellulaire	N	\bar{G}' (Pa)	\bar{G}'' (Pa)	\bar{G}_0 (Pa)	α
DC Contrôle	22	440 +110/-90	190 \pm 30	530 +110/-90	0.15 \pm 0.01
DC TNF α +PGE $_2$	22	190 \pm 20	120 \pm 10	230 \pm 20	0.26 \pm 0.01
DC IFN γ	55	770 +110/-100	300 \pm 30	840 +110/-100	0.16 \pm 0.01
DC LPS	32	690 +130/-110	310 \pm 40	790 +140/-120	0.14 \pm 0.01
MPH Contrôle	20	900 +110/-100	350 \pm 30	970 +110/-100	0.16 \pm 0.04
MPH TNF α +PGE $_2$	33	620 +90/-80	270 \pm 30	680 +90/-80	0.17 \pm 0.01
MPH IFN γ	18	1450 +160/-150	530 \pm 40	1540 +170/-150	0.19 \pm 0.01
MPH LPS	15	960 +130/-110	410 \pm 40	1060 +140/-120	0.21 \pm 0.02

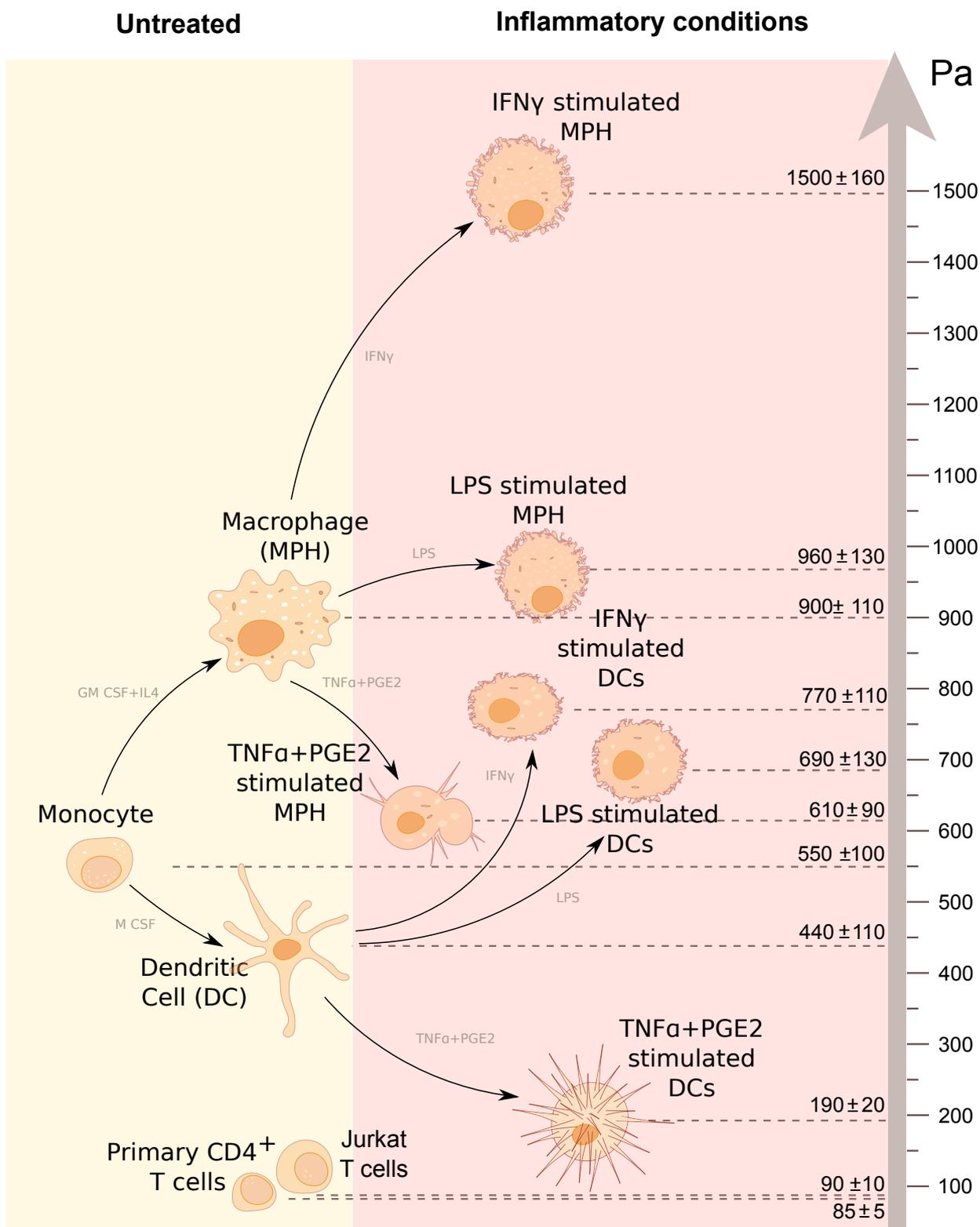


FIGURE 3.24 – Récapitulatif des rigidités mesurées (\bar{G}') par le dispositif à microplaques.

CHAPITRE 4

Tentatives d'interprétation

Sommaire

4.1	Rôle de la myosine II dans les propriétés mécaniques des cellules dendritiques et macrophages	151
4.1.1	L'inhibition de la myosine II diminue la rigidité cellulaire . . .	151
4.1.2	Quantification de l'expression de la myosine et de son activité dans les cellules présentatrices d'antigène	157
4.2	Rôle de l'actine dans les propriétés mécaniques des cellules présentatrices d'antigène	162
4.2.1	Densité d'actine corticale	162
4.2.2	Densité d'actine corticale et rigidité cellulaire	164
4.2.3	Densité d'actine corticale et volume cellulaire	168
4.3	Conclusions du chapitre et perspectives	171

Ce chapitre est dédié à l'exploration des modifications de la composition du cytosquelette qui pourraient expliquer les différences de rigidité mesurées aux chapitres 2 et 3. De manière générale, si on imagine que la rigidité cellulaire est essentiellement supportée par les propriétés mécaniques du cytosquelette, celle-ci peut avoir deux origines. La première est la nature du polymère : plus le gel d'actine est dense, plus la longueur des chaînes entre noeuds du réseau est courte et plus sa résistance à la déformation, donc sa raideur, sont grandes. La seconde possibilité est un état de contrainte modulé par une activité de la myosine : sur un gel donné, si des moteurs moléculaires sont actifs, ils peuvent soit permettre de mettre le gel sous tension et de lui conférer une raideur apparente plus élevée, soit permettre un remodelage et une plasticité accrues, ce qui aurait pour effet de baisser la rigidité cellulaire apparente.

Nous avons dans un premier temps interrogé le rôle de la myosine dans la rigidité des cellules myéloïdes, en mesurant l'effet de son inhibition sur la rigidité des cellules dendritiques et macrophages (partie 4.1.1), puis en quantifiant la totalité des myosines et celles phosphorylées dans les cellules (partie 4.1.2). Ensuite, nous avons mesuré la densité d'actine dans le cortex de ces cellules, ce qui nous a permis de mettre en évidence des corrélations entre densité d'actine corticale et rigidité, ainsi qu'entre densité d'actine corticale et volume cellulaire.

Ici, on ne peut aborder ce chapitre sans préciser que les résultats des parties 4.1.2 (*Western blots* sur la myosine), 4.2 (densité d'actine corticale), et 4.2.2 (volume cellulaire), s'ils ont été motivés par les résultats obtenus dans les chapitres précédents et leur analyse, ont concrètement été effectués par Michael Saïtakis, chercheur post-doctorant dans le groupe de Claire Hivroz à l'Institut Curie. Il s'agit donc du fruit d'une réflexion et d'une collaboration étroite, à laquelle j'ai participé activement et très régulièrement, mais ce n'est pas, à strictement parler, mon travail expérimental.

4.1 Rôle de la myosine II dans les propriétés mécaniques des cellules dendritiques et macrophages

4.1.1 L'inhibition de la myosine II diminue la rigidité cellulaire

La blebbistatine, un inhibiteur de la MIIA

Nous avons voulu, dans un premier temps, quantifier la contribution de la myosine dans la rigidité des cellules myéloïdes. Pour cela, nous avons utilisé la blebbistatine, un inhibiteur de la myosine IIA.

Rappelons-nous du mécanisme d'action de la myosine, explicité en figure 1.20 en page 39 de ce manuscrit. La blebbistatine stabilise l'attache de l'ATP à la tête de myosine et ralentit l'hydrolyse de l'ATP en ADP, bloquant la myosine dans la deuxième étape du cycle du "power stroke" [Kovács *et al.*, 2004]. Par conséquent, les têtes de myosine restent détachées des filaments d'actine plus longtemps, et la probabilité de liaison diminue. Les liens sont donc moins nombreux, et le taux de "power stroke" diminue. L'inhibition de la myosine par la blebbistatine dépend de la dose administrée : la figure 4.1 montre l'activité ATPasique de la myosine en fonction de la concentration en blebbistatine.

Comme toute drogue, la blebbistatine est susceptible de perturber très profondément le fonctionnement cellulaire, aussi avons-nous voulu utiliser une dose relativement faible. Nous avons choisi de traiter les cellules avec $5\mu\text{M}$ de blebbistatine, ce qui correspond à une chute d'environ 80% de l'activité de la myosine IIA (figure 4.1). Cette concentration devrait permettre de voir une baisse de rigidité significative si celle-ci est entièrement ou partiellement supportée par la contractilité de la myosine, tout en restant suffisamment faible pour éviter des effets secondaires trop délétères.

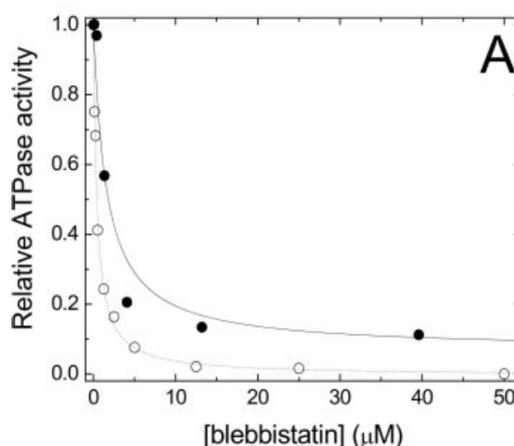


FIGURE 4.1 – Activité ATPasique des têtes de myosine en absence (cercles pleins) ou présence (cercles vides) d'actine, en fonction de la concentration en blebbistatine [Kovács *et al.*, 2004], mesurée *in vitro* sur des protéines purifiées. Nous avons choisi de nous placer à $5\mu\text{M}$, permettant de diminuer environ 80% de l'activité de la myosine IIA.

La préparation des cellules est ici en tout point semblable aux expériences décrites précédemment : dilution simple pour les cellules dendritiques, décolllement à la trypsine puis agitation pendant 2h pour les macrophages. 15mn avant l'expérience, la blebbistatine était ajoutée dans la cuve expérimentale de manière à atteindre une concentration finale de $5\mu\text{M}$.

Résultats expérimentaux

Macrophages Les résultats des expériences réalisées sur les macrophages sont présentés sur le panneau de la figure 4.2. On y observe une baisse globale de la rigidité, comme attendu, avec une chute de $\overline{G'}$ de 900 (+110/-100) Pa à 580 (+140/-110) Pa (-35%) $\overline{G''}$ de 350 (± 30) Pa à 300 (+60/-50) Pa (-14%) ce qui se traduit par une variation de $\overline{G_0}$ de 970 (+110/-100) Pa à 670 (+130/-110) Pa (-32%) et α de 0.16 (± 0.04) à 0.21 (± 0.02) (+31%).

On remarque immédiatement qu'ici, l'effet est environ deux fois plus fort sur le module de reprise élastique $\overline{G'}$ que sur le module de perte $\overline{G''}$; indiquant que la myosine IIA serait plutôt responsable de la partie élastique des propriétés visco-élastiques du matériau qui constitue la cellule. Nous observons cependant une baisse, bien qu'elle soit moindre, de dissipation, conformément aux observations et analyses de Balland *et al.* [2005]. L'interprétation qui avait alors été faite était que, si l'activité de la myosine diminue, alors d'une part le nombre de liens entre les filaments d'actine est réduit, ce qui explique la baisse du module de reprise élastique, mais parallèlement, comme le cycle est ralenti, la dynamique d'attachement/détachement est ralentie, ce qui fige en quelque sorte le réseau, et induit une baisse de viscosité. Nous reviendrons sur ces nuances un peu plus bas. Ici, nous observons que l'inhibition des myosines par la blebbistatine a pour conséquence une baisse importante du module de reprise élastique, ainsi qu'une baisse du module de perte. En tout état de cause, il est important de noter que l'ordre de grandeur des diminutions de raideur observées sont inférieures au taux de diminution de l'activité ATPasique de la myosine (35% de baisse de $\overline{G'}$ contre 70 à 80% de baisse de l'activité ATPasique de la myosine). Ceci indique que pour les macrophages, la rigidité apparente n'est pas entièrement supportée par l'activité contractile de la myosine.

Cellules Dendritiques Les résultats des mesures de visco-élasticité des cellules dendritiques après traitement à la blebbistatine sont présentés au panneau de la figure 4.3. On y note une baisse de raideur, plus importante que chez les macrophages avec une chute de $\overline{G'}$ de 440 (+110/-90) Pa à 190 (+30/-20) Pa (-58%); de $\overline{G''}$ de 190 (± 30) à 130 (± 10) Pa (-32%) et par conséquent le module $\overline{G_0}$ est affecté et passe de 530 (+110/-90) Pa à 240 (± 10) Pa (-54%) et α de 0.15 (± 0.01) à 0.25 (± 0.01) (+58%).

Ici encore, $\overline{G'}$ est environ deux fois plus affecté que $\overline{G''}$, ce qui suggère que le mode d'action de la blebbistatine ne diffère pas entre cellule dendritique et macrophage, avec un effet plus important de la réponse dans la partie élastique que sur la partie visqueuse du comportement mécanique des cellules myéloïdes humaines. Cette fois par contre, l'ordre de grandeur de la diminution de la rigidité observé est plus proche

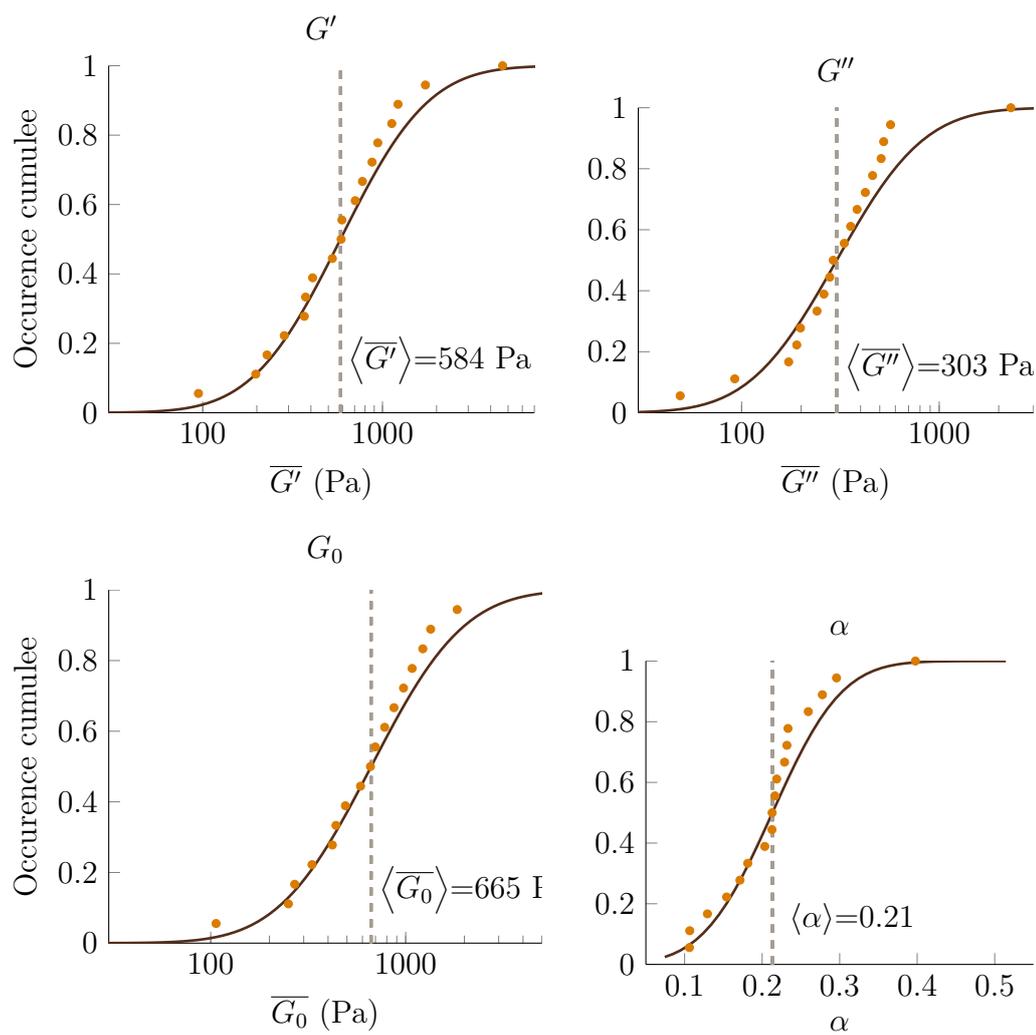


FIGURE 4.2 – Macrophages traités à la blebbistatine

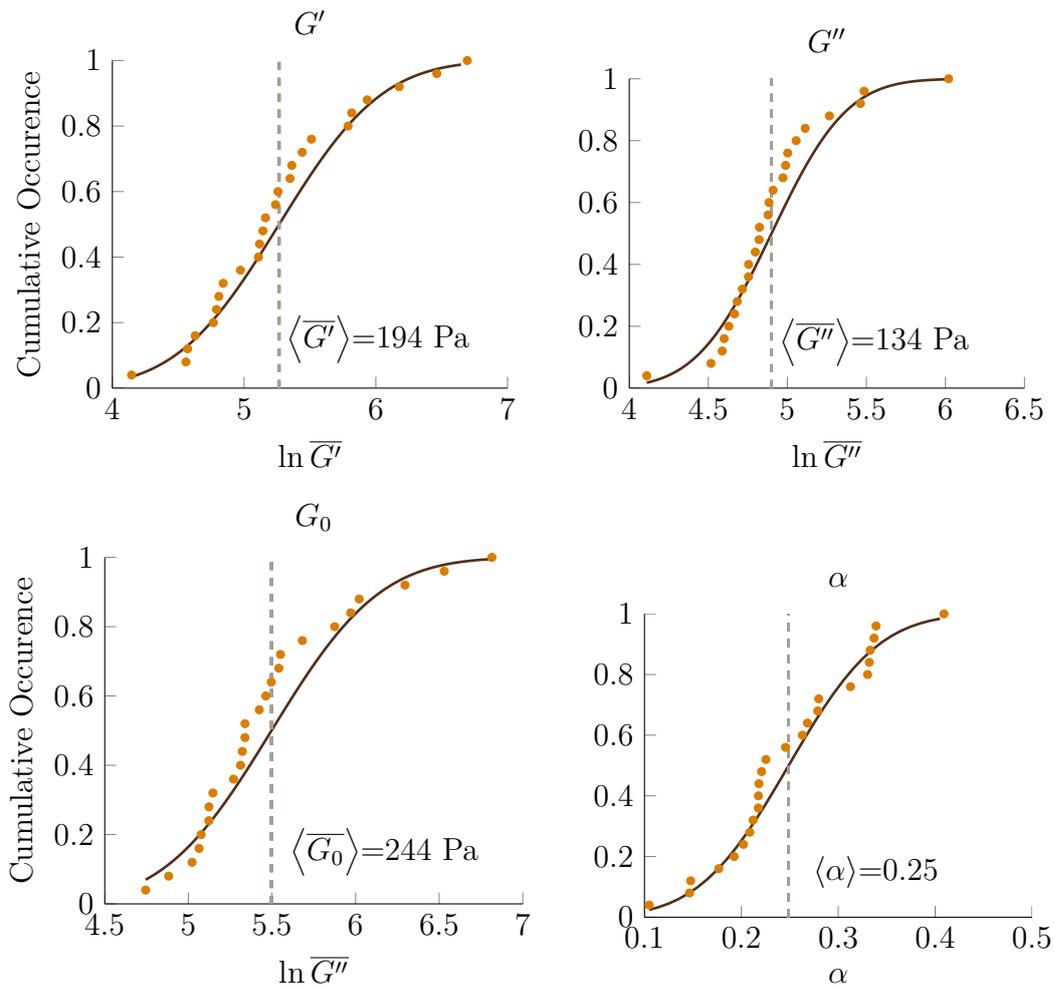


FIGURE 4.3 – Cellules Dendritiques traitées à la blebbistatine

du taux d'inhibition de l'activité ATPasique de la myosine IIA à cette concentration de blebbistatine (environ 60% de diminution de rigidité, contre 80% de diminution d'activité ATPasique). Ceci indique que pour les cellules dendritiques, la part de la contractilité de la myosine dans le module global est plus importante que pour les macrophages.

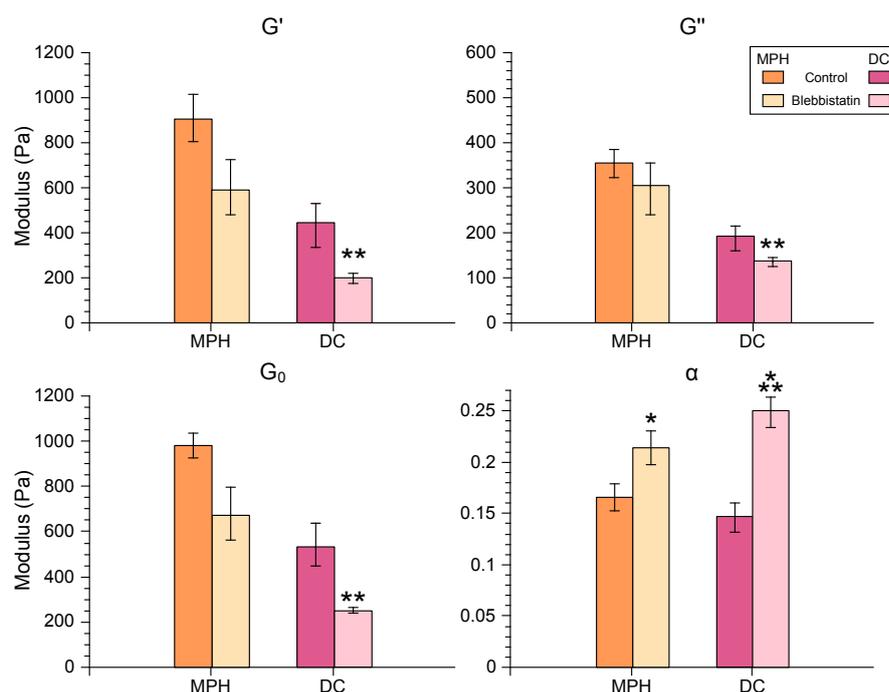


FIGURE 4.4 – Effet de la blebbistatine sur cellules dendritiques (DC) et macrophages (MPH). Les symboles * représentent la valeur des p-valeurs obtenues par le test statistique de Mann-Whitney-U (* pour $p < 0.05$, ** pour $p < 0.01$, *** pour $p < 0.001$).

	Macrophages				Cellules Dendritiques			
	Control		Blebb		Control		Blebb	
$\overline{G'}$	900	+110/-100	580	+140/-110	440	+110/-90	190	+30/-20
$\overline{G''}$	350	± 30	300	+60/-50	190	± 30	130	± 10
$\overline{G_0}$	970	+110/-100	670	+130/-110	530	+110/-90	240	± 10
α	0.16	± 0.04	0.21	± 0.02	0.15	± 0.00	0.25	± 0.01

TABLE 4.1 – Tableau récapitulatif des données obtenues par analyse mécanique dynamique sur les cellules dendritiques et macrophages après traitement à la blebbistatine.

Discussion

En effectuant les tests statistiques pour évaluer le caractère significatif ou non de ces différences, on s'aperçoit que la baisse de raideur engendrée par la blebbistatine sur les macrophages ne s'avère pas significative strictement parlant (figure 4.4). La seule grandeur qui apparaît comme statistiquement différente est l'exposant α . La pertinence de la différence observée sur α est toute relative, puisqu'elle est la synthèse des effets sur $\overline{G'}$ et $\overline{G''}$ (voir équations 2.8 et 2.9 p.89). Toutefois, le non-chevauchement des barres d'erreur de $\overline{G'}$ nous incite à conclure que la tendance à la baisse n'est pas artéfactuelle :

quelques points de mesures supplémentaires permettraient probablement de réduire les barres d'erreur suffisamment pour passer le seuil du test statistique choisi (la p-valeur associée au test statistique est de $p=0.052$, indiquant que l'hypothèse d'une différence des données est vraie à 94.8%, le seuil au delà duquel les données sont données comme statistiquement différentes étant placé, arbitrairement, à 95%).

En comparaison, les différences observées sur les cellules dendritiques sont elles tout à fait significatives, sur les quatre grandeurs quantifiées. De plus, elles se rapprochent, pour $\overline{G'}$, des valeurs attendues sous l'hypothèse d'une rigidité cellulaire due à une mise sous tension du cytosquelette par activité contractile de la myosine.

Le point important à soulever ici, est que la rigidité plus importante des macrophages par rapport aux cellules dendritiques ne peut pas s'expliquer par une mise sous contrainte du cortex d'acto-myosine par activité accrue de la contractilité de la myosine. Si les macrophages avaient une composition du gel en actine semblable à celui des cellules dendritiques, mais simplement une activité contractile de la myosine plus importante, alors l'inhibition de la myosine diminuerait d'autant la rigidité cellulaire, tout comme les forces de tractions cellulaires suivent à la trace la baisse de l'activité ATPasique de la myosine [Mitrossilis *et al.*, 2009]. Mais les observations que nous venons de faire nous indiquent le contraire : non seulement la rigidité accrue des macrophages ne peut pas être expliquée par une sur-activité contractile de la myosine IIA ; mais en plus, il semble qu'à l'inverse la rigidité des cellules dendritiques, pourtant moins élevée, est majoritairement dûe à la myosine IIA, puisqu'elle chute en proportion bien plus que celle des macrophages.

Reste cependant un phénomène intéressant à commenter. En regardant les chiffres de plus près, on observe que les résultats pour les cellules dendritiques traitées avec $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$ et à la blebbistatine sont tout à fait similaires, et ce à la fois sur $\overline{G'}$, $\overline{G''}$, $\overline{G_0}$ et α (voir tableau ci-dessous). Il y a bien entendu une part de hasard dans ces résultats : si nous avions choisi une autre concentration de blebbistatine, nous n'aurions certainement pas rencontré cette coïncidence. Cependant, nous pouvons supposer ici que le mode d'action des cytokines $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$ sur les cellules dendritiques pourrait être du à une inhibition de l'activité de la myosine. Pour arriver à ce résultat, on peut imaginer des mécanismes faisant intervenir des voies de régulations moléculaires, comme celles des protéines kinases responsables de la phosphorylation de la chaîne légère de la Myosine, favorisant ensuite son attachement à un filament d'actine (MLCK, MRCK, Rock). Mais ce que nous enseigne la littérature nous laisse perplexes. Il a été observé que $\text{TNF}\alpha$ pouvait engendrer une modification de l'activité de MLCK, mais dans le sens d'une augmentation de l'activité contractile, et non de sa diminution [Ma *et al.*, 2005] ; et il a été montré que PGE_2 induisait la perte de podosome chez des cellules dendritiques identiques aux nôtres et une transition vers des complexes d'adhésion. Cette transition dépend de la myosine et met en jeu RhoA, Rac1 et Cdc42 [van Helden *et al.*, 2008], RhoA intervenant en amont de Rock pour induire la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine. Nos observations, suggérant au contraire que $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$ induit plutôt une baisse d'activité de la myosine de nature comparable à l'effet $5\mu\text{M}$ de blebbistatine, indiquent une fois de plus que les origines de la visco-élasticité cellulaire sont multi-factorielles et fortement dépendantes du contexte. Une étude de type transcriptomique ou de quantification de concentrations des pro-

téines mises en jeu dans les cascades de signalisation intervenant dans la régulation de l'activité de la myosine pourrait nous renseigner sur les modes d'action précis de $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$ sur la rigidité cellulaire, et nous indiquer s'ils reposent sur la régulation de la myosine.

Cellule Dendritique	$\overline{G'}$ (Pa)	$\overline{G''}$ (Pa)	$\overline{G_0}$ (Pa)	α
Contrôle	440 +110/-90	190 ±30	530 +110/-90	0.15 ±0.01
$\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$	190 ±20	120 ±10	230 ±20	0.26 ±0.01
Blebbistatine	190 +30/-20	130 ±10	240 ±10	0.25 ±0.01

TABLE 4.2 – $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$ et blebbistatine induisent des modifications mécaniques similaires sur les cellules dendritiques.

4.1.2 Quantification de l'expression de la myosine et de son activité dans les cellules présentatrices d'antigène

Méthode

Pour faire un pas dans ce sens, nous avons mesuré la quantité totale de myosine et la quantité de myosine phosphorylée dans les cellules sur lesquelles porte cette étude. Ces expériences ont été effectuées par M. Saïtakis, en employant la technique du *Western blot*, qui permet de quantifier de façon relative la présence de différentes protéines dans un échantillon. M. Saïtakis a mesuré dans un premier temps la quantité de myosine totale présente dans les cellules (anticorps de révélation dirigé contre la chaîne lourde de la myosine). Dans un second temps, il a révélé seulement les myosines phosphorylées sur leur chaîne légère (p-Myo-RLC), correspondant à un état favorable à l'activité ATP-asiqne des myosines.

Pour interpréter ces résultats, nous avons choisi de représenter la quantité totale de myosine ramenée au volume cellulaire, pour estimer une concentration volumique en myosine dans la cellule et s'affranchir des effets de taille. La quantité de myosine est mesurée en terme d'intensité relative des bandes de *Western blot*, moyennées sur plusieurs expériences (plusieurs donneurs, $N=4$ à 10), tandis que les volumes cellulaires sont calculés à partir d'images en microscopie, comme décrit en Annexe C. Par ailleurs, nous nous sommes ici limités à l'étude des cellules myéloïdes : monocytes, cellules dendritiques et macrophages, les deux dernières étant soumises ou non aux différents traitements inflammatoires (pas de mesures sur les lymphocytes T ou les cellules Jurkat).

Il faut enfin préciser qu'ici, nous divisons une intensité lumineuse relative par un volume cellulaire moyen, tous deux obtenus de façon très différente. L'intensité lumineuse relative a été obtenue en moyennant moins de dix expériences à chaque fois accomplies à partir de lysats de centaines de milliers de cellules, tandis que le volume cellulaire moyen a été extrait d'images de microscopie 3D réalisées sur 20 à 100 cellules. Les

barres d'erreurs ont quant à elles été obtenues par propagation d'erreur à partir des erreurs standards des distributions de quantité de myosine et de volume cellulaire. La grandeur obtenue nous donne une idée de la concentration relative de myosine totale par unité de volume dans les cellules, mais ne correspond pas à la moyenne issue d'une distribution où l'on aurait, pour chaque cellule, divisé la mesure d'un volume par celle d'une quantité de protéine mesurée sur la même cellule. Par nature, il est donc impossible d'effectuer un test statistique sur cette grandeur, pour vérifier une hypothèse selon laquelle les résultats sont significativement différents. Toutefois, l'espacement des barres d'erreur nous permet de déterminer les cas où les différences sont indéniables. Nous considérerons donc pour les résultats présentés dans cette section, qu'à partir du moment où les barres d'erreur (qui représentent l'erreur standard et donc l'intervalle de confiance à 68%) ne se chevauchent pas, il existe une différence non biaisée entre les concentrations de myosine observées.

Résultats expérimentaux

Les résultats des expériences de *Western blot* sont présentés en figure 4.5. Les panneaux A-B-C présentent les données obtenues pour la myosine totale (anticorps dirigé contre la chaîne lourde de la myosine) et les panneaux D-E-F montrent celles obtenues pour la phosphorylation de la chaîne légère.

En ce qui concerne la concentration en myosine totale dans les cellules (figure 4.5 A-B-C), nous observons que :

- Les monocytes ont une concentration en myosine presque trois fois plus élevée que les cellules dendritiques et deux fois plus élevée que les macrophages,
- Les macrophages traités à l'IFN γ ont une concentration en myosine moindre que les macrophages non traités et les autres traitements, dont la concentration en myosine est équivalente.
- Les cellules dendritiques traitées au TNF α +PGE $_2$ ont une concentration en myosine plus élevée que les cellules dendritiques non traitées et celles ayant subi les traitements à l'IFN γ et au LPS, ces dernières ayant toutefois une concentration plus élevée en myosine totale.

Toutefois, le nombre de myosines total ne nous renseigne pas vraiment sur l'état de pré-tension du cortex : les myosines peuvent très bien être très abondantes, mais dans des configurations repliées qui empêchent leur liaison avec l'actine. Pour mesurer la quantité de myosines actives, il faut plutôt regarder le nombre de myosines susceptibles d'être attachées à l'actine : celles dont la chaîne légère est phosphorylée.

En effet, l'activité de la myosine passe par la phosphorylation de la chaîne légère régulatrice [Clark *et al.* , 2007]. Celle-ci permet d'une part un changement de conformation vers une structure dépliée, nécessaire pour la liaison à l'actine, et d'autre part favorise l'activité ATP-asiq de la myosine [Tan *et al.* , 1992]. Nous retrouvons dans les quantités de chaînes légères phosphorylées par volume cellulaire les mêmes tendances que pour la quantité totale de myosine (figure 4.5-D-E-F), à savoir que :

- Les monocytes ont très clairement une concentration en myosine phosphorylée supérieure à celle des cellules dendritiques et macrophages

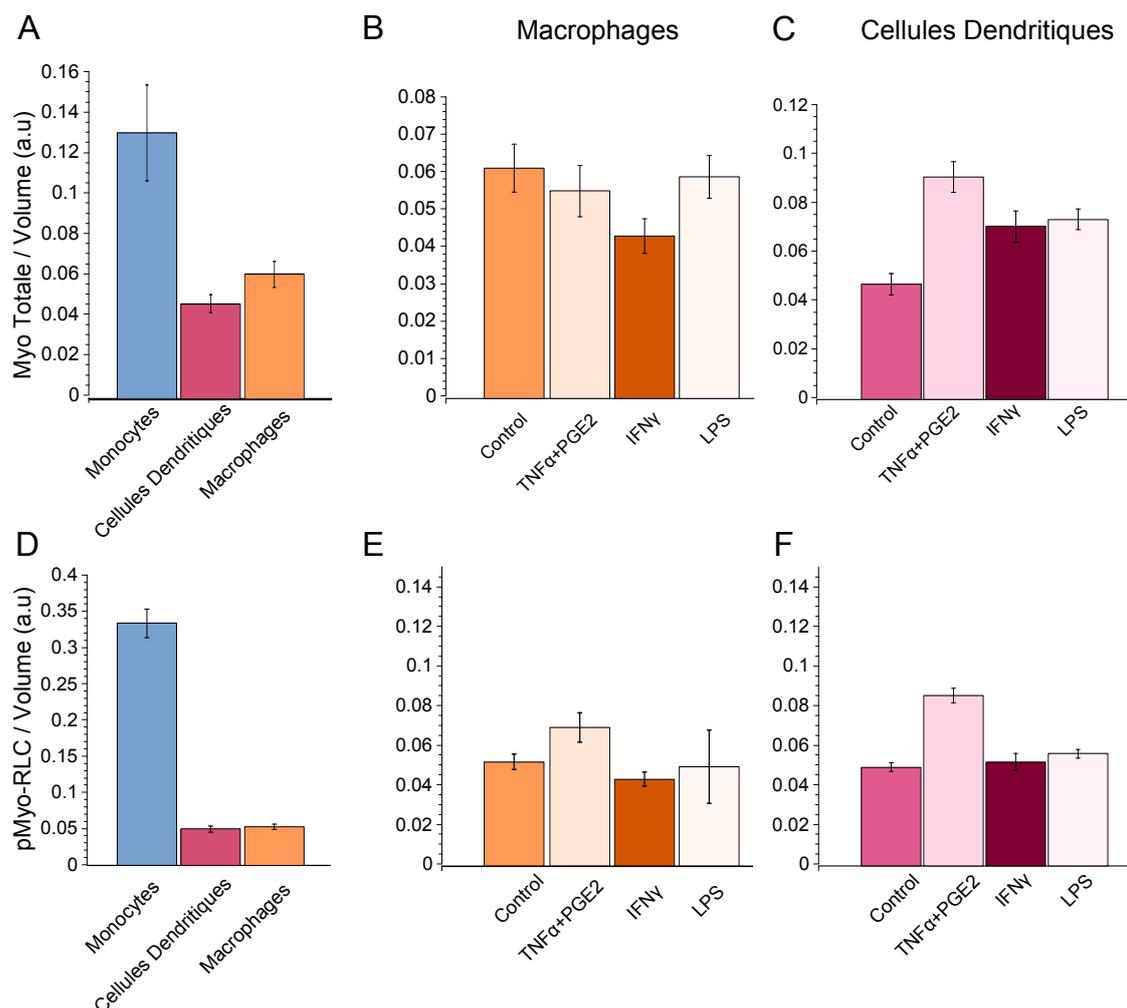


FIGURE 4.5 – Quantité de myosine totale (A-C) et des chaînes légères phosphorylées (D-F) ramenée au volume cellulaire pour différents types cellulaires (A,D), et après traitements sur les macrophages (B,E) et cellules dendritiques (C,F)

- Les macrophages traités à l'IFN γ semblent avoir une concentration en myosine phosphorylée un peu plus basse, ceux traités au TNF α +PGE $_2$ semblent avoir une concentration légèrement supérieure, tandis que le traitement au LPS n'a aucun effet, tout ceci par rapport aux macrophages non traités.
- Les cellules dendritiques traitées au TNF α +PGE $_2$ ont une concentration en myosine phosphorylée nettement supérieure au contrôle, tandis que les cellules traitées au LPS ont une concentration légèrement supérieure au cas contrôle, et que le traitement à l'IFN γ ne semble avoir aucun effet.

Ces résultats sont assez déconcertants et ne corrént pas avec les mesures de rigidité. Par exemple, le fait que les monocytes aient une concentration très importante en myosine totale ne corréle pas du tout avec leur rigidité, qui est comparable à celles des cellules dendritiques, et le fait que les macrophages aient une concentration en myosine totale légèrement supérieure et en myosine phosphorylée comparable aux cellules dendritiques est pour le moins contre-intuitif, étant donné que leur rigidité est bien supérieure, et que l'effet de la blebbistatine est moins important sur les macrophages

que sur les cellules dendritiques.

Discussion

Les résultats concernant les concentrations et le taux d'activité des myosines dans les cellules que nous observons ne nous permettent pas pour le moment de formuler de conclusion très claire. Surtout, il ne semble pas y avoir de corrélation entre rigidité cellulaire et concentration ou activité de la myosine : la figure 4.6 représente la concentration en myosine phosphorylée en fonction de la rigidité, et il n'y apparaît que des nuages de points sans tendance remarquable. Seul le traitement à $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$ semble faire simultanément augmenter l'activité des myosines et diminuer la rigidité, à la fois sur les macrophages et les cellules dendritiques.

Nous pouvons formuler l'hypothèse selon laquelle une augmentation de l'activité des myosines diminue la rigidité. Une façon de la comprendre est d'intégrer le caractère dynamique de l'activité des myosines. Avoir plus de myosines actives devrait augmenter le remodelage du cytosquelette, et résulter en une structure en constant réarrangement dynamique. On peut donc imaginer que cette structure, dont les réticulants sont en permanence en train de s'attacher et de se détacher, peut offrir une résistance plus faible à la déformation, et donc une rigidité apparente plus basse. Toutefois, dans ce raisonnement, la dissipation du gel devrait parallèlement augmenter, et nous observons au contraire une diminution. Si cette hypothèse est séduisante, elle ne permet pas d'expliquer tous les effets de $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$, et des expériences supplémentaires, en transcriptomique par exemple, permettraient de mettre à jour les supports moléculaires menant aux évolutions de rigidité observées.

Par ailleurs, une contradiction émerge de ces observations à travers les résultats sur la blebbistatine : si l'activité de la myosine corrèle avec diminution de la rigidité, alors pourquoi son inhibition engendrerait-elle aussi une baisse de rigidité (figure 4.4 p.155) ?! Cette contradiction est en fait apparente, et peut être expliquée par le mode d'action de la blebbistatine. Nous avons décrit un peu plus haut que cette drogue permet de stabiliser les myosines dans une configuration de faible affinité pour les filaments d'actine [Kovács *et al.*, 2004]. La blebbistatine a donc pour effet non seulement de ralentir l'activité des myosines, mais surtout de les maintenir en configuration détachée. En d'autres termes, le gel cortical a donc maintenant des réticulants figés, et pour la plupart en position détachée. Comme le nombre de liens a diminué, la rigidité baisse. Mais comme ceux-ci sont également figés (l'activité est ralentie), les cellules sont moins dissipatives, car le peu d'entre eux qui restent en configuration attachée y sont bloqués, et le gel s'apparente plus à un gel élastique (G'' diminue, figure 4.4). Ce phénomène et ces explications avaient déjà été avancés par [Balland *et al.*, 2005] lors de leur étude de l'influence de la blebbistatine sur la visco-élasticité corticale mesurée par pinces magnétiques, où ils avaient observé une baisse significative de l'exposant α . On pourrait imaginer qu'alors, si une autre drogue inhibitrice des myosines permettait de les figer en position attachée, son effet serait d'augmenter la rigidité cellulaire apparente (le nombre de liens resterait constant, ou augmenterait) tout en diminuant la dissipation (les liens figés conférant un caractère élastique au gel).

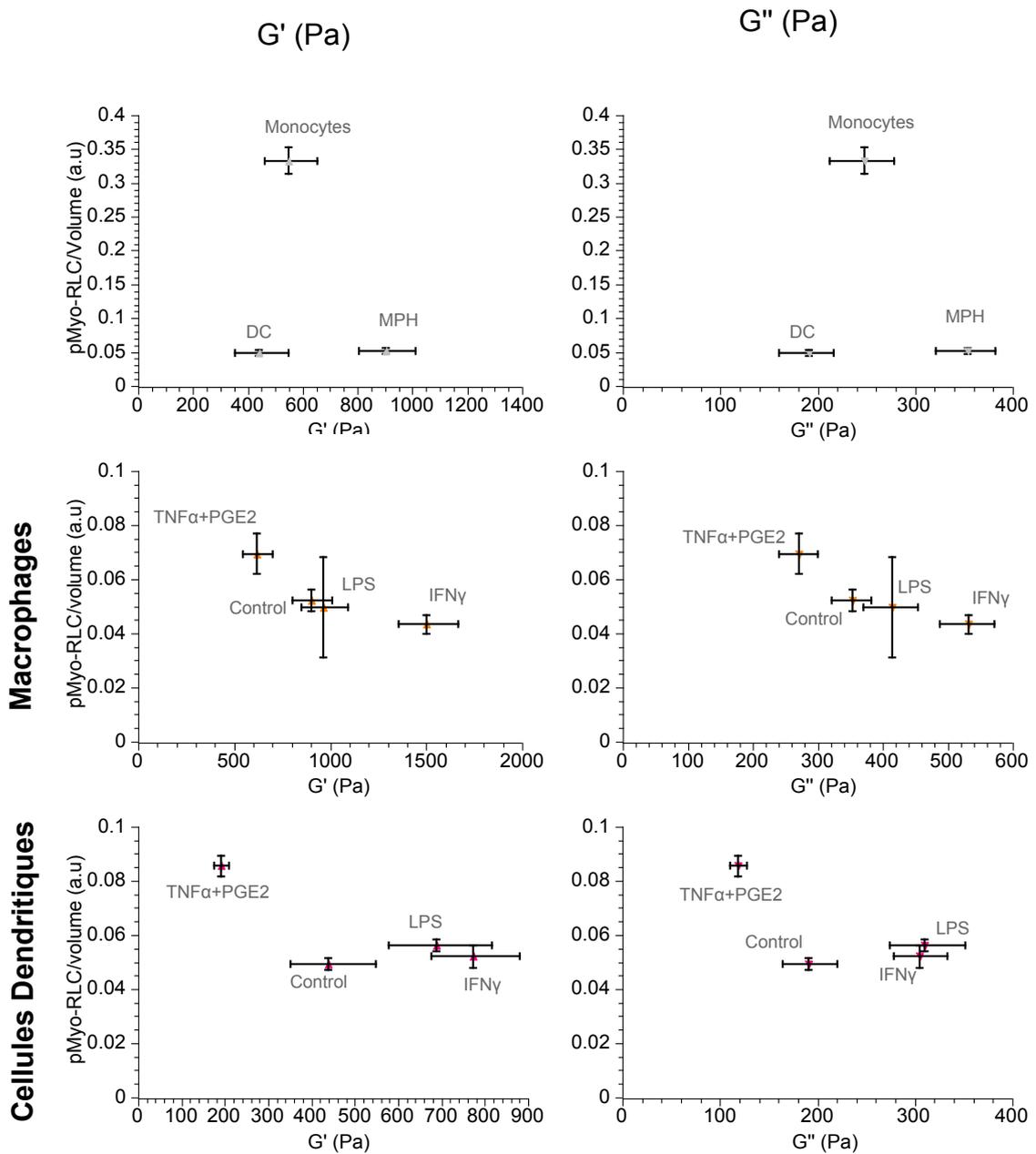


FIGURE 4.6 – Evolution de la concentration de myosine phosphorylée avec les modules de reprise élastique ($\overline{G'}$, colonne de gauche) et de perte ($\overline{G''}$, colonne de droite). La première ligne permet de comparer les cellules myéloïdes non traitées (monocytes, cellules dendritiques, macrophages), tandis que la seconde et la troisième représentent les données pour les traitements inflammatoires effectués sur les macrophages et cellules dendritiques, respectivement.

Toutefois, les résultats obtenus sur les monocytes s'opposent à l'hypothèse formulée plus haut, selon laquelle une augmentation de l'activité des myosines aurait pour conséquence une diminution de la rigidité cellulaire. Alors que la rigidité des monocytes est d'ordre de grandeur comparable à celle des cellules dendritiques, et inférieure

à celle des macrophages, leur concentration en myosine totale et en myosines dont la chaîne légère est phosphorylée est très largement supérieure à celles des cellules dendritiques et des macrophages (figure 4.6). Peut-être alors que la modulation de la rigidité par l'activité des myosines que l'on observe lors du traitement par $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$ n'est vraiment valable qu'au sein d'un type cellulaire, et que les différences de composition structurales d'un type cellulaire à l'autre sont bien plus complexes et profondes. Dans le cas des monocytes, on s'attendrait alors à ce que, pour compenser et atteindre une raideur comparable aux cellules dendritiques, d'autres éléments de leur cytosquelette y soient dans des proportions contraires, comme la concentration en réticulants (fascine, cofiline, etc) ou la densité en actine filamenteuse corticale, par exemple. Par ailleurs, si l'on traite ces cellules à la blebbistatine, leur module devrait chuter dans une plus grande proportion que les macrophages et les cellules dendritiques, vers une valeur plus proche des 70 à 80% attendus si l'on suppose que la raideur de ces cellules est principalement due à leur très nombreuses myosines et une concentration moindre en actine et protéines organisatrices de l'actine.

Par ailleurs, les effets différentiels de la blebbistatine sur les macrophages (baisse de $\sim 35\%$ de $\overline{G'}$ et $\sim 15\%$ de $\overline{G''}$) et sur les cellules dendritiques (baisse de $\sim 60\%$ de $\overline{G'}$ et $\sim 25\%$ de $\overline{G''}$) indiquent que leur composition corticale est forcément différente d'un type cellulaire à l'autre. Bien que les cellules dendritiques enregistrent des baisses en module élastique de l'ordre de 60%, cela n'égale pas les 70 à 80% attendus dans le cas d'une rigidité entièrement supportée par une mise sous tension du cortex. Les 10 à 20% restants pour les cellules dendritiques et les 35 à 45% restants pour les macrophages sont donc dûs à un autre facteur, comme la concentration en actine corticale par exemple, ou plus probablement à une combinaison d'effets conférant au cortex sa structure.

Ainsi, alors que cellules dendritiques, monocytes et macrophages sont si proches dans la lignée monocytaire, ces observations suggèrent des différences très profondes dans la constitution même de la matière qui les compose. Ceci est un indice important qui nous permet de supposer que les programmes transcriptionnels déclenchés lors de la différenciation myéloïde impliquent des changements structurels profonds, qui ont très probablement un impact sur les fonctions respectives de ces cellules. Pour compléter ces observations, nous avons cherché à quantifier la concentration d'actine au niveau du cortex.

4.2 Rôle de l'actine dans les propriétés mécaniques des cellules présentatrices d'antigène

4.2.1 Densité d'actine corticale

Nous avons donc tenté de donner un estimateur de la concentration en actine corticale par analyse de clichés de microscopie de fluorescence. Ici encore, les mesures ont été effectuées par M. Saitakis.

Les cellules ont été déposées sur des lames de verre recouvertes de fibronectine à

5 μ g/mL (même traitement que celui effectué sur les micro-plaques lors des mesures de rigidité), puis fixées et marquées grâce à la phalloïdine couplée à un fluorophore. Des images 3D de ces cellules ont été faites avec un microscope confocal, et la densité d'actine au cortex a été évaluée en suivant une méthode détaillée en Annexe C.

Commençons par comparer les types cellulaires les uns par rapport aux autres. Un graphe comparatif est donné en figure 4.7. Nous y voyons que monocytes et Jurkat d'un côté, et macrophages et cellules dendritiques de l'autre, sont les seules cellules ayant des densités d'actine corticale comparables. Les tests statistiques effectués nous indiquent que la densité d'actine corticale ainsi comparée est significativement différente entre les cellules dendritiques et les monocytes, les cellules dendritiques et les lymphocytes T, les cellules dendritiques et les Jurkat, les macrophages et les monocytes, les macrophages et les lymphocytes T, les macrophages et les Jurkat, les monocytes et les lymphocytes T, les Jurkat et les lymphocytes T. Cela fait beaucoup de différences. Essayons-donc d'y voir plus clair.

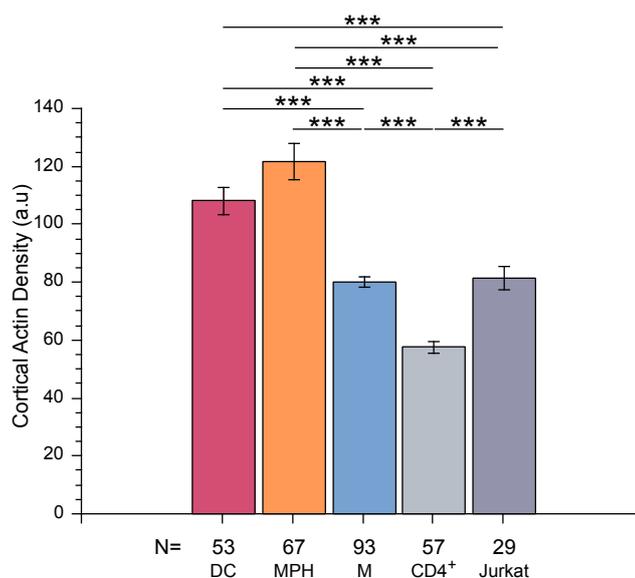


FIGURE 4.7 – **Densité d'actine corticale selon le type cellulaire observé.** M = monocytes, MPH = Macrophages, DC = Cellules Dendritiques, CD4⁺ = lymphocytes T primaires. Les symboles * représentent la valeur des p-valeurs obtenues par le test statistique de Mann-Whitney-U (* pour $p < 0.05$, ** pour $p < 0.01$, *** pour $p < 0.001$); N représente le nombre de points de mesure pour chaque expérience. Données obtenues par Michael Saitakis.

La première remarque que nous pouvons formuler est que la densité d'actine corticale est inférieure pour les monocytes par rapport aux cellules dendritiques (figure 4.7). Cela va dans le sens de l'hypothèse que nous avons émise au paragraphe 4.1.2 : pour une rigidité finale comparable, les monocytes ont une concentration en myosine beaucoup plus élevée, mais une concentration en actine corticale moindre par rapport aux cellules dendritiques. Ceci pourrait permettre le ré-équilibrage vers des modules équivalents (figure 2.7 p.95), en donnant un gel moins dense mais plus réticulé, sans

compter les modulations que peuvent ajouter toutes les protéines organisatrices de l'actine susceptibles de venir se greffer au système pour lui conférer sa rigidité finale.

Cette même observation peut-être faite en comparant les lymphocytes T et les Jurkat (densité d'actine corticale plus élevée pour les Jurkat), qui à modules identiques observent une différence de concentration en actine corticale. Malheureusement nous ne disposons pas pour le moment des données de *Western blot* pour ces deux types cellulaires, mais nous nous attendrions à ce que les Jurkat aient moins de myosines phosphorylées (en concentration volumique) que les lymphocytes T.

Pourtant, un contre-exemple vient déstabiliser ces hypothèses. Les macrophages et les cellules dendritiques, de rigidité pourtant bien différente ($\overline{G'}$ = 900 et 440 Pa, respectivement), qui réagissent de manière différente au traitement à la blebbistatine (figure 4.4), semblent avoir une concentration en actine corticale et en myosine phosphorylée comparables (figure 4.5-D). C'est donc qu'au delà de la myosine, d'autres paramètres doivent intervenir pour leur conférer des rigidités si distinctes, que l'on pourrait tenter d'identifier, par exemple, par une analyse transcriptomique comparative de ces deux types cellulaires, sur toutes les protéines susceptibles d'être impliquées (lamine, Rho-GTPases, réticulants de l'actine, protéines régulatrices de l'actine). En tout état de cause, ces résultats nous montrent qu'entre types cellulaires, la rigidité est régulée indépendamment et au cas par cas, en faisant appel de façon différentielle aux différents constituants du cortex cellulaire.

4.2.2 Densité d'actine corticale et rigidité cellulaire

In vitro, plus un gel est dense en actine, plus il est rigide (le module de reprise élastique de gels d'actine purifiés augmente avec la concentration en actine, [Xu *et al.*, 1998]). La densité d'actine corticale devrait donc être directement liée à la partie élastique du module visco-élastique complexe des cellules : il s'agit d'augmenter la concentration en monomère d'un gel polymérisé. Si l'on trace la densité d'actine corticale en fonction de la rigidité cellulaire, on observe effectivement une tendance à la corrélation positive entre densité d'actine corticale et élasticité ($\overline{G'}$), qui est cependant très bruitée (figure 4.8). Les variations au cas par cas que nous y observons illustrent bien la complexité du système : au delà de la tendance globale attendue pour un gel inerte, des variations locales (et nombreuses) indiquent ici encore que d'autres éléments sont certainement impliqués dans la régulation de la rigidité cellulaire : densité et taux d'activation des myosines au cortex, présence de protéines réticulant ou organisant l'actine, et régulation de ces protéines-mêmes, et probablement tout un tas d'autres facteurs comme la pression osmotique, et certainement d'autres encore inconnus.

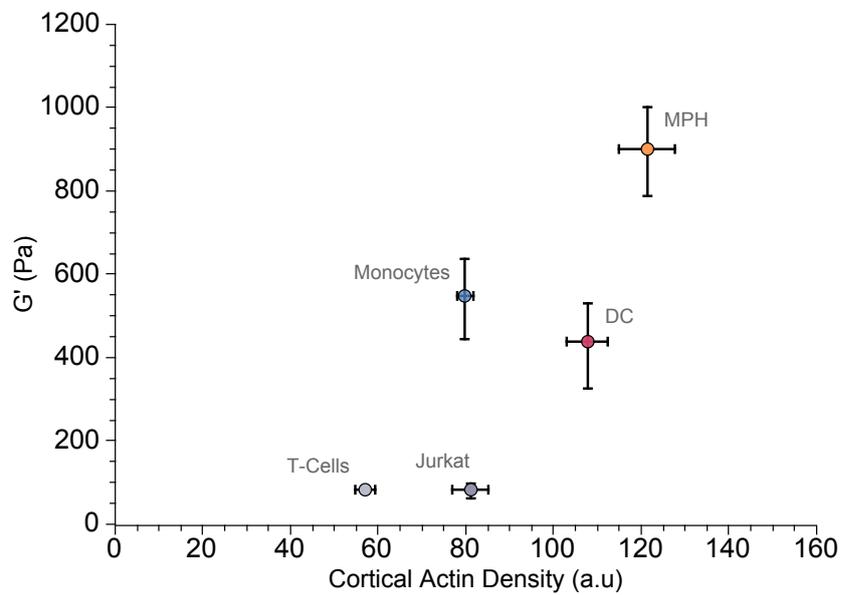


FIGURE 4.8 – Densité d'actine corticale en fonction de $\overline{G'}$ pour les différents types cellulaires.

Par ailleurs, la densité d'actine corticale n'est pas significativement affectée par les facteurs inflammatoires, comme le montrent les figures 4.9 et 4.10. Les modifications phénotypiques de la rigidité cellulaire induites par ces différents traitements ne sont donc pas liés à une modulation de la densité d'actine corticale. Autrement dit, au sein d'un type cellulaire, les différences en densité d'actine corticale ne sont pas significatives : la régulation de la rigidité au sein d'un même type cellulaire doit se faire à travers un autre facteur.

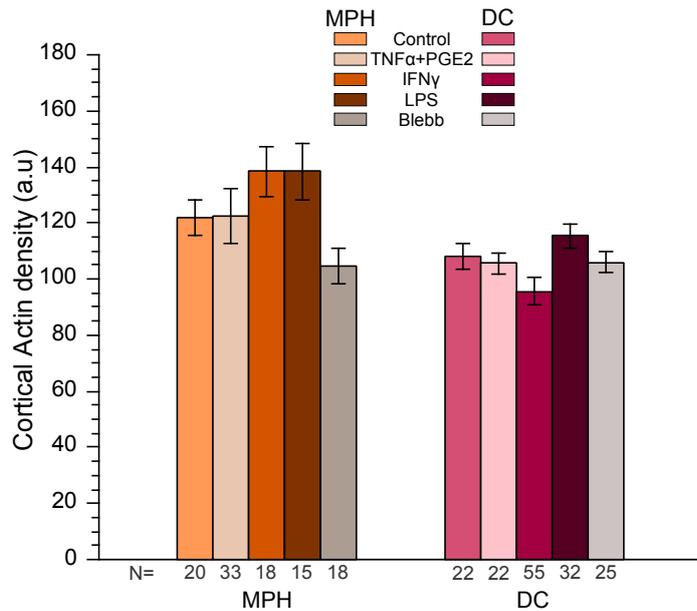


FIGURE 4.9 – La densité d'actine corticale n'est pas modifiée lors de traitements par des facteurs inflammatoires. Tous les tests statistiques rejettent l'hypothèse selon laquelle les distributions sont statistiquement différentes. Les variations de rigidité cellulaire induites par les traitements par facteurs inflammatoires ne corrént pas avec une modulation de la concentration en actine au cortex.

Enfin, nous avons mesuré l'effet de la blebbistatine sur la densité d'actine corticale. Pour les cellules dendritiques, cette influence est nulle (contrôle : 108 ± 5 ; blebbistatine : 105 ± 4); pour les macrophages celle-ci est mineure et non significative (contrôle : 121 ± 6 ; blebbistatine : 104 ± 6 ; p-valeur=0.17). Ceci indique que l'inactivation de la myosine n'a pas d'influence sur la concentration en actine corticale. C'est un résultat qui peut paraître naturel, mais nous aurions pu imaginer par exemple que l'inhibition des myosines puisse déstabiliser le gel d'actine et influencer sa composition en actine.

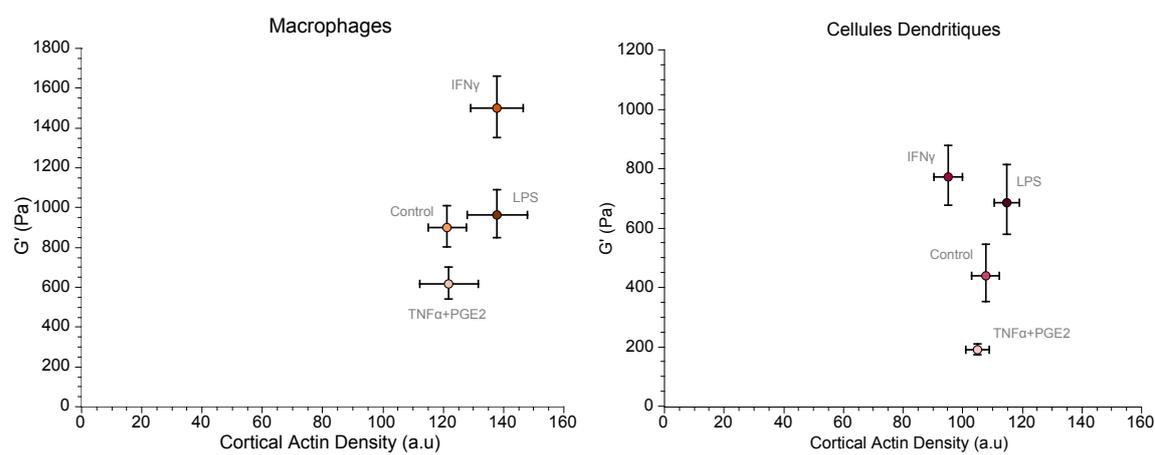


FIGURE 4.10 – Densité d'actine corticale en fonction de \bar{G}' après traitement en conditions inflammatoires pour les macrophages (gauche) et les cellules dendritiques (droite)

4.2.3 Densité d'actine corticale et volume cellulaire

Récapitulons nos observations : la mesure de la densité d'actine corticale nous a permis de mettre en évidence une tendance à la corrélation positive entre la concentration en actine au cortex et la rigidité cellulaire pour des cellules de différents types (cellules dendritiques, macrophages, monocytes, lymphocytes T et Jurkat) ; bien que celle-ci fasse face à des exceptions non négligeables (figure 4.8). Par ailleurs, il n'est pas possible d'expliquer les différences de rigidité observées après les traitements par les facteurs inflammatoires par des différences en concentration d'actine au cortex (figure 4.10). La quantification des myosines phosphorylées peut permettre d'expliquer les modifications des rigidités engendrées par $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$, mais ne permet pas de conclure quant au LPS et à l' $\text{IFN}\gamma$; et encore moins de fournir des éléments d'interprétation quant aux rigidités différentes des monocytes, macrophages et cellules dendritiques non traitées.

La régulation moléculaire des rigidités des cellules myéloïdes est donc un phénomène complexe qui fait intervenir bien plus que deux facteurs. Toutefois, nous avons remarqué l'existence d'une corrélation forte entre densité d'actine corticale et volume cellulaire¹. Les graphes A, B et C de la figure 4.11 représentent la densité d'actine corticale en fonction du volume cellulaire en fonction des types cellulaires (A) et des différents traitements administrés aux macrophages (B) et aux cellules dendritiques (C).

Si ici encore les graphes représentant l'effet des traitements inflammatoires ne semblent pas dévoiler de corrélation particulière, la tendance linéaire du premier graphe est impressionnante. Plus le volume de la cellule est grand, plus sa densité d'actine au niveau du cortex est élevée. On pourrait comprendre cela comme un ré-équilibre pour permettre aux cellules de conserver une pression osmotique relativement constante.

Bien entendu, corrélation n'implique pas causalité, et il faudrait pouvoir moduler à loisir le volume cellulaire et mesurer les rigidités correspondantes pour pouvoir affirmer un lien de dépendance entre ces deux grandeurs. Toutefois, on peut trouver une explication de premier ordre très simple en faisant appel à la loi de Laplace. Celle-ci relie la courbure de l'interface ($1/R$) séparant deux milieux à la tension de surface γ de l'interface et la différence de pression $P_{int} - P_{ext}$ entre les deux milieux. Appliquée à une goutte sphérique, on obtient :

$$P_{int} - P_{ext} = \frac{2\gamma}{R}; \quad (4.1)$$

Pour une cellule, la différence de pression entre intérieur et extérieur, $P_{int} - P_{ext} = \Delta P$ s'identifie avec la différence de pression osmotique. Si on suppose que les cellules observées ont toutes la même différence de pression osmotique avec l'extérieur, alors à un rayon R plus grand doit correspondre une tension de surface γ plus élevée. Or nous avons vu au chapitre 1 (paragraphe 1.2.2 p.36) que dans le cas d'une cellule, la tension de surface est structurellement supportée par le cortex d'acto-myosine, qui confère

1. Les volumes cellulaires ont été calculés d'après des images en microscopie 3D, sur des clichés différents de ceux utilisés pour estimer la densité d'actine corticale, comme il est décrit en Annexe C (figure C.2)

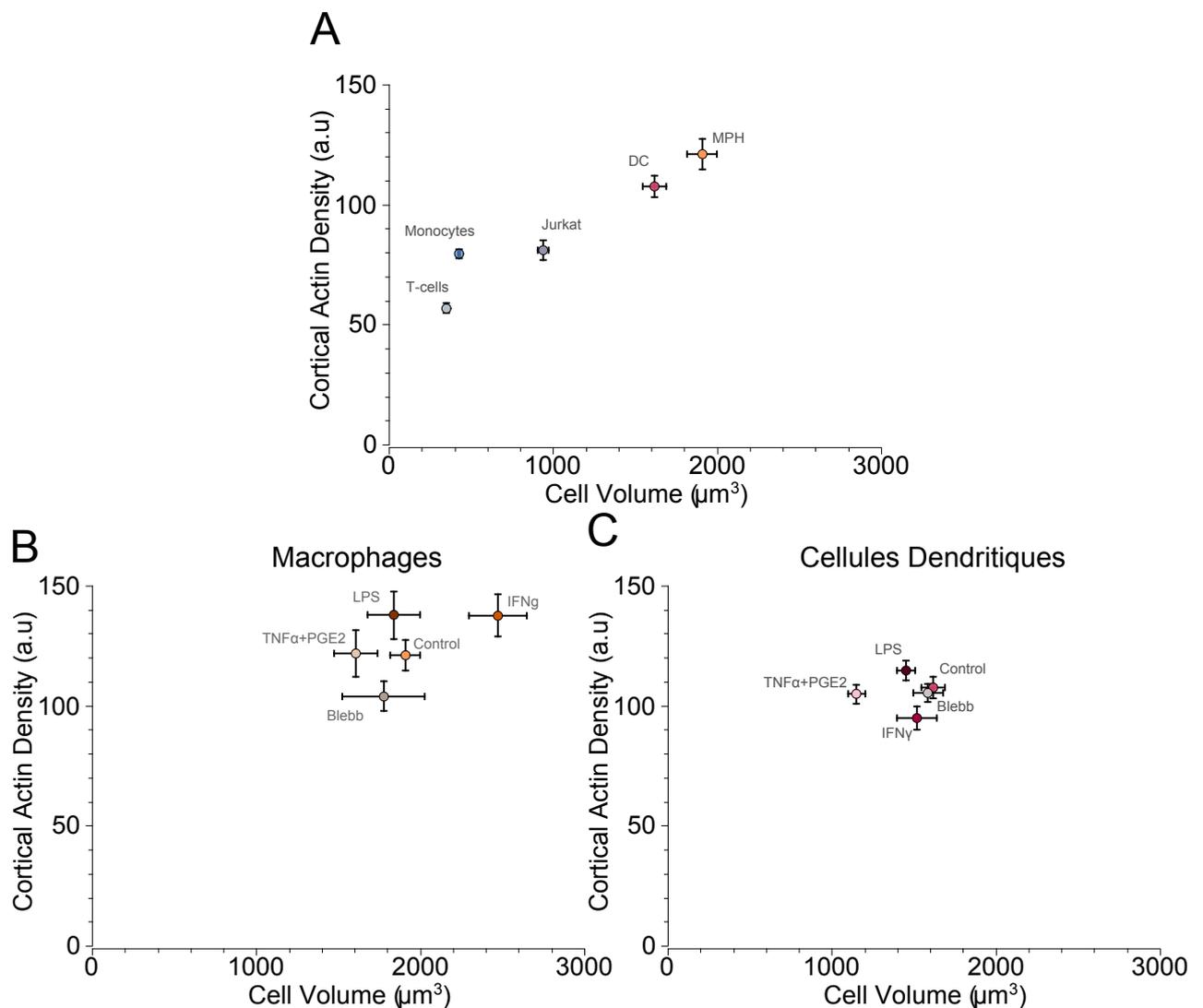


FIGURE 4.11 – Densité d'actine corticale en fonction du volume cellulaire entre les différents types cellulaires (A), et après traitements sur les macrophages (B) et cellules dendritiques (C).

aussi à la cellule sa rigidité. Donc, à une différence de pression donnée, si le rayon est plus grand, γ est plus élevé, et par conséquent la cellule plus rigide. On peut même aller encore plus loin et postuler que la densité d'actine corticale permet d'augmenter γ (renforcer la structure de la coque enveloppant la cellule), puisque plus la cellule est grande, plus sa densité d'actine corticale est élevée (figure 4.11).

Encore une fois, si ces interprétations permettent d'expliquer les corrélations et différences observées entre types cellulaires, elles sont mises à mal par les effets des différents traitements, qui influencent peu la densité d'actine corticale et le volume cellulaire (figure 4.11). Deux points sont tout de même à noter dans les graphes (B) et (C). Pour les macrophages (graphe B) les cellules traitées avec l'IFN γ semblent se démarquer du reste des points, dans le sens d'une corrélation positive entre densité d'actine corticale et taille cellulaire. De la même manière, les cellules dendritiques ayant subi

un traitement par $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$ (graphe C) se détachent du reste des points. Nous retrouvons ici cette idée soulevée au chapitre précédent : les traitements qui induisent, sur un type cellulaire donné, des changements fonctionnels très profonds (maturation des cellules dendritiques ou des macrophages) sont encore une fois ceux qu'il est possible de démarquer par rapport aux autres traitements, en terme d'effet sur le volume cellulaire ici, un paramètre physiologique n'ayant, *a priori*, pas de relation directe et évidente avec des fonctions immunologiques.

A ce stade, nous voudrions voir l'évolution de la concentration en myosine en fonction du volume cellulaire. Mais, si les mesures des volumes cellulaires moyens ont été effectuées indépendamment des mesures de la densité d'actine corticale, l'estimation de la concentration en myosine a fait intervenir les valeurs des volumes cellulaires moyens. Par conséquent, tracer la concentration en myosine phosphorylée en fonction du volume ne montrerait qu'un artéfact, (on s'attend à une courbe de la forme $1/x$) puisque les grandeurs en abscisse et en ordonnées seraient par définition dépendantes. Il nous est donc pour l'instant impossible d'établir des corrélations de type concentration en myosine/taille cellulaire. Pour ce faire, des mesures de quantité de myosine phosphorylée au cortex par microscopie sont en cours, en suivant le même protocole que celui utilisé pour l'estimation de la densité d'actine corticale.

4.3 Conclusions du chapitre et perspectives

Les résultats de la première partie de ce chapitre nous ont apporté des renseignements sur la contribution de la myosine à la rigidité cellulaire, limités aux cas des cellules de cette étude. Nous y avons appris que la blebbistatine, qui fige les myosines dans une configuration défavorable à l'attachement au filament d'actine, diminue la rigidité cellulaire, de façon plus prononcée sur les cellules dendritiques que sur les macrophages (figure 4.4). Nous y avons également observé que $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$ augmente l'activité des myosines tout en réduisant la rigidité. Nous avons interprété cela de la façon suivante : la myosine phosphorylée correspond à un état actif de la protéine, qui sans cesse s'attache et se détache des filaments d'actine. Cette activité permet à la cellule de s'adapter dynamiquement à la déformation, et donc, de présenter une résistance à la déformation moindre. Mais cette interprétation n'est pas tout à fait satisfaisante, car les observations faites sur cellules dendritiques et macrophages non traités ainsi que sur les monocytes ne s'y conforment pas. Les monocytes ont par exemple une rigidité moyenne, une densité d'actine corticale plutôt basse et une très grande activité des myosines. Pour mieux comprendre les phénomènes mis en jeu, il faudrait effectuer des mesures sur les monocytes traités à la blebbistatine, pour voir si leur très grande concentration en myosine les rend plus sensibles à cette drogue.

Dans un second temps, les résultats d'observation sur la concentration en actine au cortex ont fourni des informations complémentaires. Nous y avons observé une corrélation (relative) entre densité d'actine corticale et rigidité, entre types cellulaires non traités. Pour renforcer ces observations et établir un lien de causalité, il faudrait mesurer les propriétés mécaniques des cellules après dépolymérisation de l'actine, par la latrunculine ou la cytochalasine-D. Une autre information intéressante à avoir, serait de pouvoir quantifier la densité de myosine corticale, exactement de la même façon que la densité d'actine corticale a été estimée. Nous pourrions ainsi y évaluer la colocalisation des deux protéines, et émettre des hypothèses quant aux états structurels du cortex de chaque type cellulaire en terme de composition en actine et en myosine.

Dans l'ensemble, ces observations nous apprennent que :

1. Si des corrélations entre rigidité et composition en actine et en myosine existent entre les différents types cellulaires observés, les modulations de rigidité par les facteurs inflammatoires ne s'y accordent pas.
2. Des compositions différentes en actine et en myosine peuvent déboucher sur des rigidités équivalentes (les monocytes ont plus de myosine et moins d'actine que les cellules dendritiques, et une rigidité comparable).
3. Des compositions similaires en actine et en myosine peuvent aussi mener à des rigidités très différentes (macrophages et cellules dendritiques ont des concentrations en myosine et en actine corticale comparable, et pour autant des rigidités bien différentes).

En d'autres termes, nous n'avons pas pu mettre à jour ici une "règle de construction" pour les éléments structurels supportant la mécanique cellulaire. La rigidité de chaque type cellulaire dépend certainement d'un ensemble plus complexe de paramètres que cette étude n'a pas eu pour ambition d'explorer exhaustivement.

Nous pouvons quand même en dégager localement des informations intéressantes sur le fonctionnement mécanique des cellules. Par exemple, on peut dire que les monocytes ont un cortex très riche en myosine, donc à la fois très réticulé et de nature très dynamique. En comparaison, les macrophages ont un cortex très riche en actine et peu dynamique. Cela permet aux premiers d'être plus plastiques, et aux deuxièmes plus stables mécaniquement, ce qui correspond d'une part à leur fonction (les premiers motiles, les seconds résidents) et d'autre part se retrouve dans la corrélation taille/rigidité (les résidents, plus rigides, sont également de taille supérieure à ceux circulant). Mais même si ce genre d'interprétations séduisantes peuvent se dégager de l'ensemble de ces résultats, dans l'ensemble, les informations dont nous disposons ici, sont insuffisantes pour établir une loi générale permettant de relier la composition corticale à la rigidité cellulaire. M. Saïtakis a également mesuré par *Western blot* les quantités des protéines Arp3, Rac1, mdia1, alpha-actinine et des protéines ERM, mais aucune corrélation nette avec la rigidité n'a été observée, même si l'expression de ces protéines est différente entre types cellulaires. Ici, une étude transcriptomique permettrait peut-être de mettre à jour les autres acteurs de la rigidité cellulaire qui manquent ici pour dresser un tableau précis.

En revanche, la dernière partie de ce chapitre a permis de mettre en évidence une corrélation (mineure) entre rigidité et densité d'actine corticale d'une part, et une corrélation frappante entre volume cellulaire et densité d'actine corticale. L'explication simple que nous avons alors formulée consiste à dire que la régulation de la pression osmotique, sous l'effet de la taille, force la cellule à adapter sa tension surfacique, supportée par le cytosquelette (équation 4.1). Dans ce modèle, augmenter la densité d'actine corticale permettrait d'augmenter la tension surfacique γ , et d'encaisser la même différence de pression osmotique pour un rayon R plus grand.

Cependant, l'hypothèse centrale sur laquelle repose cette interprétation est celle d'une différence de pression osmotique conservée entre tous les types cellulaires étudiés. *A priori*, il n'existe aucune raison immédiate qui justifierait une telle conservation. Si les monocytes, cellules dendritiques et macrophages sont si différents d'un point de vue fonctionnel, physiologique, morphologique, et structurel (composition du cytosquelette différente), il est possible que la différence de pression osmotique avec l'extérieur varie. Une façon de creuser ces question serait de faire varier la pression osmotique du milieu extérieur et d'identifier les variations de taille, de rigidité, et éventuellement même de composition en actine corticale si le changement de la composition du milieu n'a pas d'incidence sur la viabilité des cellules à des temps un peu plus longs. Inversement, nous pourrions faire varier le volume des cellules et observer comment la rigidité et la concentration en actine au cortex évoluent. L'utilisation de la mitomycine, une drogue permettant de bloquer les cellules juste avant la mitose, augmentant ainsi artificiellement leur volume, pourrait-être utilisée à ces fins. Mais les cellules sur lesquelles nous travaillons sont primaires, et ne se divisent pas : il faudrait alors travailler sur des lignées cellulaires, ce qui compromet la pertinence de ces études dans le cadre de l'analyse du fonctionnement du système immunitaire humain.

Dans l'ensemble, ces résultats sont un bon point de départ à l'étude des contribu-

tions des différents composants du cytosquelette dans les propriétés mécaniques différentielles des cellules immunes étudiées ici. Ils soulèvent des subtilités et mettent en évidence des relations faisant intervenir des paramètres géométriques, qu'il est peu usuel de croiser dans des discussions en biologie. Un approfondissement par l'exécution des expériences suggérées ci-dessus permettrait d'apporter des réponses avec un angle original à la question de l'origine moléculaire et structurelle des différences de rigidité observées dans les chapitres 2 et 3.

CHAPITRE 5

Influence de la rigidité du substrat sur l'activation du lymphocyte T

Sommaire

5.1	Fabrication de gels de polyacrylamide	179
5.1.1	Polyacrylamide : généralités	179
5.1.2	Etapes critiques de la fabrication	180
5.1.3	Mesure des propriétés mécaniques des gels	181
5.2	Résultats préliminaires	186
5.3	Discussion et perspectives	191
5.3.1	Commentaires sur le protocole de fabrication et la méthode de mesure	191
5.3.2	Commentaires sur les résultats préliminaires	193

Il est temps d'aborder maintenant la question de la mécano-sensibilité du lymphocyte T. En effet, les mesures systématiques des modules complexes des cellules présentatrices nous ont appris les valeurs de rigidité typiques que les lymphocytes T sont susceptibles de rencontrer pendant leur activation *in vivo*. Si l'origine de la grande variabilité des propriétés mécaniques des cellules présentatrices d'antigène est encore incomprise, nous pouvons toutefois étudier la question de la mécano-sensibilité de l'activation du lymphocyte T.

Dans ce chapitre, nous avons cherché à isoler la composante mécanique des facteurs chimiques (molécules activatrices) lors de l'activation du lymphocyte T. Pour cela, nous avons mis au point un protocole de fabrication de gels de poly-acrylamide dont les propriétés mécaniques sont similaires à celles mesurées sur les cellules présentatrices d'antigène.

Nous allons d'abord décrire les difficultés principales que nous avons rencontrées pour la fabrication de tels substrats, et présenter quelles solutions nous avons retenues. Puis nous verrons comment nous avons mesuré et calibré les propriétés mécaniques des hydrogels. Enfin, nous montrerons les premiers résultats des expériences effectuées sur ces substrats. Nous consacrerons ensuite une dernière partie à la discussion du protocole, de la méthode de mesure et des résultats eux-mêmes.

5.1 Fabrication de gels de polyacrylamide

5.1.1 Polyacrylamide : généralités

Nous cherchons donc à mettre au point un hydrogel dont les propriétés mécaniques se rapprochent le plus possible de celles des cellules présentatrices d'antigène mesurées précédemment. Nous avons pour cela sélectionné le polyacrylamide, un gel formé de l'assemblage de monomères d'acrylamide en longues chaînes, réticulées par le bis-acrylamide (Figure 5.1), et couramment utilisé en biologie (pour l'électrophorèse).

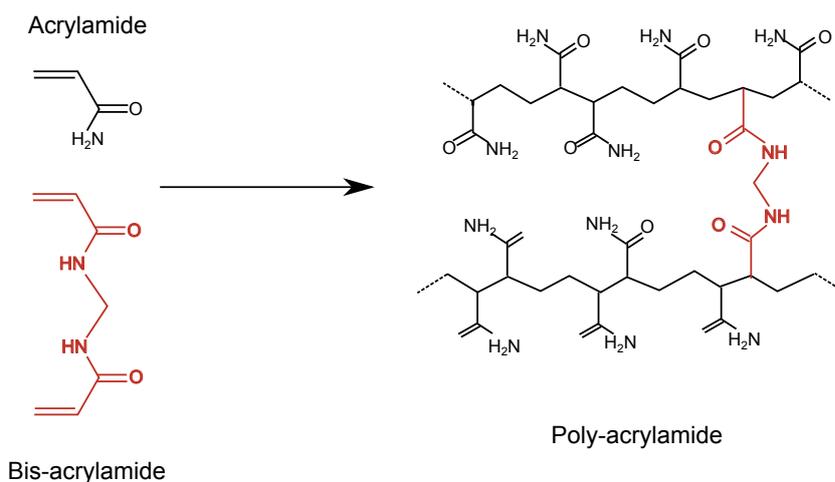


FIGURE 5.1 – Réaction de polymérisation du polyacrylamide. Les monomères d'acrylamides sont assemblés en chaînes, réticulées par le bis-acrylamide.

Cet hydrogel permet de répondre aux contraintes que l'expérience impose :

- C'est un gel quasiment purement élastique [Yeung *et al.* , 2005], dont la raideur peut-être modulée en modifiant les concentrations relatives d'acrylamide et de bis-acrylamide [Pelham *et al.* , 1997]. Il est possible d'obtenir des rigidités finales allant de la centaine de Pascals à quelques dizaines de kilo-Pascals [Tse & Engler, 2010], gamme comprenant les rigidités que nous cherchons à reproduire.
- C'est un gel transparent, qui permet donc l'imagerie par microscopie et immunofluorescence.
- La taille des pores est suffisamment faible (de l'ordre de la centaine de nm) pour garantir une non-pénétration des cellules ou de leurs projections à l'intérieur du gel [Holmes & Stellwagen, 1991].
- Il est possible de fonctionnaliser la surface des gels avec des protéines d'intérêt pour solliciter la cellule (protéines d'adhésion comme la cadhérine ou la fibronectine, ou molécules activatrices du lymphocyte T dans le cas de notre étude). Ceci permet également de faire varier la rigidité du gel en gardant la densité de ligands constants à la surface [Pelham *et al.* , 1997; Grevesse *et al.* , 2013].
- La surface du gel est très hydrophile, ce qui empêche la majorité des protéines non spécifiques présentes dans le sérum de s'y adsorber : seules les protéines d'intérêt délibérément attachées au gel y seront présentes en surface.
- Si les monomères d'acrylamide sont très toxiques [King & Noss, n.d.], le gel réticulé est, quant à lui, sans danger ni effet sur les cellules (pourvu qu'il soit bien lavé pour éliminer les traces de monomères restant).

5.1.2 Etapes critiques de la fabrication

Malgré ses nombreux avantages, la fabrication des gels de polyacrylamide n'est pas des plus triviales. Le principal défi que nous avons relevé est celui de fabriquer des gels de rigidité très basse (200Pa), à ce jour non reporté dans la littérature. Obtenir une telle raideur de manière reproductible nécessite une grande rigueur et un certain nombre de précautions, que nous allons détailler maintenant. Un protocole détaillé de la fabrication du gel, étape par étape, est donné en Annexe D.

Il nous faut disposer de ces gels sur une surface rigide et transparente qui permette leur manipulation et leur observation sous microscope. La première étape consiste donc à fonctionnaliser des lamelles de microscopie en verre pour permettre l'attachement des gels lors de la polymérisation. Pour cela, les lamelles, après avoir été nettoyées¹, sont recouvertes d'une solution d'acrylate pendant quelques minutes, puis rincées et séchées sous flux d'azote.

La deuxième étape cruciale est celle du dégazage des gels. En effet, la réaction de polymérisation du polyacrylamide est une polymérisation radicalaire avec laquelle le dioxygène entre en compétition. Il faut donc éliminer toute trace de ce gaz dans les solutions pour garantir un bon contrôle de la réaction. Pour obtenir des raideurs basses, la concentration en monomères et en réticulant est très faible, et s'assurer de minimiser le contact avec le dioxygène devient un point crucial pour la reproductibilité de la rigidité finale.

Après avoir mixé les solutions d'acrylamide et de bis-acrylamide aux concentrations désirées, nous avons donc choisi de les dégazer sous vide (à une pression d'environ 10mBar) pendant environ 30mn. Sans dégazage, la réaction de polymérisation a tout de même lieu, mais est moins contrôlée, ce qui conduit à une mauvaise reproductibilité des propriétés mécaniques du gel final obtenu, d'autant plus importante que les concentrations initiales sont faibles. D'autres solutions sont possibles pour cette étape, comme la saturation des solutions mères d'acrylamide et de bis-acrylamide à l'argon.

De la même façon, la polymérisation doit être effectuée dans une atmosphère dépourvue d'oxygène. Nous avons choisi pour cela de poser les gels tout juste déposés sur les lamelles dans une chambre à argon, pendant tout le temps de la polymérisation (environ deux heures).

La difficulté suivante concerne la fonctionnalisation des gels. Nous l'avons dit, les gels de poly-acrylamide ne permettent aucune adsorption spontanée de protéines à leur surface. La technique la plus répandue pour déposer une protéine d'intérêt (fibronectine, collagène, etc) sur la surface de ces gels est celle de l'activation de la surface du gel par sulfo-SANPAH [Fischer *et al.*, 2012; Tse & Engler, 2010]. Nous avons implémenté cette technique, mais les gels obtenus présentaient une surface très inhomogène en terme de protéines d'intérêt déposées à leur surface (Figure 5.2). Nous avons donc choisi d'utiliser des monomères d'acrylamide couplés à la streptavidine (dilués 10^5 fois par rapport aux monomères d'acrylamide). Cela permet l'utilisation d'anticorps biotinylés et ga-

1. Nous avons remarqué que le nettoyage le plus efficace est le nettoyage ultrasons+plasma.

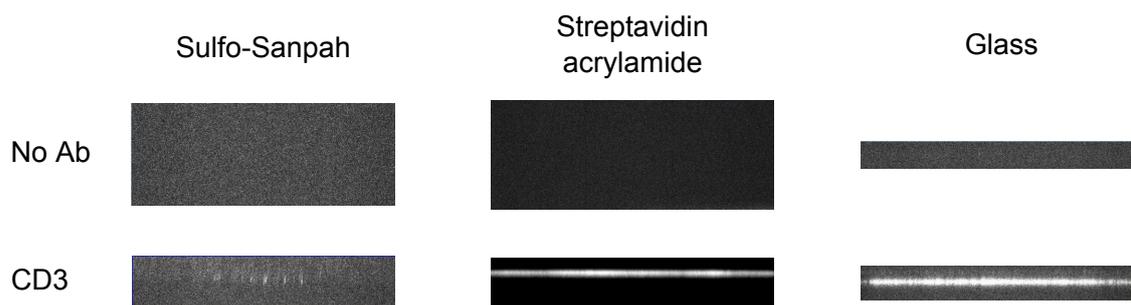


FIGURE 5.2 – Fonctionnalisation de la surface d’un gel de polyacrylamide. La méthode par sulfo-sanpah (colonne de gauche) résulte en une répartition peu dense et inhomogène en anticorps (ici CD3) tandis que l’utilisation du streptavidine-acrylamide (colonne du milieu) permet d’obtenir des résultats comparables, sinon meilleurs, à l’adsorption sur verre (colonne de droite).

rantit une attache de forte affinité, homogène et sélective des anticorps à la surface du gel (Figure 5.2).

Le protocole décrit en Annexe D permet d’éviter tous ces écueils et d’obtenir des gels d’une soixantaine de microns d’épaisseur (épaisseur largement suffisante pour que les cellules ne sentent pas le substrat en verre sous-jacent, [Buxboim *et al.* , 2010], de rigidité variable et de surface régulière uniformément recouverte d’anticorps activateurs du lymphocyte T.

5.1.3 Mesure des propriétés mécaniques des gels

Méthode

Parallèlement à la mise au point du protocole de fabrication des gels décrit en Annexe D, nous avons mesuré les propriétés mécaniques de ces gels par rhéométrie macroscopique, à l’aide d’un rhéomètre en configuration plan-plan. Le modèle utilisé permet d’imposer une contrainte et de mesurer une déformation, ou l’inverse, dans des géométries variables (cône-plan ou plan-plan), et d’effectuer des sollicitations cycliques bien contrôlées.

Nous avons fabriqué des échantillons de gel sous forme de pastilles de 40mm de diamètre et de 1.5mm d’épaisseur (nous utilisons pour moule deux couvercles de boîtes de culture). Comme pour la préparation des gels sur lamelles de microscopie, les solutions de gel destinées à la fabrication des pastilles étaient dégazées avant polymérisation, et les pastilles étaient déposées dans la chambre à argon le temps de la polymérisation.

Les surfaces planes de la cellule du rhéomètre étaient recouvertes de papier de verre auto-adhésif pour permettre un non glissement du gel. Ces surfaces étaient changées à chaque nouvelle expérience. Nous avons opté pour un protocole de mesure du module de cisaillement à une déformation de 5% pour deux fréquences (1 rad.s^{-1} et 5 rad.s^{-1}), en faisant varier la distance entre les plaques (voir schéma de principe en Figure 5.3).

Le protocole de mesure est donc le suivant :

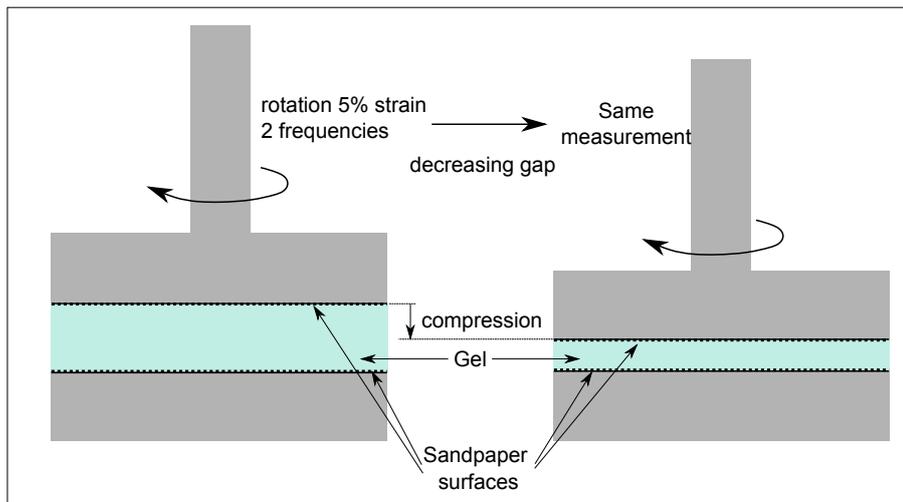


FIGURE 5.3 – Schéma de principe de la rhéométrie en géométrie plan-plan. Les pastilles de gel sont déposées entre les deux plaques du rhéomètre, recouvertes de papier de verre pour permettre l'adhésion. Une déformation oscillante de 5% d'amplitude est appliquée, et la contrainte correspondante est mesurée. Par un algorithme implémenté dans l'appareil, les modules de cisaillement de perte et de reprise élastique sont donnés, que nous convertissons en modules de compression ($G_{tensile} = 2(1 + \nu) \times G_{shear}$, où ν est le coefficient de poisson et vaut 0.45 pour le polyacrylamide - [Takigawa *et al.*, 1996]).

1. Placer les surfaces de papier de verre sur les plaques de la cellule du rhéomètre
2. Déposer le gel avec précaution entre les plaques
3. Hydrater le gel
4. Baisser la plaque supérieure de sorte qu'elle entre en contact avec le gel
5. Lancer une mesure de cisaillement dynamique pour deux fréquences successives (1 rad.s^{-1} et 5 rad.s^{-1})
6. Réduire l'espacement entre les plaques
7. Refaire deux points de mesure
8. Répéter les deux étapes précédentes aussi longtemps que nécessaire (jusqu'à destruction du gel ou surcharge du rhéomètre).

Sur la courbe en Figure 5.4, on voit qu'à mesure que l'on comprime le gel (δ diminue), le module mesuré augmente, passe par un maximum puis diminue (lire la courbe de droite à gauche). La phase d'augmentation du module peut-être interprétée comme une mise en contact progressive du gel avec toute la surface des plaques. Lors de cette phase, on peut imaginer que plus le gel est écrasé, plus les vides liés aux aspérités locales des surfaces respectives du papier de verre et du gel et à une géométrie imparfaite sont comblés. Par conséquent la surface de contact réelle entre gel et plaques augmente, ce qui augmente la résistance du gel à la torsion. Comme le logiciel suppose que dès le début, la totalité de la surface est en contact avec les plaques, cela revient à augmenter le module apparent mesuré par l'appareil.

La phase de diminution qui vient ensuite peut-être interprétée par le fait qu'une compression accrue peut rompre des liens de réticulation et diminuer la rigidité apparente du gel. Par ailleurs, les valeurs des modules obtenues aux fréquences testées sont

similaires. Pour chaque échantillon testé, nous avons donc extrait la valeur maximum comme valeur du module de reprise élastique.

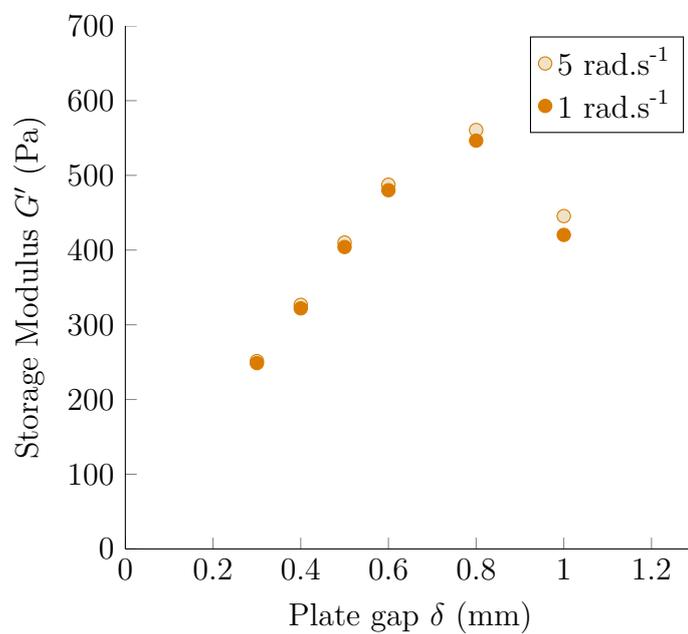


FIGURE 5.4 – Exemple de courbe obtenue par rhéométrie plan-plan sur des pastilles de gels de poly-acrylamide. La valeur retenue comme module de l'échantillon est le maximum de la courbe.

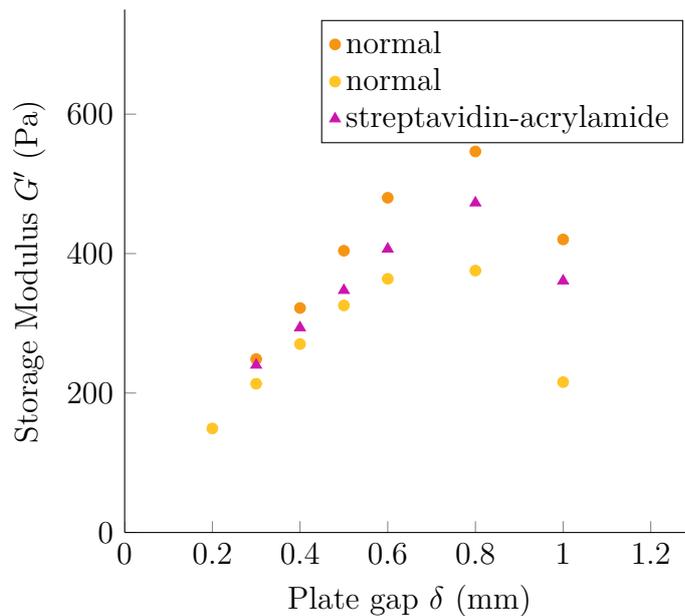


FIGURE 5.5 – Comparaison des gels en présence ou non de monomères d'acrylamide couplés à la streptavidine dans le gel.

Résultats

Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence de l'ajout de monomères reliés à la streptavidine sur les propriétés mécaniques des gels. La "construction" commerciale que nous avons utilisée est telle qu'une molécule de streptavidine est en fait liée à quatre monomères d'acrylamide. Il n'est donc pas exclu que la streptavidine joue un rôle de réticulant supplémentaire, bien que leur concentration relative par rapport aux monomères libres soit très faible (1 complexe acrylamide-streptavidine pour 10^5 monomères d'acrylamide libres). Pour cela nous avons effectué le même jour des mesures sur deux gels dépourvus d'acrylamide-streptavidine, et un gel contenant des complexes acrylamide-streptavidine. Les courbes obtenues sont présentées en Figure 5.5, où on y voit que la présence de monomères couplés à la streptavidine n'influence pas les propriétés mécaniques du gel, en tout cas moins que les variations enregistrées lors de la préparation indépendantes de deux solutions de gel pour deux échantillons distincts. Ces variations d'une solution à l'autre sont très importantes : ici les modules obtenus varient de 330 à 545 Pa. Ceci est la plus grande faiblesse de nos expériences, dont nous discuterons plus loin. Nous diluons ici énormément les monomères comportant la streptavidine par rapport aux monomères libres. Ce grand taux de dilution permet de limiter les coûts², et s'avère suffisant pour une bonne adhérence des anticorps à la surface, tout en préservant les propriétés mécaniques du gel.

Par la suite, nous avons donc effectué des mesures sur plusieurs échantillons sans streptavidine pour déterminer les concentrations nécessaires à l'obtention des raideurs visées (*i.e* mimant celles des cellules présentatrices), tout en limitant les coûts. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous, tandis que la Figure 5.6 montre l'évolution du module de reprise élastique avec la concentration en bis-acrylamide,

2. 1mg de streptavidin-acrylamide coûte 247€, et il en faut 250 à 400 μ g pour une pastille...

pour une concentration d'acrylamide donnée, même très faible. Ces courbes sont similaires à celles que l'on peut tracer d'après les données de Tse & Engler [2010], et la rigidité comparable à celle obtenue dans la littérature, que ce soit par AFM [Tse & Engler, 2010], ou par rhéométrie cône-plan [Fischer *et al.* , 2012].

% Acrylamide	% Bis-acrylamide	G' (Pa)	Erreur Standard (Pa)	N
3	0.06	190	20	17
3	0.1	410	30	13
3	0.4	1150	60	15
12	0.5	43000	2000	12
5	0.5	6400	300	12

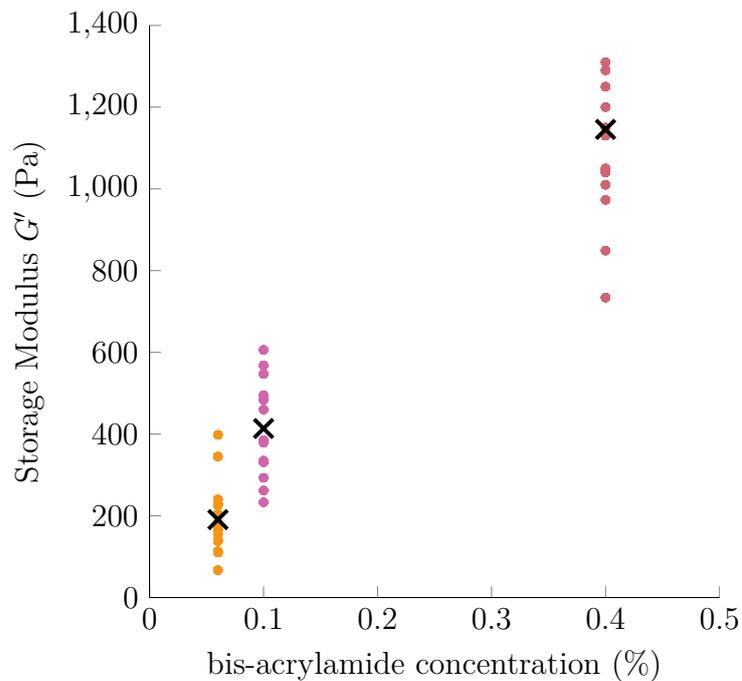


FIGURE 5.6 – Evolution du module de reprise élastique en fonction de la concentration en réticulant bis-acrylamide, pour une concentration en monomères d'acrylamide de 3%. Les points colorés correspondent à la valeur du module mesurée pour chaque échantillon dans chaque condition, tandis que les croix représentent leur moyenne.

5.2 Résultats préliminaires

Après de longs mois de mise au point des protocoles décrits ci-dessus, nous avons pu réaliser les premières expériences. Nous avons choisi de recouvrir les gels de molécules qui stimulent l'activation du TCR :

- des anticorps dirigés contre le complexe CD3, dont l'engagement est nécessaire pour l'activation du lymphocyte T (anti-CD3)
- des anticorps dirigés contre la glycoprotéine CD28, co-stimulateur du TCR permettant une activation complète du lymphocyte T (anti-CD28)
- la molécule ICAM-1, ligand de LFA-1, intégrine du lymphocyte T également impliquée dans l'activation de la cellule (voir chapitre 1 p.22 pour plus de détails).

Les combinaisons : aucun anticorps, anti-CD3, anti-CD3+anti-CD28, anti-CD3+anti-CD28+ICAM-1 ont été effectuées selon les cas, aux concentrations de 10 μ g/mL pour anti-CD3 et anti-CD28 et 2 μ g/mL pour ICAM-1.

Nous avons réalisé trois expériences où nous avons déposé les lymphocytes CD4⁺ sur les gels, et où nous avons principalement analysé deux choses : la réponse en terme d'activation et de sécrétion de cytokines d'une part (marqueur CD69 par cytométrie de flux et cytokines IL-2 et IFN γ par test ELISA), et d'autre part le degré d'étalement des cellules par microscopie.

Lors de la dernière expérience, nous avons séparé les cellules naïves et mémoires³. Les cellules mémoires sont des cellules qui ont déjà été activées *in vivo*, et une nouvelle activation *ex vivo* au cours d'une nuit révèle ce que les cellules sont capables de produire. Les cellules naïves quant à elles, n'ont pas encore acquis leur activité fonctionnelle. L'activation va induire un programme de différenciation qui les conduit vers des fonctions différentes : cellules sécrétrices de cytokines (Th1, Th2), cellules régulatrices (Treg). A l'image des travaux d'A. Engler (voir chapitre 1 p.54), on peut imaginer que la voie de différenciation empruntée dépend des propriétés mécaniques du substrat.

Nous avons donc effectué les mêmes mesures que sur les expériences précédentes sur les cellules mémoires seulement, tandis que sur les cellules naïves, nous avons mesuré l'expression des facteurs de transcription t-bet, GATA3 et Foxp3, marqueurs spécifiques des cellules Th1, Th2 et Treg, respectivement. Il faut également préciser que dans cette partie, la fabrication des gels, le dépôt des cellules et le marquage pour la microscopie ont été effectués à quatre mains (M. Saïtakis et N. Bui), tandis que l'observation et l'analyse des images ainsi que la quantification des sécrétions cytokiniques et des quantités de facteurs de transcription ont été effectuées par M. Saïtakis seul.

La Figure 5.7 présente les résultats de cytométrie de flux pour l'expression du marqueur CD69, et des concentrations d'IL-2 et IFN γ présents dans le surnageant, obtenus par test ELISA⁴ 20h après le dépôt des cellules sur les gels. L'IL-2 est une cytokine massivement sécrétée après activation et nécessaire pour la prolifération cellulaire. Nous pouvons en tirer les conclusions suivantes :

3. kits de séparation commerciaux, Miltenyi Biotech

4. Kit commercial, BD Biosciences

1. Il y a une grande variabilité entre donneurs, déjà observé dans la littérature. Cette variabilité reflète l'état d'activation des lymphocytes T au moment du don chez un donneur sain toutefois soumis à son environnement.
2. Il y a par contre une grande variabilité des duplicate pour un gel de concentration donnée (expériences réalisées sur deux lamelles par condition de gel et de coating données). Cela peut provenir de la grande variabilité des rigidités finales que l'on obtient (sur la Figure 5.6, pour chaque concentration l'amplitude sur laquelle s'étend les points est très grande.). A l'avenir, nous réaliserons des expériences en triplicate (trois lamelles par condition), bien que cela augmente encore la lourdeur de ces expériences.
3. On n'observe pas de variation notable de l'expression de CD69 en fonction de la rigidité des gels.
4. Bien que ces résultats soient préliminaires et ne représentent qu'une seule expérience, on voit que l'expression des cytokines par les cellules mémoires est plus importante sur des gels plus rigides, et ce encore plus en présence d'ICAM-1. Il semble que l'effet co-activateur des intégrines déjà rapporté dans la littérature [van Seventer *et al.* , 1991; Van Seventer *et al.* , 1990; Altmann *et al.* , 1989] soit lié à la mécano-sensibilité : les intégrines sont en effet des mécanosenseurs connus (voir chapitre 1 p.43).
5. Dans tous les cas, la réponse est plus importante sur verre et plastique. Ceci peut-être dû à leur plus grande rigidité (de l'ordre du Giga Pascal), ou peut-être au fait que contrairement aux gels, le verre permet l'adsorption, en plus des molécules activatrices, des protéines et autres molécules présentes dans le milieu de culture lors de la nuit d'incubation. Nous préparons un gel de rigidité très supérieure à celle de la gamme testée jusqu'à présent pour identifier si cette activation supérieure est vraiment rigidité-dépendante.

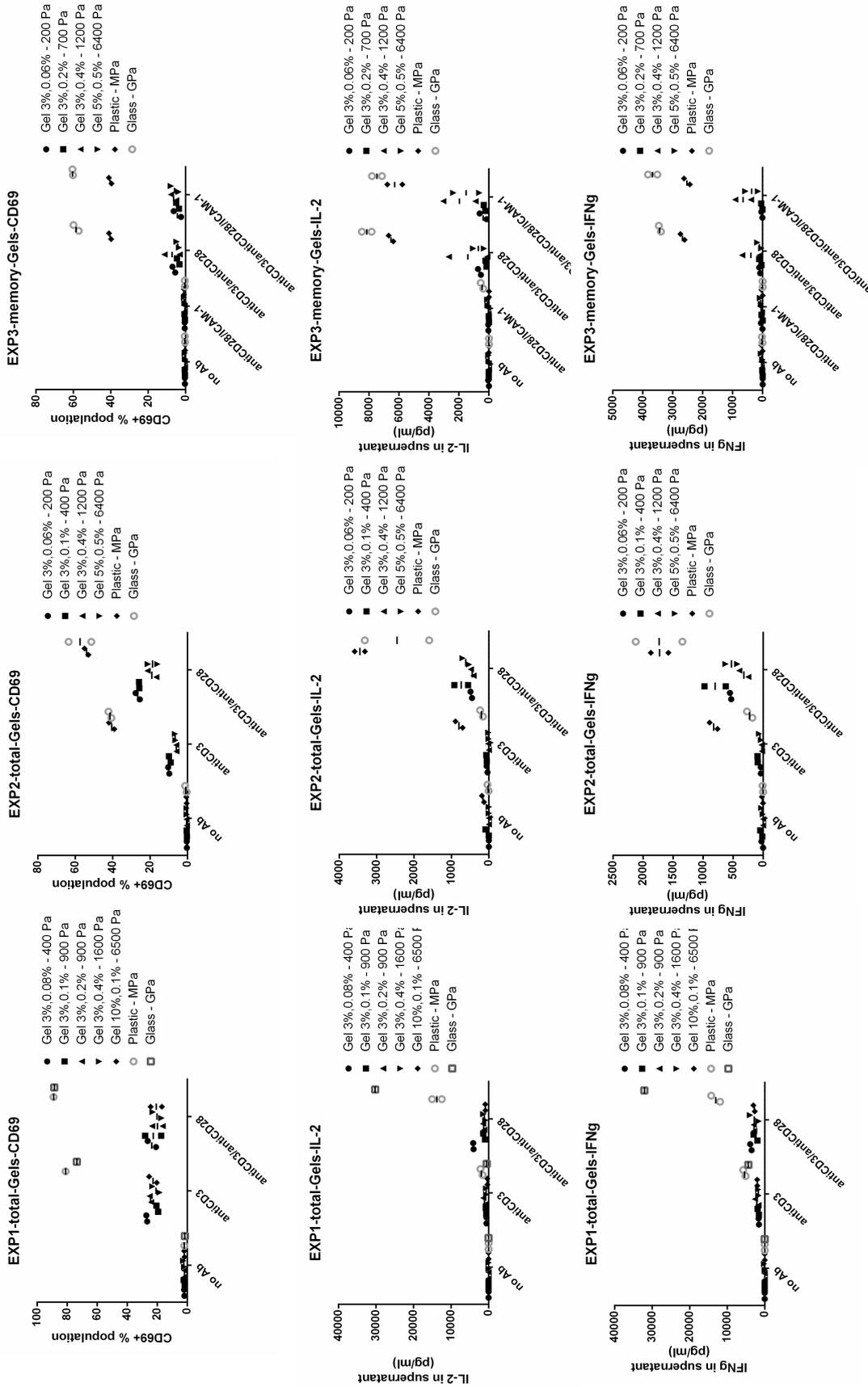


FIGURE 5.7 – Dosage des marqueurs d'activation de surface (CD69) et de la sécrétion de cytokines (IL-2 et IFN γ) des lymphocytes T cultivés sur des gels de rigidité variable. Chaque expérience correspond aux résultats obtenus à partir du sang d'un donneur. "total" indique des expériences effectuées sur la totalité des lymphocytes T du donneur, tandis que "memory" désigne la dernière expérience réalisée uniquement sur les cellules mémoires de ce dernier donneur.

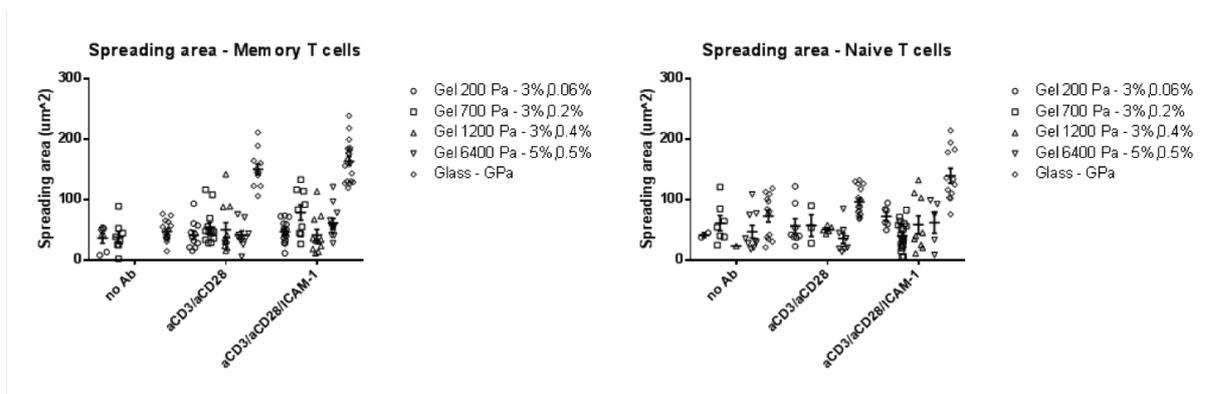


FIGURE 5.8 – Étalement des lymphocytes T en fonction de la rigidité des gels utilisés pour leur culture, et des protéines activatrices utilisées.

Concernant l'étalement des cellules, on voit sur la Figure 5.8 que la surface de contact avec le substrat n'est pas modifiée par la présence d'anticorps activateurs sur les gels de polyacrylamide. Il est important de préciser ici que la présence des anticorps activateurs à la surface des gels est systématiquement vérifiée par immunofluorescence, et que ce coating était effectif, puisque les cellules sont activées (Figure 5.7). En revanche, les lymphocytes T s'étaient sur le verre lorsqu'il est recouvert d'activateurs. Cet étalement est plus important pour les cellules mémoires, et est augmenté en présence d'ICAM1.

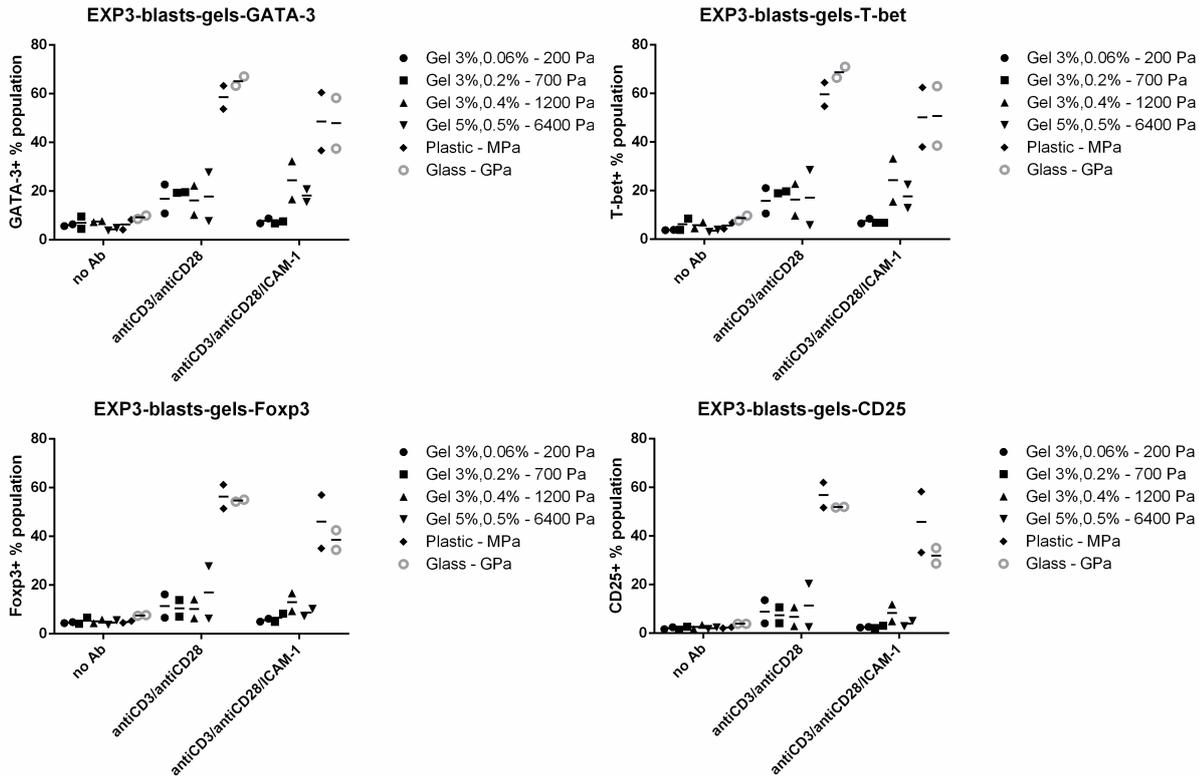


FIGURE 5.9 – Résultats des expériences obtenus par cytométrie de flux sur les cellules naïves. Le pourcentage de cellules exprimant les facteurs de transcription caractéristiques d’une différenciation en cellule effectrice TH1 (t-bet), Th2 (GATA3) et Treg (Foxp3 et CD25) est représenté pour chaque concentration de gel, sur plastique ou sur verre, et par condition de coating réalisées.

Enfin, bien que nous n’ayons des résultats que d’une seule expérience pour la différenciation des lymphocytes T naïfs (un donneur, duplicate), nous pouvons en tirer les observations suivantes (Figure 5.9) :

- L’activation par anti-CD3 et anti-CD28 sur des gels de rigidités différentes des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs induit une différenciation en Th1 (facteur de transcription t-bet), Th2 (facteur de transcription GATA-3) et Treg (facteurs de transcription Foxp3 et présence du récepteur à l’IL2, CD25)
- La rigidité, dans la gamme de celle des cellules présentatrices d’antigène, ne semble pas influencer cette différenciation.
- La présence d’ICAM1 inhibe la différenciation sur les gels les plus mous (200 et 700 Pa), suggérant ici encore l’importance des intégrines pour la mécanosensibilité des lymphocytes T.

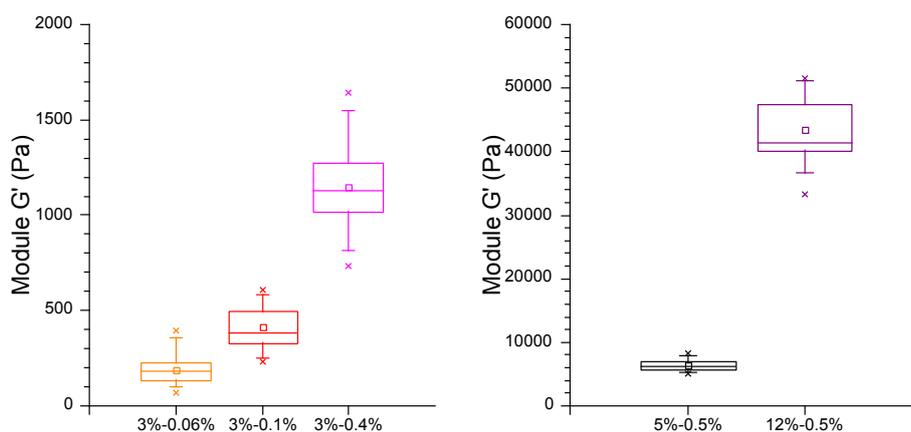


FIGURE 5.10 – Représentation en boîte de whiskers pour les gels de concentration en monomère d’acrylamide de 3% (gauche), et 5 et 12% (droite). Le carré représente la moyenne des données, la boîte l’intervalle 25%-75% les barres l’intervalle 95%-5% et les croix le minimum et le maximum des points obtenus sur tous les échantillons mesurés.

5.3 Discussion et perspectives

Nous avons donc présenté ici ce qui a occupé les derniers mois de cette thèse. Bien que le travail soit encore en cours, et que les résultats soient tout à fait préliminaires, nous pouvons d’ores et déjà émettre quelques commentaires et proposer des orientations pour la suite de ce travail.

5.3.1 Commentaires sur le protocole de fabrication et la méthode de mesure

Tout d’abord, le mode de mesure des propriétés mécaniques des gels donne matière à discussion. Tout d’abord, ces mesures ont été effectuées à température ambiante, et non à 37°C. Il est possible - et en projet - d’effectuer ces mesures à 37°C, que nous n’avons pas effectuées par manque de temps en fin de thèse (le dispositif est tel qu’il faut attendre environ 2h pour s’assurer que la température se stabilise dans la pastille avant chaque mesure). Ces mesures ont également été effectuées dans l’air, et non en milieu aqueux. Nous avons tenté de remédier à ce problème en hydratant les gels avec du PBS à saturation tout le long de l’expérience (une petite flaque était présente tout autour de l’échantillon, dans lequel celui-ci baignait). Ceci-dit, nous avons estimé l’influence de cette hydratation en excès, et cela ne semblait pas influencer davantage le résultat des mesures par rapport aux variations obtenues d’un échantillon à l’autre.

En effet, le grand problème de ce protocole reste la très grande variabilité des rigidités obtenues pour une même concentration. Les sources d’erreur sont nombreuses : erreurs de pipetage, dégazage incomplet, volume final altéré au dégazage à cause de projections qui conduit à des concentrations en APS et TEMED finales modifiées, et exposition peu contrôlée à l’air libre, taux d’humidité de l’air ambiant variable d’un jour à l’autre. Pour les pastilles, ceci pouvait conduire à des variations du module de reprise élastique de très grande amplitude pour une même concentration (Figure 5.10).

En particulier, le tableau ci-dessus donne les valeurs du rapport du point le plus

% Acrylamide	% Bis-acrylamide	max/min
3	0.06	5,9
3	0.1	2,6
3	0.4	2,2
12	0.5	1,6
5	0.5	1,6

élevé sur le point le plus petit obtenu, ce qui donne une idée de l'amplitude de la dispersion des données. On remarque que plus le gel est mou, plus cette amplitude est grande. Ceci n'est probablement pas lié au degré de précision de l'appareil de mesure, capable d'une précision bien plus basse. Ce phénomène est plus probablement dû à la très grande influence du dioxygène, qui est malgré tout pas assez contrôlée. Ainsi, sur les gels les plus mous, rien n'exclut que d'une expérience à l'autre les variations de la rigidité soient de ces ordres de grandeur. Encore pire : il est tout à fait possible que d'une lamelle à l'autre, coulées à quelques secondes d'intervalle, les rigidités soient très différentes. Un autre inconvénient de notre méthode de mesure est qu'elle s'effectue à échelle centimétrique, alors que les cellules ne sont capables de sentir les propriétés mécaniques du substrat qu'à leur échelle, c'est à dire la dizaine de microns. Or il est tout à fait possible que les propriétés mécaniques diffèrent entre les échelles [Kloxin *et al.*, 2010], et il faudrait en toute rigueur pouvoir mesurer les propriétés mécaniques des gels à l'échelle de la dizaine de microns.

Une méthode de mesure permettrait de résoudre ces problèmes : la microscopie à force atomique (AFM). Tout comme cette technique peut permettre de sonder la rigidité locale des cellules (voir paragraphe 1.2.3 p.46), nombreux sont ceux qui l'utilisent pour évaluer les propriétés mécaniques locales des substrats de PDMS ou de poly-acrylamide destinés à la culture cellulaire [Solon *et al.*, 2007; Engler *et al.*, 2006; Fischer *et al.*, 2012]. Avec cet appareil, nous pourrions envisager de mesurer chaque lamelle couplée au gel avant le dépôt des cellules en culture, déjà largement employée dans la littérature pour la mesure de rigidité d'hydrogels [Tse & Engler, 2010]. Il se trouve que nous disposons d'un AFM au laboratoire Matières et Systèmes Complexes. Nous avons donc tenté de mettre en place cette méthode, mais nous nous sommes heurtés à un certain nombre de difficultés, que nous avons pour l'instant contournées en se contentant de mesures par rhéométrie classique.

Un des aspects que nous avons identifié comme problématique est celui de la calibration de la pointe utilisée pour sonder la surface. Nous utilisons des pointes commerciales disposant d'une bille de $10\mu\text{m}$ de diamètre à leur extrémité⁵. Si l'appareil dispose d'une option permettant de calibrer la raideur de la pointe en mesurant les fréquences de résonances d'après les sollicitations thermiques ambiantes des pointes, cette méthode est très peu précise et donne d'une fois à l'autre des résultats pouvant diverger d'un facteur dix. Nous avons donc pris le parti de calibrer la pointe de l'AFM

5. Nano and More, Inc

contre une de nos lamelles en verre que nous utilisons pour la rhéométrie cellulaire dans le dispositif à microplaques, et la mise au point d'une méthode fiable a pris un peu de temps (nous observions une hystérèse entre la raideur mesurée à l'approche et au retour de la pointe, probablement due à des conditions d'adhésions différentes, dont nous nous sommes affranchies en effectuant les mesures en milieu liquide).

Mais, même avec une valeur de la raideur de la pointe bien déterminée, une des principales difficultés était de parvenir à obtenir une courbe convenable. La très faible raideur des gels en est peut-être la cause : pour une pointe de raideur de 150 mN/m, sa déformation lors de l'entrée en contact avec un gel d'environ 200 Pa était peut-être trop faible pour être détectée convenablement par le laser. Toujours est-il que dans la plupart des cas, l'appareil était incapable de détecter la surface du gel. En outre, les quelques fois où nous avons pu obtenir des données exploitables, celles-ci étaient en désaccord avec les données obtenues par rhéométrie plan-plan : nous pouvions observer jusqu'à un ordre de grandeur de différence ; alors qu'il existe dans la littérature des mesures de rigidités d'hydrogels par AFM compatibles avec des mesures en rhéométrie cône-plan [Tse & Engler, 2010; Fischer *et al.*, 2012]. Les causes de ces divergences ne sont pas encore élucidées. Il est possible qu'un gonflement local du gel, ou une hétérogénéité de la surface en soit responsable, en introduisant des mouvements de torsion latérale de la pointe parasites à la détection de la déflexion verticale.

Tous ces problèmes sont en cours d'investigation, avec l'aide de Nicolas Chevalier, post-doctorant au laboratoire, et donneront lieu très prochainement à une publication d'ordre technique. En fin de compte, la principale raison pour laquelle nous n'avons pas creusé dans cette direction est par faute de temps. Mais une étude comparative exhaustive des propriétés locales et globales de nos gels par ces deux méthodes ne devrait pas excéder six mois, ce qui en fait un projet parfait pour un stagiaire en deuxième année de master.

5.3.2 Commentaires sur les résultats préliminaires

Nous avons été étonnés des résultats qui contrastent avec les deux publications témoignant d'expériences similaires (voir paragraphe 1.3.1 p.70, Figure 1.37). Rappelons-nous brièvement que ces deux études présentaient d'un côté l'augmentation des témoins d'activation avec la rigidité pour des substrats de polyacrylamide de 10 à 200 kPa [Judokusumo *et al.*, 2012], et de l'autre une diminution des témoins d'activation avec la rigidité pour des substrats de PDMS allant de 100 à 10000kPa [O'Connor *et al.*, 2012]. En comparaison, tout ce que l'on peut dire à l'issue de nos résultats, qui ont l'avantage de présenter des gammes de rigidité physiologiques représentant celle des cellules présentatrices, c'est qu'il ne semble n'y avoir aucun effet de la rigidité sur l'activation des lymphocytes T.

Bien entendu, ces résultats nécessitent d'être confirmés, et nous sommes actuellement en train de reproduire ces expériences. Mais un point indiscutable ressort de ces observations : les cellules cultivées sur verre et sur plastique ont systématiquement un taux de marqueur d'activation plus élevé (pourcentage de cellules présentant CD69,

sécrétion d'IL-2 et d'IFN γ , et pourcentage de cellules exprimant les facteurs de transcription pour les gènes caractéristiques de la différenciation en cellules effectrices chez les lymphocytes T naïfs - Figures 5.7 et 5.9). Cela peut être lié au dépôt simultané sur ces deux surfaces des protéines du sérum qui interviennent dans l'activation, et ne peuvent se lier au gels. Nous avons l'intention d'effectuer un contrôle en mettant au point un gel de poly-acrylamide de la rigidité la plus haute possible (environ 100kPa). Mais si nous retrouvons les mêmes résultats, cela pourrait signifier que les techniques traditionnelles utilisées en laboratoire pour activer ces cellules sur substrats rigides ne représentent pas une réalité physiologique. Notamment, cela pourrait indiquer que le taux d'activation obtenu sur verre ou plastique, d'une rigidité de l'ordre de 10^9 Pa ne se rencontre pas *in vivo* dans le cadre d'une activation par les cellules présentatrices, dont les rigidités varient de 10^2 à 10^3 Pa. C'est une information d'une très grande importance pour l'immunologiste, car la pertinence des conditions d'étude classiques pourrait s'en trouver ébranlée.

L'expérience réalisée sur les lymphocytes T naïfs donne une information intéressante, bien qu'elle nécessite d'être reproduite. Non seulement le pourcentage de cellules exprimant les différents marqueurs est plus grand sur verre et plastique que sur gel, mais surtout, la présence d'ICAM1 induit une inhibition de la différenciation sur les gels les plus mous (Figure 5.9). Si ces résultats sont confirmés, cela permettrait de mettre en évidence le rôle de cette protéine et surtout de son ligand LFA1, appartenant à la famille des intégrines, mécano-transducteurs connus, dans la mécano-sensibilité de l'activation du lymphocyte T naïf.

Une expérience qui serait très intéressante à réaliser dans la continuité de ces études sur gels serait d'activer les lymphocytes T non plus par des gels sous forme de substrats plans, mais par des billes de gel, de rigidité variable, et de taille comparable à la taille des cellules présentatrices. Ceci permettrait de se rapprocher des contraintes géométriques que les cellules rencontrent *in vivo*. On peut imaginer aller encore plus loin en immergeant les lymphocytes T dans des matrices tri-dimensionnelles de rigidité contrôlée, dans lesquelles des billes de gel, également de rigidité contrôlée, recouvertes de molécules activatrices, pourraient aléatoirement être réparties, mimant ainsi l'environnement mécanique de cellules présentatrices dispersées dans un tissu ou dans la matrice extra-cellulaire.

En effet, on peut concevoir que la question telle que nous l'avons traitée dans cette thèse n'est pas la plus pertinente. Nous avons supposé que le lymphocyte T pouvait être sensible à la raideur globale de la cellule présentatrice avec laquelle il entre en interaction. Mais peut-être que les interactions cellulaires ne permettent pas au lymphocyte T de sentir la rigidité globale, par rapport à l'importance des agencements locaux des molécules au niveau de la membrane, et peut-être que dans ce cas les travaux de Jay Groves que nous avons mentionné au chapitre 1 (voir p.65) sont plus pertinents que des études sur gel. Au contraire, peut-être que la taille des cellules présentatrices est trop petite, et que les lymphocytes T sont plutôt sensibles à la rigidité de la matrice extra-cellulaire ou des tissus sous-jacents. Ainsi, une étude récente a montré que des cellules souches mésenchymateuses pouvaient être sensibles à la présence d'un substrat rigide sous-jacent dès $20\mu\text{m}$ de profondeur [Buxboim *et al.*, 2010], ce qui est de l'ordre de grandeur de la taille cellulaire des cellules présentatrices (de 7 à $17\mu\text{m}$ de diamètre).

Il est alors possible que les cellules T soient sensibles plutôt à la rigidité des tissus et de la matrice extra-cellulaire sous-jacents aux cellules présentatrices, et que les études sur substrats plans, bien qu'étant une première étape estimable, ne soient plus très pertinentes.

Un projet tel que celui imaginé plus haut, où les lymphocytes T seraient placés dans un environnement où à la fois la matrice extra-cellulaire et les billes de gel activateuses seraient de rigidité modulable, si ambitieux soit-il, pourrait apporter beaucoup de réponses à ces questions autour de la mécano-sensibilité du lymphocyte T lors de l'activation.

Conclusion

L'idée que la physique, et plus particulièrement la mécanique, puisse être un facteur important dans la transmission des informations biologiques commence à s'infiltrer dans toutes les sous-disciplines de la biologie, et de nombreuses études visent à intégrer ces facteurs dans des phénomènes variés : morphogénèse et développement, oncologie, neurologie, etc. Cette thèse s'inscrit dans cette démarche, puisqu'elle l'applique à l'immunologie : elle vise à déchiffrer les stimuli mécaniques, et leur rôle, lors de l'activation du lymphocyte T.

Dans la première partie de ce manuscrit, après avoir restitué le contexte scientifique en immunologie et en biomécanique cellulaire, nous avons détaillé les indices nous amenant à supposer l'existence d'une mécano-sensibilité du lymphocyte T lors de son activation. Nous avons vu que la formation de la synapse immune dépend fortement des protéines du cytosquelette, que la cellule T est capable d'appliquer des forces qui dépendent du signal d'activation, et de la rigidité de la cible, et que le TCR lui-même est mécano-sensible. Nous avons aussi vu que l'inflammation, processus intervenant dans de nombreuses réponses immunitaires, est susceptible d'engendrer des modifications de propriétés mécaniques de cellules immunes.

Plus qu'à comprendre les mécanismes moléculaires et biochimiques sous-jacents à cette mécano-sensibilité, nous avons cherché à rassembler des informations sur l'environnement mécanique du lymphocyte T lors de l'activation, et plus particulièrement sur la rigidité des cellules avec lesquelles se forment la synapse immune : les cellules présentatrices d'antigène myéloïdes. Pour cela, nous avons mis en oeuvre des mesures de rigidité de cellules présentatrices d'antigène de la lignée monocyttaire (monocytes, cellules dendritiques et macrophages), grâce à un rhéomètre à cellule unique mis au point précédemment au laboratoire. Ce dispositif permet de mesurer les propriétés mécaniques cellulaires à l'échelle de la cellule entière, donc d'en estimer la rigidité globale.

Nous avons alors découvert que si monocytes et cellules dendritiques présentent des propriétés mécaniques similaires, les macrophages apparaissent plus rigides (chapitre 2). Cette rigidité accrue des macrophages ne s'accompagne pas, comme on pourrait l'attendre, de capacités de traction cellulaire plus importantes : ces cellules, au contraire, développent des forces très faibles en comparaison aux fibroblastes ou myoblastes que d'autres personnes de l'équipe ont pu tester auparavant. L'étude de la traction des macrophages, en particulier de l'influence de la forme de la sonde sur leur développement de force, nous a amené à supposer que la phagocytose repose plutôt sur une grande déformabilité locale de la membrane et du cytosquelette sous-jacent, sans impliquer de mise sous tension à l'échelle entière de la cellule. Etudier plus en détail comment

une très grande plasticité locale peut s'accorder avec une rigidité globale élevée, en particulier à travers le rôle des protéines ERM ou des protéines régulatrices de l'actine à échelle locale, pourrait permettre de comprendre cette contradiction apparente.

Nous avons ensuite cherché à mesurer les propriétés mécaniques des lymphocytes T eux-mêmes : si l'on veut pouvoir discuter de force et de déformation à la synapse, il nous faut avoir des informations sur les propriétés mécaniques des deux types cellulaires en interaction. Nous avons mis au point un protocole de mesure un peu différent, du fait de la très petite taille des lymphocytes T CD4⁺ primaires. Néanmoins, nous avons montré que ces cellules sont extrêmement molles, parmi les plus faibles raideurs mesurées sur des cellules uniques (chapitre 2). De façon intéressante, les cellules Jurkat, qui sont une lignée de laboratoire utilisée comme modèle pour l'étude du lymphocyte T primaire, présentent la même raideur, très basse. Ceci nous fournit une information importante : les cellules Jurkat sont un modèle valide pour l'étude biomécanique du lymphocyte T primaire humain. Une perspective intéressante ici serait d'effectuer ces mesures sur les lymphocytes B et les cellules NK, pour voir si cette rigidité très basse se retrouve à travers toute la lignée lymphoïde, ou si ces propriétés sont limitées aux lymphocytes T et relèvent donc plutôt de propriétés fonctionnelles.

Mais si cellules dendritiques et macrophages sont à même d'activer le lymphocyte T, elles sont toutefois susceptibles d'évoluer dans des environnements inflammatoires, sur des sites de lésions ou d'infections. Nous avons donc cherché à savoir si l'environnement inflammatoire pouvait modifier les propriétés mécaniques de ces cellules (chapitre 3). Nous avons étudié l'influence de trois facteurs inflammatoires : un cocktail de cytokines usuellement utilisé pour la maturation de cellules dendritiques qui leur confère des capacités de présentation antigénique accrues : TNF α +PGE₂ ; un facteur inflammatoire sécrété massivement par les lymphocytes T effecteurs et induisant l'activation des macrophages : IFN γ ; et enfin un facteur exogène, le LPS, qui est une molécule essentielle de la paroi des bactéries gram négatives. Ces mesures nous ont permis d'identifier que :

- TNF α +PGE₂ induit une baisse de la rigidité sur les deux types cellulaires, toutefois plus marquée sur les cellules dendritiques
- L'IFN γ induit une augmentation de la rigidité équivalente sur les cellules dendritiques et les macrophages
- le LPS n'a qu'un effet mitigé, seulement significatif sur la dissipation des cellules dendritiques

Ces observations sur la rigidité des cellules se sont accompagnées simultanément d'une augmentation de la concentration de marqueurs de surface nécessaires pour la présentation antigénique. C'est donc une information supplémentaire que nous avons mise en évidence : si la concentration des marqueurs de surface augmente toujours suite à ces conditions inflammatoires, la rigidité, elle, peut diminuer, augmenter, ou rester inchangée. L'inflammation induit donc sur ces cellules des modifications mécaniques indépendamment des effets sur les marqueurs surfaciques, ce qui fait de la rigidité un marqueur supplémentaire d'inflammation.

A ce stade, nous pouvons noter que les cellules myéloïdes recouvrent une gamme de rigidité remarquablement étendue (de 200 à 1500 Pa) par rapport aux cellules mésenchymateuses, qui se concentrent autour de 500-600 Pa. On peut donc imaginer que cette

large gamme de rigidité peut avoir une persistance évolutive figurant un rôle fonctionnel important, par exemple sur les propriétés migratoires des cellules dendritiques et lymphocytes T. Cette idée d'un lien fonctionnel important est renforcée par le fait que nous effectuons ces mesures sur des cellules primaires issues de différents donneurs, pour lesquels nous retrouvons, à chaque expérience, des propriétés mécaniques cellulaires moyennes égales pour chaque type cellulaire étudié. Que sur des personnes différentes, nous ayons systématiquement des cellules dendritiques traitées au $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$ très molles, et des macrophages traités à l' $\text{IFN}\gamma$ très rigides, indique un taux de conservation évolutif très important. Il est très peu probable que cette conservation soit le fruit du hasard, et nous pensons plutôt qu'il s'agit là de la manifestation d'un trait fonctionnel fondamental. S'employer à mettre à jour ce rôle fonctionnel, que ce soit sur les fonctions migratoires ou la présentation antigénique est une orientation attrayante à donner à la suite de ces travaux.

Nous avons ensuite tenté d'apporter des informations complémentaires en terme de composition moléculaire du cortex de ces cellules (chapitre 4). Dans cette partie, nous avons vu qu'une activité de la myosine plus importante s'accompagnait en général d'une rigidité plus faible, et qu'inversement, une densité d'actine corticale plus importante était à mettre en relation avec une rigidité plus importante. Cependant, ces résultats sont loin d'être universels, et la conclusion majeure que nous pouvons en tirer est que d'un type cellulaire à l'autre (entre monocytes, macrophages et cellules dendritiques), les modalités moléculaires donnant lieu à la rigidité finale sont profondément diverses : une composition similaire en actine et en myosine peut donner lieu à des rigidités très différentes, alors qu'une composition très différente en actine et en myosine peut déboucher sur des rigidités comparables. Par ailleurs, les facteurs inflammatoires semblent peu jouer sur ces deux paramètres (sauf $\text{TNF}\alpha + \text{PGE}_2$ qui pourrait augmenter l'activité des myosines), qui restent relativement constants au sein d'un type cellulaire. Ceci indique deux choses. Premièrement, que l'actine et la myosine ne sont pas les seuls facteurs influençant la rigidité du cytosquelette, et que bien qu'une analyse par Western Blot de certaines protéines réticulantes et régulatrices de l'actine n'aient pas débouché sur des corrélations nettes, il faut poursuivre l'investigation pour mettre à jour ces modalités, par exemple par une étude transcriptomique exhaustive. Ensuite, que les programmes transcriptionnels mis en oeuvre pour conduire aux différents types cellulaires myéloïdes étudiés ici engendrent des modifications structurelles très profondes, qui restent ensuite stables malgré les traitements inflammatoires, et qui sont donc probablement en lien avec les propriétés fonctionnelles de ces cellules. Ici encore, des études sur les facultés migratoires de ces cellules, ou sur la phagocytose des macrophages, pourraient permettre de mettre à jour les implications fonctionnelles de ces rigidités dissemblables.

Pour finir, nous avons dédié la dernière partie de cette thèse à entamer l'étude des implications fonctionnelles de rigidités variées des cellules présentatrices d'antigène sur l'activation du lymphocyte T et la formation de la synapse. Nous avons mis au point un protocole pour la fabrication de gels de poly-acrylamide de rigidité très basse, qu'il est possible de fonctionnaliser par des anticorps activateurs du lymphocyte T (chapitre 5). Si les résultats concernant la mécano-sensibilité du lymphocytes T dans ces gammes de rigidité nécessitent d'être confirmés, ils nous permettent néanmoins d'envisager que

l'activation sur substrat en plastique ou en verre soit artificielle, dans la mesure où la culture des cellules sur des gels dont la rigidité est semblable à celles qu'ils rencontrent à travers les cellules présentatrices *in vivo* donne lieu à des signaux d'activation bien moindres. Il faut néanmoins reproduire et poursuivre ces expériences, et de nombreuses orientations sont envisageables. Par exemple, obtenir des images en temps réel de la formation de la synapse sur ces gels serait immédiatement réalisable, et apporterait probablement des informations complémentaires intéressantes. Pour continuer dans la même perspective, coupler ces gels à des bicouches lipidiques permettant la diffusion en deux dimensions des molécules de surface - essentielle pour la formation spatiale de la synapse - constituerait un système modèle encore plus proche de la réalité et permettrait une étude plus précise des phénomènes locaux de cette mécano-sensibilité. Enfin, en mettant au point des substrats en trois dimensions de rigidité semblable à la matrice extra-cellulaire, et contenant des inclusions recouvertes d'activateurs, de rigidités semblables aux cellules présentatrices, il serait possible de parvenir à déterminer les modalités et l'échelle de la mécano-sensibilité du lymphocyte T.

Dans l'ensemble, cette étude a permis de déterminer les propriétés mécaniques des cellules présentatrices d'antigène, de mettre à jour leur évolution suite à certains facteurs inflammatoires, et de souligner la grande complexité des modalités structurelles de ces rigidités. Nous avons ouvert la voie en situant la gamme de rigidité physiologique à laquelle le lymphocyte T est confronté lors de son activation par des cellules myéloïdes, et entamé l'étude du rôle de ces rigidités dans l'efficacité de l'activation lymphocytaire. Cela constitue un socle solide sur lequel, nous l'espérons, de nombreux travaux, qu'ils soient conduits par nos équipes ou par d'autres, pourront s'appuyer pour des investigations futures sur la mécano-sensibilité du lymphocyte T.

ANNEXE A

Calibration des lamelles

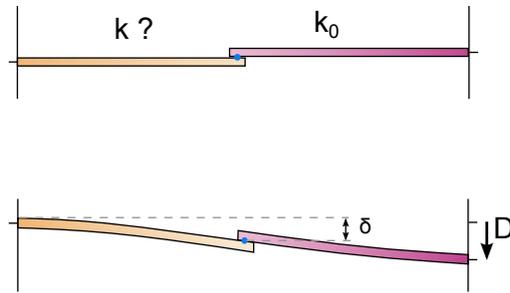


FIGURE A.1 – Calibration des lamelles.

La calibration des lamelles s'effectue contre une lamelle de référence, de module de flexion connu k_0 . Celles-ci sont placées l'une contre l'autre comme montré sur la Figure A.1. Un déplacement contrôlé D est appliqué à la lamelle de référence, et le déplacement du point de contact δ est mesuré. En écrivant l'équilibre des forces au point de contact, on a :

$$F(t) = k\delta(t) = k_0(D - \delta)$$

d'où

$$k = k_0 \left(\frac{D}{\delta} - 1 \right) = k_0 (\alpha - 1) \quad (\text{A.1})$$

En relevant un certain nombre de couples (D_i, δ_i) et en traçant D en fonction de δ on peut isoler la pente de la courbe $\alpha = D/\delta$ et ainsi obtenir k . La lamelle de référence, quant à elle, a été calibrée en mesurant directement le déplacement δ induit par des poids de masse connue déposés à son extrémité. En pratique, la lamelle de référence utilisée a en fait été calibrée contre cette première lamelle. L'exécution de cette expérience est très délicate, et nous voulions éviter de la briser lors des calibrations multiples.

ANNEXE B

Analyse mécanique dynamique

B.1 Principe

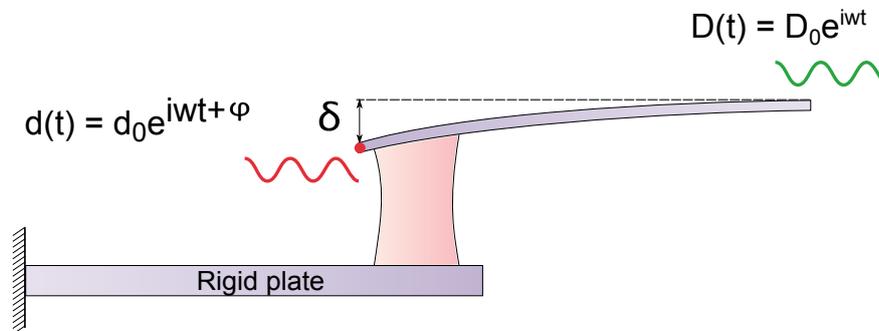


FIGURE B.1 – Analyse Mécanique Dynamique

Le dispositif à microplaques nous permet d'imposer un déplacement $D(t)$ à la base de la lamelle souple et d'enregistrer le déplacement au niveau de la cellule $d(t)$. Il nous faut donc, à partir de ces deux mesures, estimer la contrainte σ appliquée à la cellule et la déformation ε qu'elle subit.

La contrainte peut être très facilement définie : il s'agit de la force appliquée par la lamelle souple divisée par l'aire de contact : $\sigma = F/S$. La surface de contact S est estimée à partir du rayon apparent de contact entre cellule et lamelle. La force, quand à elle, est donnée par le module de flexion k et la déflexion $\delta(t)$ de la lamelle à un instant t donné :

$$F = k\delta = k(D(t) - d(t))$$

ce qui donne pour expression de la contrainte σ :

$$\sigma(t) = \frac{k(D(t) - d(t))}{S}$$

Or la déformation imposée $D(t)$ ainsi que celle enregistrée $d(t)$ sont sinusoïdales, et peuvent s'écrire sous forme complexe :

$$\begin{cases} D(t) = D_0 e^{i\omega t} \\ d(t) = d_0 e^{i\omega t + \varphi} \end{cases}$$

où φ désigne le déphasage entre les deux signaux de pulsation ω . On obtient alors pour expression de $\sigma(t)$:

$$\sigma(t) = \frac{k}{S} e^{i\omega t} (D_0 - d_0 e^{i\varphi})$$

En ce qui concerne la déformation instantanée $\varepsilon(t) = \frac{|L(t)-L_0|}{L_0}$, elle s'exprime simplement par la position de la lamelle $d(t)$ divisée par le diamètre initial de la cellule L_0 , déterminé à partir des images de microscopie :

$$\varepsilon(t) = \frac{d(t)}{L_0} = \frac{d_0 e^{i\omega t + \varphi}}{L_0}$$

Le module visco-élastique complexe est défini par la contrainte à l'instant t divisée par la déformation au même instant t :

$$G^*(t) = \frac{\sigma(t)}{\varepsilon(t)} = \frac{kL_0}{S} \left(\frac{D_0}{d_0} e^{-i\varphi} - 1 \right)$$

Les modules de reprise élastique G' et de perte G'' sont définis comme la partie réelle et imaginaire du module visco-élastique complexe, respectivement ; ce qui conduit à leur expression :

$$\begin{cases} G' = \frac{kL_0}{S} \left(\frac{D_0}{d_0} \cos \varphi - 1 \right) \\ G'' = \frac{kL_0}{S} \left(-\frac{D_0}{d_0} \sin \varphi \right) \end{cases} \quad (\text{B.1})$$

Nous pouvons donc obtenir G' et G'' pourvu que l'on aie accès à k , L_0 , S , D_0 , d_0 et φ . Nous allons maintenant voir comment ces grandeurs sont extraites des expériences.

B.2 Implémentation

B.2.1 Etalonnage du capteur

Le capteur optique que nous utilisons pour détecter la position de la pointe de la lamelle souple $d(t)$ détecte en fait des zones lumineuses sur une image de microscopie. Par conséquent, le signal qu'il renvoie, en volts, dépend de la configuration de l'image : position de la lamelle, focus, luminosité, etc. Il convient donc, avant chaque expérience, d'étalonner ce capteur, c'est à dire d'établir la courbe qui pour tout signal en volts donne la position en μm . Pour ce faire, nous balayons la zone sensible avec les lamelles à vide (qui sont commandées par des manipulateurs piezo-électriques) et enregistrons simultanément le déplacement imposé $D(t)$ et le signal donné par le capteur $s(t)$. Dans la zone linéaire du capteur, au centre de laquelle nous prenons soin de nous placer, le signal du capteur et le déplacement sont proportionnels :

$$s(t) = aD(t)$$

Ce qui permet d'obtenir directement la valeur de $D(t)$ en μm (Figure B.2).

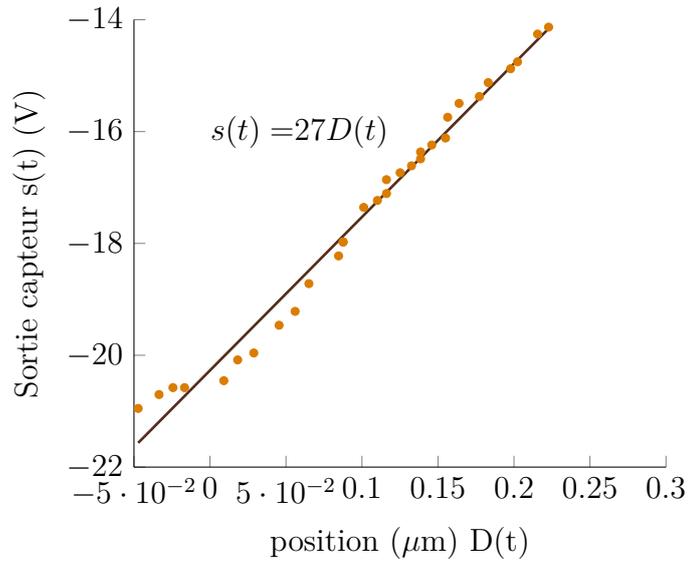


FIGURE B.2 – Etalonnage du capteur optique

B.2.2 Extraction de données à partir des images

Comme nous l'avons mentionné plus haut, nous avons besoin de deux informations tirées des images en microscopie de l'expérience. La première est la longueur initiale L_0 de la cellule, elle est directement mesurée sur les images¹ (Figure B.3). La deuxième information dont nous avons besoin est la surface de contact de la cellule. Pour cela, nous mesurons les deux diamètres apparents de la cellule d_1 et d_2 (Figure B.3). En supposant une géométrie axi-symétrique, la surface de contact est estimée comme la moyenne des deux surfaces résultantes ($S_i = \pi d_i^2/4$).

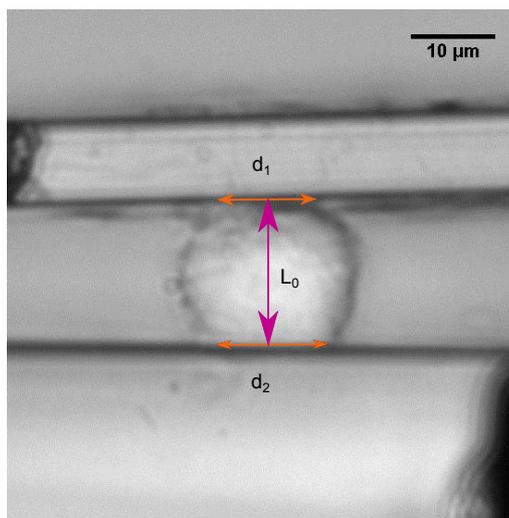


FIGURE B.3 – Extraction de paramètres géométriques de la cellule

1. Sur notre appareil, 1 pixel équivaut à $0.109 \mu\text{m}$

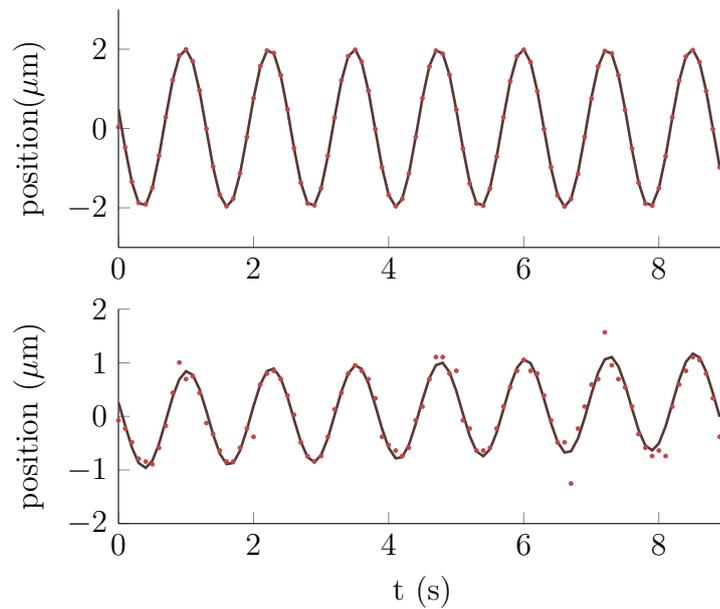


FIGURE B.4 – Extraction des amplitudes et de la différence de phase pour les signaux d’entrée $D(t)$ (haut) et de sortie $d(t)$ (bas).

B.2.3 Analyse des signaux sinusoïdaux

Les dernières informations dont nous avons besoin dans l’équation B.1 sont les amplitudes et la différence de phase des deux signaux sinusoïdaux. Ceux-ci sont extraits en utilisant un simple fit, comme le montre la Figure B.4. Les fits permettent d’obtenir les amplitudes D_0 et d_0 et les phases φ_D et φ_d de chaque signal. La différence de phase étant ensuite calculée directement : $\varphi = \varphi_s - \varphi_D$

Toutes ces étapes ont été implémentées dans le logiciel MATLAB, sauf celle d’extraction des données géométriques.

ANNEXE C

Densité d'actine corticale et volume cellulaire

C.1 Densité d'actine corticale

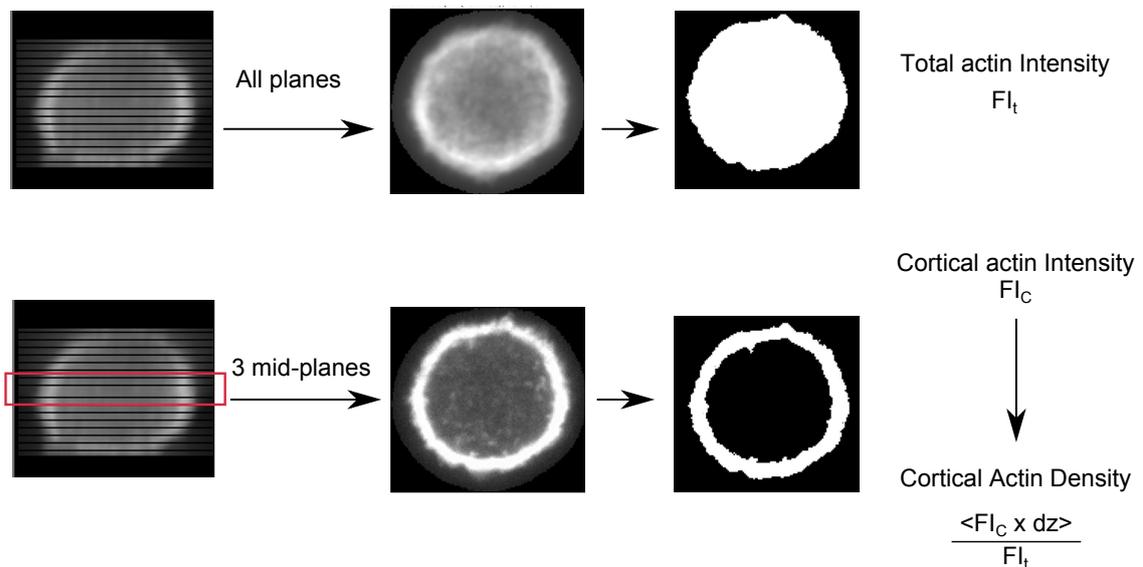


FIGURE C.1 – Mesure de la densité d'actine corticale par microscopie confocale

Des images de chaque cellule, plus ou moins étalée, ont été prises à différentes positions selon l'axe z de sorte à couvrir la totalité de la cellule. Pour chacun de ces plans, un masque délimitant la surface de la cellule a été appliqué, et l'intensité totale d'actine a été extraite (total Fluorescence Intensity FI_t).

Ensuite, trois plans médiaux ont été sélectionnés pour évaluer la densité d'actine corticale. Sur ces trois plans, cette fois le masque ne délimite que la zone périphérique où l'intensité est la plus forte (Figure C.1). L'intensité moyenne sur cette couronne a été mesurée : elle représente la densité d'actine pour le plan sélectionné. En multipliant cette intensité d'actine locale par la surface du masque et l'intervalle entre deux plans ($dz = 0.3\text{mm}$), on obtient l'intensité d'actine locale par unité de volume. La moyenne des trois plans sélectionnés a été effectuée pour obtenir une mesure de la densité d'actine corticale moyenne pour chaque cellule.

L'intensité finale dépend de tout un tas de facteurs. La plus grande source de variation provient de la qualité du marquage : pour chaque donneur ayant fourni des cellules, le même protocole de marquage a été appliqué, le même jour, sur les différents types cellulaires dérivés à partir de la même poche de sang. Cependant, d'une poche à l'autre, d'une semaine à l'autre, on peut observer des variations d'intensité lumineuse de plusieurs ordres de grandeur. Les réglages de microscopie ont quant à eux été gardés semblables d'une lame à l'autre, au sein d'une série de mesures données, c'est à dire pour chaque donneur. Aussi, les résultats obtenus ainsi semaine après semaine ne sont pas nécessairement comparables. M. Saïtakis a donc décidé, avant de me transmettre les résultats, de les normaliser par la médiane de leurs valeurs. Pour un donneur donné, une fois que les mesures ont été prises sur tous les types cellulaires que ce donneur a fourni (en général DC, MPH, et traitements inflammatoires), la médiane de toutes les valeurs a été prise pour normaliser les données. Cela permet de ramener les ordres de grandeur à des valeurs comparables, tout en gardant les variations que l'on cherche à identifier d'une population cellulaire à une autre, d'une condition inflammatoire à une autre.

C.2 Volume cellulaire

Le volume cellulaire, quant à lui, a directement été obtenu en mesurant, pour chaque plan imagé, l'aire de la cellule, et en multipliant par l'espacement entre chaque tranches :

$$V_{cell} = \sum A_i dz \tag{C.1}$$

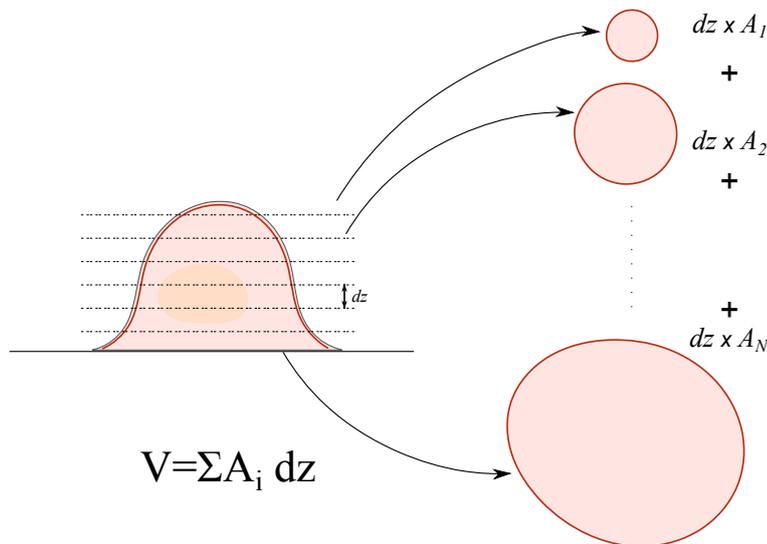


FIGURE C.2 – Mesure du volume cellulaire

ANNEXE D

Protocole de fabrication des gels de polyacrylamide

Matériel et équipement

- Solution d'acrylamide¹ à 30% en masse
- Solution de N,N-Méthylènebisacrylamide (Bis-Acrylamide)² à 2% en masse
- Streptavidin-acrylamide³
- PBS
- Ammonium Persulfate⁴ (APS)
- N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine⁵ (TEMED)
- Ethanol
- Acide acétique pur
- 3-(Triméthoxysilyl)propyl méthacrylate⁶(acrylate)
- Acide Sulfurique
- Eau oxygénée (pure)
- Dessiccateur
- Argon ou azote liquide
- Lampe à UV
- Lamelles de microscopies

Nous utilisons des lamelles carrées 22 × 22mm pour les lamelles du dessus, et des lamelles rondes de diamètre 20mm sur lesquelles le gel est polymérisé

- aiguille très fine
 - Chambre à argon ou azote
- Nous utilisons un dessiccateur, mais n'importe quel objet fermé avec entrée et sortie de flux convient.*

Nettoyage des lamelles

Cette partie peut-être effectuée la veille

1. Passer toutes les lamelles aux ultrasons pendant 5mn

-
1. Sigma-Aldrich, A3553
 2. Sigma-Aldrich, M7279
 3. Life Technologies, S-21379
 4. Sigma-Aldrich, A3678
 5. Sigma-Aldrich, T9281
 6. Sigma-Aldrich, M6514

2. Rincer les lamelles à l'éthanol, les sécher au pistolet à air et les déposer sur une plaque
3. Passer les lamelles au plasma oxygène pendant 2mn
4. Déposer les lamelles dans des boîtes de pétri

Préparation des gels

1. Préparer les solutions d'acrylamide+bis-acrylamide+streptavidin-acrylamide aux concentrations désirées. Ici :

Gel #	#1 (190 Pa)	#2 (420 Pa)	#3 (1150 Pa)	#4 (6400 Pa)
[Acr] _f (w/w)	3%	3%	3%	5%
[Bis] _f (w/w)	0.06%	0.1%	0.4%	0.5%
Strepta-Acr (µg/mL)	250	250	250	400

Ici, il est primordial de garder un ratio streptavidin-acrylamide/acrylamide au dessus d'un certain seuil (rapport molaire 1/100000). En dessous de ce seuil, la densité de molécules de streptavidine à la surface ne sera pas suffisante pour permettre un dépôt suffisamment dense en anticorps à la surface des gels

2. Dégazer les solutions (attendre la disparition complète des bulles - 30mn à environ 1mbar suffisaient en général dans nos conditions)
Cette étape est essentielle pour permettre une bonne polymérisation du gel. Le dioxygène entre en compétition avec les radicaux libres que libèreront l'APS et le TEMED, permettant la polymérisation des chaînes d'acrylamide. A des concentrations élevées d'acrylamide et de bis acrylamide, il n'est pas essentiel de dégazer. Mais aux concentrations très basses, cela permet un meilleur contrôle des propriétés mécaniques finales du gel. Il est aussi primordial de surveiller le dégazage pour empêcher une ébullition trop forte : cela peut changer le volume final de la solution, et donc modifier les concentrations d'APS et de TEMED, ayant également une grande influence sur la rigidité finale du gel.

Fonctionnalisation des lamelles

Pendant que les solutions mélangées d'acrylamide-bisacrylamide sont en train de dégazer, fonctionnaliser les lamelles pour permettre l'attachement du gel au verre. Pour cela :

1. Préparer une solution de 1% acrylate, 10% acide acétique dans de l'éthanol
2. Déposer au moins $0.6\mu\text{L}/\mu\text{m}^2$ de cette solution par lamelle environ 5mn
c'est à dire 200µL pour des lamelles rondes de 20mm de diamètre
3. Rincer les lamelles à l'éthanol et les sécher au pistolet à air.

Polymérisation

C'est l'étape de fabrication du gel proprement dite. S'il est impossible de la réaliser dans une atmosphère contrôlée (avec un dispositif de type glove-bag), il est important de l'exécuter le plus vite possible, pour limiter le temps d'exposition des gels au dioxygène.

1. Préparer une solution d'APS à 10% en masse
L'APS est également très instable à l'air libre, aussi cette solution doit absolument être fraîche. Il est néanmoins possible d'en préparer des alicots, dans la mesure où ceux-ci seront décongelés au dernier moment
2. Retirer les solutions d'acrylamide-bisacrylamide du dessiccateur avec précaution
Ici attention : tout mouvement de la surface du liquide favorisera la pénétration de dioxygène dans la solution
3. Ajouter l'APS à une concentration de 0.05%
4. Rapidement ajouter le TEMED à 0.05% de la solution finale
APS et TEMED ont pour rôle de libérer les radicaux libres nécessaires à la réticulation des chaînes de poly-acrylamide. Plus précisément, le TEMED accélère le taux de formation de radicaux libres par l'APS, ce qui en retour catalyse la réaction de polymérisation.
5. Déposer 30 μ L de solution sur les lamelles fonctionnalisées (25 μ L suffisent pour les gels les plus rigides)
6. Recouvrir le plus rapidement possible d'une lamelle carrée 22 \times 22mm
Ici encore, plus la goutte est exposée à l'air, moins la polymérisation sera contrôlée.
7. Placer le sandwich lamelle ronde+gel+lamelle carrée dans un contenant approprié et le placer dans une atmosphère contrôlée (sous flux d'azote ou d'argon, par exemple)
8. Recommencer les deux étapes précédentes pour autant de lamelles que nécessaire
9. Laisser polymériser pendant 2 heures.

Démoulage

C'est l'étape qui demande le plus de dextérité, et c'est aussi celle qui entraîne le plus de casse. Assurez-vous de prévoir des lamelles recouvertes de gel en excès par rapport aux besoins de votre expérience, et armez-vous de patience !

1. Récupérer les sandwichs lamelles+gel+lamelle de la chambre à argon
2. Remplir un grand cristalliseur d'eau distillée
3. Immerger le sandwich d'une main, et avec une aiguille très fine, décollez légèrement la lamelle carrée, et laisser patiemment l'eau s'infiltrer.
Les lamelles carrées passées au plasma sont hydrophiles, tout comme la surface du gel. Effectuer cette manipulation dans l'eau permet d'utiliser le liquide pour détacher la lamelle carrée du gel, sans détériorer la surface. Ne forcez pas, attendez simplement que l'eau s'infilte suffisamment pour que la lamelle se détache d'elle-même.

4. Déposer la lamelle ronde recouverte de gel dans une petite boîte de pétri remplie de PBS. Les gels peuvent se garder ainsi pendant quelques jours, avant de procéder au dépôt des anticorps biotinylés.
5. Stériliser les gels en les exposant aux UV pendant 15 mn
Nous utilisons une lampe UV portable, mais les lampes de hottes de culture peuvent suffire.

Note : A partir d'ici, toutes les étapes doivent-êtré effectuées en conditions stériles.

Dépôt des anticorps

Cette étape est comparable à n'importe quelle étape de coating sur lamelle de verre. Il faut seulement s'assurer que la protéine d'intérêt est biotinylée, faute de quoi elle ne risquera pas de se lier au gel.

1. Rincer abondamment chaque gel, au moins trois fois dans du PBS
Ceci permet d'éliminer toute trace de monomères d'acrylamide, très toxiques pour les cellules
2. Préparer les solutions d'anticorps ou molécules d'intérêt (biotinylées) aux concentrations voulues
Ici, 10µg/mL pour les anticorps et 2µg/mL pour ICAM1
3. Déposer les solutions sur les gels
Ici, il est préférable de placer les gels dans des petites boîtes de pétri (deux lamelles par boîte), et de les inonder avec 500µL à 1mL de solution, pour garantir un dépôt uniforme et prévenir que cela ne sèche
4. Laisser toute une nuit à 4°C
5. Rincer abondamment, en PBS, avant de déposer les cellules

Liste des symboles

α	Exposant de la loi de puissance
ω	pulsation
$\overline{G''}$	Module de perte
$\overline{G'}$	Module de reprise élastique
$\overline{G_0}$	Module effectif
σ	Contrainte
ε	Taux de déformation
φ	Déphasage
f	fréquence
k	module de flexion des microplaques
AFM	Microscopie à Force Atomique
BCR	B Cell Receptor : récepteur du lymphocyte B
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
cSMAC, dSMAC, pSMAC	Centre d'activation Supramoléculaire central, distal, périphérique
E	Module d'Young
ERM	Ezrine-Radixine-Moesine
IFN γ	Interféron γ
LPS	Lipopolysaccharide
PGE ₂	Prostaglandine E2
TCR	T Cell Receptor : récepteur du lymphocyte T
TNF α	Facteur de Nécrose Tumorale α

Index

- Actine, 36, 63, 160, 162
Adhésion cellulaire, 33, 54
Adhésions focales, 43, 62
AFM, 47, 190
Anticorps, 10, 12, 18
Antigène, 10, 20
- Blebbistatine, 149, 150, 154, 160
- CD3, 21, 22, 69
CD43, 65, 70
Cellule CD4⁺, 100, 101
Cellule Dendritique, 18–20, 93, 115, 126, 133
Cellule Jurkat, 100, 102, 104
Cellules Présentatrices d'Antigène, 13, 15, 16, 20, 28
Chimiokine, 11
Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), 20, 21
Cortex d'acto-myosine, 36
cSMAC, pSMAC, dSMAC, 21, 23, 63
Cytokine, 11, 13, 14
Cytosquelette, 25, 38, 41, 56, 63, 147
Cytotoxicité, 10
- Dispositif à microplaques, 48, 54, 85
Déformation, 32
- Etireur optique, 47, 95
Exposant α , 89
- Facteur de nécrose Tumorale α (TNF α), 13, 115, 118, 121, 128, 139
Fibres de stress, 52
Filaments intermédiaires, 41
Fluage, 48
- Hématopoïèse, 16, 17
- Immunité adaptative, 9, 10, 15
Immunité innée, 9
Inflammation, 11, 14, 73
Interféron γ , 13, 17, 123, 126, 127, 131, 132, 136, 139
Interleukine 2 (IL-2), 27
Intégrine, 26, 43
- LFA1, 24, 26, 63, 115
- Lipopolysaccharide (LPS), 15, 17, 132, 133, 136, 139
Loi de Laplace, 35, 166
Loi de puissance, 48, 50, 87
Lymphocyte B, 18, 20
Lymphocyte T, 15–17, 26–30, 58, 67, 100, 184
Lymphocyte Th, 29, 30, 184
- Macrophage, 13, 14, 17, 20, 93, 118, 123, 132, 137
Membrane plasmique, 35
Micropilliers, 52
Micropipette, 46
Microtubules, 41
Module d'Young, 33, 45, 89, 102
Module de flexion, 86
Module de perte, 50, 87
Module de reprise élastique, 50, 87
Module effectif, 88
Module visco-élastique complexe, 50
Monocyte, 16, 20, 93
Myosine, 38, 147, 149, 155, 158
Mécanosensibilité, 43, 51, 52, 54, 58
Mécanotransduction, 60
- Neutrophiles, 75
- Occurrence cumulée, 93
Opsonisation, 11
- PDMS, 54
Phagocytose, 9, 10, 107, 131
Pincés magnétiques, 47
Pincés optiques, 46
Poly-acrylamide, 52, 70, 177, 178
Power Stroke, 39
Pression osmotique, 34, 35
Prostaglandine E2, 13
Protéines ERM, 44, 66
Protéines organisatrices de l'actine, 36
- Raideur, 32
Rhéologie, 44, 179
- Synapse Immune, 21–23, 25–28, 63
- TCR, 20–22, 24, 62, 65, 69, 184
- Viscoélasticité, 33

Bibliographie

- Abbas, Abul K, Murphy, Kenneth M, & Sher, Alan. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, **383**(6603), 787–793.
- Abercrombie, M, & Dunn, G a. 1975. Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy. *Experimental cell research*, **92**(1), 57–62.
- Aderem, Alan, & Underhill, David M. 1999. Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages. *Annual Review of Immunology*, **17**(1), 593–623.
- Akimoto, S., Mitsumata, M., Sasaguri, T., & Yoshida, Y. 2000. Laminar Shear Stress Inhibits Vascular Endothelial Cell Proliferation by Inducing Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21Sdi1/Cip1/Waf1. *Circulation Research*, **86**(2), 185–190.
- Al-Alwan, M. M., Rowden, G., Lee, T. D. G., & West, K. a. 2001. Cutting Edge : The Dendritic Cell Cytoskeleton Is Critical for the Formation of the Immunological Synapse. *The Journal of Immunology*, **166**(3), 1452–1456.
- Alcaraz, Jordi, Buscemi, Lara, Grabulosa, Mireia, Trepas, Xavier, Fabry, Ben, Farré, Ramon, & Navajas, Daniel. 2003. Microrheology of human lung epithelial cells measured by atomic force microscopy. *Biophysical journal*, **84**(3), 2071–9.
- Alexis, Neil E, Lay, John C, Almond, Martha, Bromberg, Philip a, Patel, Dhavalkumar D, & Peden, David B. 2005. Acute LPS inhalation in healthy volunteers induces dendritic cell maturation in vivo. *The Journal of allergy and clinical immunology*, **115**(2), 345–50.
- Allen, Paul M. 2007. Making antigen presentable. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **179**(1), 3–4.
- Altmann, D M, Hogg, N, Trowsdale, J, & Wilkinson, D. 1989. Cotransfection of ICAM-1 and HLA-DR reconstitutes human antigen-presenting cell function in mouse L cells. *Nature*, **338**(6215), 512–4.
- Ancuta, P, Weiss, L, & Haeflner-Cavaillon, N. 2000. CD14+CD16++ cells derived in vitro from peripheral blood monocytes exhibit phenotypic and functional dendritic cell-like characteristics. *European journal of immunology*, **30**(7), 1872–83.
- Andreesen, R, & Kreutz, M. 1994. Differentiation of Human Monocytes In Vitro : A Model of Macrophage Ontogeny. *Pages 9–27 of : Fusenig, N E, & Graf, H (eds), Cell Culture in Pharmaceutical Research SE - 2. Ernst Schering Research Foundation Workshop, vol. 11. Springer Berlin Heidelberg.*
- Ashkin, A., Dziedzic, J. M., Bjorkholm, J. E., & Chu, Steven. 1986. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics Letters*, **11**(5), 288.
- Ashkin, A, Dziedzic, J M, & Yamane, T. 1987. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature*, **330**(6150), 769–771.
- Babbitt, Bruce P, Allen, Paul M, Matsueda, Gary, Haber, Edgar, & Unanue, Emil R. 1985. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature*, **317**(6035), 359–361.

- Balaban, N Q, Schwarz, U S, Riveline, D, Goichberg, P, Tzur, G, Sabanay, I, Mahalu, D, Safran, S, Bershadsky, A, Addadi, L, & Geiger, B. 2001. Force and focal adhesion assembly : a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nature cell biology*, **3**(5), 466–72.
- Balland, Martial, Richert, Alain, & Gallet, François. 2005. The dissipative contribution of myosin II in the cytoskeleton dynamics of myoblasts. *European biophysics journal : EBJ*, **34**(3), 255–61.
- Balland, Martial, Desprat, Nicolas, Icard, Delphine, Féréol, Sophie, Asnacios, Atef, Browaeys, Julien, Hénon, Sylvie, & Gallet, François. 2006. Power laws in microrheology experiments on living cells : Comparative analysis and modeling. *Physical Review E*, **74**(2), 1–17.
- Banchereau, J, & Steinman, R M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, **392**(6673), 245–52.
- Barakat, Abdul I, Lieu, Deborah K, & Gojova, Andrea. 2006. Secrets of the code : do vascular endothelial cells use ion channels to decipher complex flow signals? *Biomaterials*, **27**(5), 671–8.
- Bashour, Keenan T, Gondarenko, Alexander, Chen, Haoqian, Shen, Keyue, Liu, Xin, Huse, Morgan, Hone, James C, & Kam, Lance C. 2014. CD28 and CD3 have complementary roles in T-cell traction forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Jan.
- Bausch, a R, Möller, W, & Sackmann, E. 1999. Measurement of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers. *Biophysical journal*, **76**(1 Pt 1), 573–9.
- Bement, W M, Forscher, P, & Mooseker, M S. 1993. A novel cytoskeletal structure involved in purse string wound closure and cell polarity maintenance. *The Journal of cell biology*, **121**(3), 565–78.
- Blanchard, Nicolas, Decraene, Maud, Yang, Kun, Miro-Mur, Francesc, Amigorena, Sebastian, & HIVROZ, Claire. 2004. Strong and durable TCR clustering at the T/dendritic cell immune synapse is not required for NFAT activation and IFN-gamma production in human CD4+ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **173**(5), 3062–72.
- Borisy, Gary G, & Svitkina, T M. 2000. Actin machinery : pushing the envelope. *Current opinion in cell biology*, **12**(1), 104–12.
- Bretscher, Anthony, Edwards, Kevin, & Fehon, Richard G. 2002. ERM proteins and merlin : integrators at the cell cortex. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **3**(8), 586–599.
- Bunnell, Stephen C., Kapoor, Veena, Tribble, Ronald P., Zhang, Weiguo, & Samelson, Lawrence E. 2001. Dynamic Actin Polymerization Drives T Cell Receptor-Induced Spreading. *Immunity*, **14**(3), 315–329.
- Burkhardt, Janis K, Carrizosa, Esteban, & Shaffer, Meredith H. 2008. The actin cytoskeleton in T cell activation. *Annual review of immunology*, **26**(Jan.), 233–59.
- Burnette, Dylan T, Manley, Suliana, Sengupta, Prabuddha, Sougrat, Rachid, Davidson, Michael W, Kachar, Bechara, & Lippincott-Schwartz, Jennifer. 2011. A role for actin arcs in the leading-edge advance of migrating cells. *Nature cell biology*, **13**(4), 371–81.
- Buxboim, Amnon, Rajagopal, Karthikan, Brown, Andre' E X, & Discher, Dennis E. 2010. How deeply cells feel : methods for thin gels. *Journal of physics. Condensed matter : an Institute of Physics journal*, **22**(19), 194116.
- Cannon, G J, & Swanson, J a. 1992. The macrophage capacity for phagocytosis. *Journal of cell science*, **101** (Pt 4(Apr.)), 907–13.
- Cella, M, Sallusto, Federica, & Lanzavecchia, Antonio. 1997. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Current opinion in immunology*, **9**(1), 10–16.

BIBLIOGRAPHIE

- Champion, Julie a, & Mitragotri, Samir. 2006. Role of target geometry in phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**(13), 4930–4.
- Chang, Ya-Jen, Holtzman, Michael J, & Chen, Ching-Chow. 2002. Interferon-gamma-induced epithelial ICAM-1 expression and monocyte adhesion. Involvement of protein kinase C-dependent c-Src tyrosine kinase activation pathway. *The Journal of biological chemistry*, **277**(9), 7118–26.
- Chapman, E H, Kurec, a S, & Davey, F R. 1981. Cell volumes of normal and malignant mononuclear cells. *Journal of clinical pathology*, **34**(10), 1083–90.
- Chen, C S, Mrksich, M, Huang, S, Whitesides, G M, & Ingber, D E. 1997. Geometric control of cell life and death. *Science (New York, N.Y.)*, **276**(5317), 1425–8.
- Chowdhury, Farhan, Na, Sungsoo, Li, Dong, & Poh, YC. 2010. Cell material property dictates stress-induced spreading and differentiation in embryonic stem cells. *Nature materials*, **9**(1), 82–88.
- Clark, Andrew G, Dierkes, Kai, & Paluch, Ewa K. 2013. Monitoring actin cortex thickness in live cells. *Biophysical journal*, **105**(3), 570–80.
- Clark, E a, & Brugge, J S. 1995. Integrins and signal transduction pathways : the road taken. *Science (New York, N.Y.)*, **268**(5208), 233–9.
- Clark, Kristopher, Langeslag, Michiel, Figdor, Carl G, & van Leeuwen, Frank N. 2007. Myosin II and mechanotransduction : a balancing act. *Trends in cell biology*, **17**(4), 178–86.
- Clarke, Margaret, Engel, Ulrike, Giorgione, Jennifer, Müller-Taubenberger, Annette, Prassler, Jana, Veltman, Douwe, & Gerisch, Günther. 2010. Curvature recognition and force generation in phagocytosis. *BMC biology*, **8**(1), 154.
- Cossart, P. 2000. Actin-based motility of pathogens : the Arp2/3 complex is a central player. *Cellular microbiology*, **2**(3), 195–205.
- Cretel, E, Touchard, D, Benoliel, a M, Bongrand, P, & Pierres, a. 2010. Early contacts between T lymphocytes and activating surfaces. *Journal of physics. Condensed matter : an Institute of Physics journal*, **22**(19), 194107.
- Cross, Sarah E, Jin, Yu-Sheng, Rao, Jianyu, & Gimzewski, James K. 2007. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nature nanotechnology*, **2**(12), 780–3.
- Davis, Mark M, Boniface, J. Jay, Reich, Ziv, Lyons, Daniel, Hampl, Johannes, Arden, Bernhard, & Chien, Yueh-hsiu. 1998. Ligand Recognition By $\alpha\beta$ T Cell Receptors. *Annual Review of Immunology*, **16**(1), 523–544.
- Davis, SJ, & van der Merwe, P. Anton. 1996. The structure and ligand interactions of CD2 : implications for T-cell function. *Immunology today*, **17**(4), 177–187.
- Delneste, Yves, Charbonnier, Peggy, Herbault, Nathalie, Magistrelli, Giovanni, Caron, Gersende, Bonnefoy, Jean-Yves, & Jeannin, Pascale. 2003. Interferon-gamma switches monocyte differentiation from dendritic cells to macrophages. *Blood*, **101**(1), 143–50.
- Delon, J, Kaibuchi, K, & Germain, R N. 2001. Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity*, **15**(5), 691–701.
- Desprat, N., Guiroy, A., & Asnacios, Atef. 2006. Microplates-based rheometer for a single living cell. *Review of Scientific Instruments*, **77**(5), 055111.
- Desprat, Nicolas, Richert, Alain, Simeon, Jacqueline, & Asnacios, Atef. 2005. Creep function of a single living cell. *Biophysical journal*, **88**(3), 2224–33.

- Discher, Dennis E, Janmey, Paul, & Wang, Yu-Li. 2005. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science (New York, N.Y.)*, **310**(5751), 1139–43.
- Dustin, Michael L, Chakraborty, Arup K, & Shaw, Andrey S. 2010. Understanding the structure and function of the immunological synapse. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **2**(10), a002311.
- Eastwood, M, Mudera, V C, McGrouther, D A, & Brown, R A. 1998. Effect of precise mechanical loading on fibroblast populated collagen lattices : morphological changes. *Cell motility and the cytoskeleton*, **40**(1), 13–21.
- Ekpenyong, Andrew E, Whyte, Graeme, Chalut, Kevin, Pagliara, Stefano, Lautenschläger, Franziska, Fiddler, Christine, Paschke, Stephan, Keyser, Ulrich F, Chilvers, Edwin R, & Guck, Jochen. 2012. Viscoelastic properties of differentiating blood cells are fate- and function-dependent. *PloS one*, **7**(9), e45237.
- Ely PK Givan, AL Graziano, RF Guyre, PM Fanger, MW, P Wallace. 1996. Bispecific-armed, interferon gamma-primed macrophage-mediated phagocytosis of malignant non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, **87**(9), 3813–3821.
- Engler, Adam J, Griffin, Maureen a, Sen, Shamik, Bönnemann, Carsten G, Sweeney, H Lee, & Discher, Dennis E. 2004. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness : pathological implications for soft or stiff microenvironments. *The Journal of cell biology*, **166**(6), 877–87.
- Engler, Adam J, Sen, Shamik, Sweeney, H Lee, & Discher, Dennis E. 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, **126**(4), 677–89.
- Engler, Adam J, Carag-Krieger, Christine, Johnson, Colin P, Raab, Matthew, Tang, Hsin-Yao, Speicher, David W, Sanger, Joseph W, Sanger, Jean M, & Discher, Dennis E. 2008. Embryonic cardiomyocytes beat best on a matrix with heart-like elasticity : scar-like rigidity inhibits beating. *Journal of cell science*, **121**(Pt 22), 3794–802.
- Espinosa, Eric, & Chillet, Pascal. 2010. *Immunologie*.
- Esue, Osigwe, Harris, Elizabeth S, Higgs, Henry N, & Wirtz, Denis. 2008. The filamentous actin cross-linking/bundling activity of mammalian formins. *Journal of molecular biology*, **384**(2), 324–34.
- Esue, Osigwe, Tseng, Yiider, & Wirtz, Denis. 2009. Alpha-actinin and filamin cooperatively enhance the stiffness of actin filament networks. *PloS one*, **4**(2), e4411.
- Fabry, Ben, Maksym, Geoffrey, Butler, James, Glogauer, Michael, Navajas, Daniel, & Fredberg, Jeffrey J. 2001. Scaling the Microrheology of Living Cells. *Physical Review Letters*, **87**(14), 1–4.
- Fabry, Ben, Maksym, Geoffrey, Butler, James, Glogauer, Michael, Navajas, Daniel, Taback, Nathan, Millet, Emil, & Fredberg, Jeffrey J. 2003. Time scale and other invariants of integrative mechanical behavior in living cells. *Physical Review E*, **68**(4), 1–18.
- Faure, Sophie, Salazar-fontana, Laura Inés, Semichon, Monique, Tybulewicz, Victor L J, Bismuth, Georges, Trautmann, Alain, Germain, Ronald N, & Delon, Jérôme. 2004. ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell $\alpha\beta$ APC conjugation. **5**(3).
- Faure-André, Gabrielle, Vargas, Pablo, Yuseff, Maria-Isabel, Heuzé, Méline, Diaz, Jheimmy, Lankar, Danielle, Steri, Veronica, Manry, Jeremy, Hugues, Stéphanie, Vascotto, Fulvia, Boulanger, Jérôme, Raposo, Graça, Bono, Maria-Rosa, Roseblatt, Mario, Piel, Matthieu, & Lennon-Duménil, Ana-Maria. 2008. Regulation of dendritic cell migration by CD74, the MHC class II-associated invariant chain. *Science (New York, N.Y.)*, **322**(5908), 1705–10.
- Faust, Uta, Hampe, Nico, Rubner, Wolfgang, Kirchgessner, Norbert, Safran, Sam, Hoffmann, Bernd, & Merkel, Rudolf. 2011. Cyclic stress at mHz frequencies aligns fibroblasts in direction of zero strain. *PloS one*, **6**(12), e28963.

- Finco, Timothy S, Kadlec, Theresa, Zhang, Weiguo, Samelson, Lawrence E, & Weiss, Arthur. 1998. LAT Is Required for TCR-Mediated Activation of PLC γ 1 and the Ras Pathway. *Immunity*, **9**(5), 617–626.
- Fischer, Robert S, Myers, Kenneth a, Gardel, Margaret L, & Waterman, Clare M. 2012. Stiffness-controlled three-dimensional extracellular matrices for high-resolution imaging of cell behavior. *Nature protocols*, **7**(11), 2056–66.
- Fouchard, Jonathan. 2012. *Relation entre forme , tension et adhésion au cours de lâ€™étalement dâ€™une cellule animale*. Ph.D. thesis, Université Paris Diderot.
- Frausto-Del-Río, Dulce, Soto-Cruz, Isabel, Garay-Canales, Claudia, Ambriz, Xochitl, Soldevila, Gloria, Carretero-Ortega, Jorge, Vázquez-Prado, José, & Ortega, Enrique. 2012. Interferon gamma induces actin polymerization, Rac1 activation and down regulates phagocytosis in human monocytic cells. *Cytokine*, **57**(1), 158–68.
- Garcia-Cardena, G, Comander, J, Anderson, K R, Blackman, B R, & Gimbrone, M a. 2001. Biomechanical activation of vascular endothelium as a determinant of its functional phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**(8), 4478–85.
- Gauthier, Nils C, Antoine, Marc, Roca-cusachs, Pere, & Sheetz, Michael P. 2011. Temporary increase in plasma membrane tension coordinates the activation of exocytosis and contraction during cell spreading. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**(35), 14467–14472.
- Geissmann, Frederic, Manz, MG, & Jung, Steffen. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, **327**(5966), 656–661.
- Georges, Penelope C, & Janmey, Paul A. 2005. Cell type-specific response to growth on soft materials. 1547–1553.
- Goldman, R D, Khuon, S, Chou, Y H, Opal, P, & Steinert, P M. 1996. The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *The Journal of cell biology*, **134**(4), 971–83.
- Goode, Bruce L, & Eck, Michael J. 2007. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annual review of biochemistry*, **76**(Jan.), 593–627.
- Grakoui, A, Bromley, S K, Sumen, C, Davis, M M, Shaw, A S, Allen, P M, & Dustin, M L. 1999. The Immunological Synapse : A Molecular Machine Controlling T Cell Activation. *Science*, **285**(5425), 221–227.
- Granucci, F, Ferrero, E, Foti, M, Aggujaro, D, Vettoretto, K, & Ricciardi-Castagnoli, P. 1999. Early events in dendritic cell maturation induced by LPS. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, **1**(13), 1079–84.
- Grevesse, Thomas, Versaavel, Marie, Circelli, Géraldine, Desprez, Sylvain, & Gabriele, Sylvain. 2013. A simple route to functionalize polyacrylamide hydrogels for the independent tuning of mechano-transduction cues. *Lab on a chip*, **13**(5), 777–80.
- Guck, J, Ananthakrishnan, R, Mahmood, H, Moon, T J, Cunningham, C C, & Käs, J. 2001. The optical stretcher : a novel laser tool to micromanipulate cells. *Biophysical journal*, **81**(2), 767–84.
- Guermonprez, Pierre, Valladeau, Jenny, Zitvogel, Laurence, Théry, Clotilde, & Amigorena, Sebastian. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual review of immunology*, **20**(Jan.), 621–67.
- Guo, Wei-hui, Frey, Margo T, Burnham, Nancy a, & Wang, Yu-li. 2006. Substrate rigidity regulates the formation and maintenance of tissues. *Biophysical journal*, **90**(6), 2213–20.

- Hammer, John a, & Burkhardt, Janis K. 2013. Controversy and consensus regarding myosin II function at the immunological synapse. *Current opinion in immunology*, **25**(3), 300–306.
- Harris, AK, Stopak, D, & Wild, P. 1981. Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis.
- Helm, Birgit A, Sayers, Ian, Higginbottom, Adrian, Machado, Denise Cantarelli, Ling, Yan, Ahmad, Khalid, Padlan, Eduardo A, & Wilson, A Penelope M. 1996. Identification of the High Affinity Receptor Binding Region in Human Immunoglobulin Identification of the High Affinity Receptor Binding Region in Human Immunoglobulin E. *Journal of Biological Chemistry*, **271**(13), 7494–7500.
- Helmke, B P, Thakker, D B, Goldman, R D, & Davies, P F. 2001. Spatiotemporal analysis of flow-induced intermediate filament displacement in living endothelial cells. *Biophysical journal*, **80**(1), 184–94.
- Henney, CS, & Bubbers, JE. 1973. Antigen-T lymphocyte interactions : inhibition by cytochalasin B. *The Journal of Immunology*, **111**, 85–90.
- Henon, S, Lenormand, Guillaume, Richert, Alain, & Gallet, F. 1999. A New Determination of the Shear Modulus of the Human Erythrocyte membrane using optical tweezers. *Biophysical journal*, **76**(February), 1145–1151.
- Herant, Marc, Heinrich, Volkmar, & Dembo, Micah. 2006. Mechanics of neutrophil phagocytosis : experiments and quantitative models. *Journal of cell science*, **119**(Pt 9), 1903–13.
- Hochmuth, R M. 2000. Micropipette aspiration of living cells. *Journal of biomechanics*, **33**(1), 15–22.
- Holmes, D L, & Stellwagen, N C. 1991. Estimation of polyacrylamide gel pore size from Ferguson plots of normal and anomalously migrating DNA fragments. I. Gels containing 3% N,N'-methylenebisacrylamide. *Electrophoresis*, **12**(4), 253–63.
- Holsinger, L J, Graef, I a, Swat, W, Chi, T, Bautista, D M, Davidson, L, Lewis, R S, Alt, F W, & Crabtree, G R. 1998. Defects in actin-cap formation in Vav-deficient mice implicate an actin requirement for lymphocyte signal transduction. *Current biology : CB*, **8**(10), 563–72.
- Hosseini, Babak H, Louban, Iliia, Djandji, Dominik, Wabnitz, Guido H, Deeg, Janosch, Bulbuc, Nadja, Samstag, Yvonne, Gunzer, Matthias, Spatz, Joachim P, & Hämmerling, Günter J. 2009. Immune synapse formation determines interaction forces between T cells and antigen-presenting cells measured by atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**(42), 17852–7.
- Hu, Yang, Hu, Xiaoyu, Boumsell, Laurence, & Ivashkiv, Lionel B. 2008. IFN-gamma and STAT1 arrest monocyte migration and modulate RAC/CDC42 pathways. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **180**(12), 8057–65.
- Huang, Jun, Brameshuber, Mario, Zeng, Xun, Xie, Jianming, Li, Qi-jing, Chien, Yueh-hsiu, Valitutti, Salvatore, & Davis, Mark M. 2013. A single peptide-major histocompatibility complex ligand triggers digital cytokine secretion in CD4(+) T cells. *Immunity*, **39**(5), 846–57.
- Hudspeth, A J. 1989. How the ear's works work. *Nature*, **341**(6241), 397–404.
- Huppa, Johannes B, & Davis, Mark M. 2003. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nature reviews. Immunology*, **3**(12), 973–83.
- Husson, Julien, Chemin, Karine, Bohineust, Armelle, Hivroz, Claire, & Henry, Nelly. 2011. Force Generation upon T Cell Receptor Engagement. *PloS one*, **6**(5), e19680.
- Ilani, Tal, Vasiliver-Shamis, Gaia, Vardhana, Santosh, Bretscher, Anthony, & Dustin, Michael L. 2009. T cell antigen receptor signaling and immunological synapse stability require myosin IIA. *Nature immunology*, **10**(5), 531–9.

- Imboden, JB, & Stobo, JD. 1985. Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor. Perturbation of the T3-antigen receptor complex generates inositol phosphates and releases calcium ions. *The Journal of experimental medicine*, **161**(March), 446–456.
- Ingber, D E. 1993. Cellular tensegrity : defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *Journal of cell science*, **104** (Pt **3**(Mar.)), 613–27.
- Inoue, Yoshiaki, Tanaka, Hiroshi, Ogura, Hiroshi, Ukai, Isao, Fujita, Kieko, Hosotsubo, Hideo, Shimazu, Takeshi, & Sugimoto, Hisashi. 2006. A neutrophil elastase inhibitor, sivelestat, improves leukocyte deformability in patients with acute lung injury. *The Journal of trauma*, **60**(5), 936–43; discussion 943.
- Irvine, DJ, Purbhoo, MA, Krogsgaard, Michelle, & Davis, MM. 2002. Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature*, **419**(October), 845–849.
- Janeway, Charles, Murphy, Kenneth, Travers, Paul, & Walport, Mark. 2009. *Immunobiologie*. 7 edn. New York : de boeck.
- Jones, Wendy R., Ping Ting-Beall, H., Lee, Greta M., Kelley, Scott S., Hochmuth, Robert M., & Guilak, Farshid. 1999. Alterations in the Young's modulus and volumetric properties of chondrocytes isolated from normal and osteoarthritic human cartilage. *Journal of Biomechanics*, **32**(2), 119–127.
- Judokusumo, Edward, Tabdanov, Erdem, Kumari, Sudha, Dustin, Michael L, & Kam, Lance C. 2012. Mechanosensing in T Lymphocyte Activation. *Biophysical Journal*, **102**(2), L5–L7.
- Jungbauer, Simon, Gao, Huajian, Spatz, Joachim P, & Kemkemer, Ralf. 2008. Two characteristic regimes in frequency-dependent dynamic reorientation of fibroblasts on cyclically stretched substrates. *Biophysical journal*, **95**(7), 3470–8.
- Kaizuka, Y., Douglass, a. D., Varma, R., Dustin, Michael L, & Vale, R. D. 2007a. Mechanisms for segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in Jurkat T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**(51), 20296–20301.
- Kaizuka, Yoshihisa, Douglass, Adam D, Varma, Rajat, Dustin, Michael L, & Vale, Ronald D. 2007b. Mechanisms for segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in Jurkat T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**(51), 20296–301.
- Kalinski, Pawel. 2012. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **188**(1), 21–8.
- Kapsenberg, ML. 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature Reviews Immunology*, 984–993.
- Kim, Sun Taek, Takeuchi, Koh, Sun, Zhen-Yu J, Touma, Maki, Castro, Carlos E, Fahmy, Amr, Lang, Matthew J, Wagner, Gerhard, & Reinherz, Ellis L. 2009. The alpha beta T cell receptor is an anisotropic mechanosensor. *The Journal of biological chemistry*, **284**(45), 31028–37.
- King, D J, & Noss, R R. Toxicity of polyacrylamide and acrylamide monomer. *Reviews on environmental health*, **8**(1-4), 3–16.
- Kloxin, April M, Kloxin, Christopher J, Bowman, Christopher N, & Anseth, Kristi S. 2010. Mechanical properties of cellularly responsive hydrogels and their experimental determination. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, **22**(31), 3484–94.
- Kovács, Mihály, Tóth, Judit, Hetényi, Csaba, Málnási-Csizmadia, András, & Sellers, James R. 2004. Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *The Journal of biological chemistry*, **279**(34), 35557–63.

- Kunkel, Eric J, & Butcher, Eugene C. 2002. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity*, **16**(1), 1–4.
- Kuo, Jean-Cheng, Han, Xuemei, Hsiao, Cheng-Te, Yates, John R, & Waterman, Clare M. 2011. Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for β -Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nature cell biology*, **13**(4), 383–93.
- Kwan, Wing-Hong, Boix, Charlotte, Gougelet, Nicolas, Fridman, Wolf H, & Mueller, Chris G F. 2007. LPS induces rapid IL-10 release by M-CSF-conditioned tolerogenic dendritic cell precursors. *Journal of leukocyte biology*, **82**(1), 133–41.
- Lam, Jonathan, Herant, Marc, Dembo, Micah, & Heinrich, Volkmar. 2009. Baseline mechanical characterization of J774 macrophages. *Biophysical journal*, **96**(1), 248–54.
- Lam, Wilbur a, Rosenbluth, Michael J, & Fletcher, Daniel a. 2007. Chemotherapy exposure increases leukemia cell stiffness. *Blood*, **109**(8), 3505–8.
- Laurent, VM, Cañadas, P, Fodil, R, Planus, E, Asnacios, Atef, Wendling, S, & Isabey, D. 2002. Tensegrity behaviour of cortical and cytosolic cytoskeletal components in twisted living adherent cells. *Acta biotheoretica*, **7**.
- Lautenschläger, Franziska, Paschke, Stephan, Schinkinger, Stefan, Bruel, Arlette, Beil, Michael, & Guck, Jochen. 2009. The regulatory role of cell mechanics for migration of differentiating myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**(37), 15696–701.
- Lavkan, A H, Astiz, M E, & Rackow, E C. 1998. Effects of proinflammatory cytokines and bacterial toxins on neutrophil rheologic properties. *Critical care medicine*, **26**(10), 1677–82.
- Lazarides, E. 1976. Actin, alpha-actinin, and tropomyosin interaction in the structural organization of actin filaments in nonmuscle cells. *The Journal of cell biology*, **68**(2), 202–19.
- Lehner, Manfred, Stilper, Andrea, Morhart, Patrick, & Holter, Wolfgang. 2008. Plasticity of dendritic cell function in response to prostaglandin E2 (PGE2) and interferon-gamma (IFN-gamma). *Journal of leukocyte biology*, **83**(4), 883–93.
- Lenormand, G, Hénon, S, Richert, a, Siméon, J, & Gallet, F. 2001. Direct measurement of the area expansion and shear moduli of the human red blood cell membrane skeleton. *Biophysical journal*, **81**(1), 43–56.
- Levental, Ilya, Georges, Penelope C., & Janmey, Paul a. 2007. Soft biological materials and their impact on cell function. *Soft Matter*, **3**(3), 299.
- Levine, Beth, Kalman, Jill, Mayer, Lloyd, Fillit, Howard M, & Packer, Milton. 1990. Elevated Circulating Levels of Tumor Necrosis Factor in Severe Chronic Heart Failure. *New England Journal of Medicine*, **323**(4), 236–241.
- Li, Ya-Chen, Chen, Bing-Mae, Wu, Pei-Chun, Cheng, Tian-Lu, Kao, Lung-Sen, Tao, Mi-Hua, Lieber, Andre, & Roffler, Steve R. 2010. Cutting Edge : mechanical forces acting on T cells immobilized via the TCR complex can trigger TCR signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **184**(11), 5959–63.
- Lin, K, Hsu, P P, Chen, B P, Yuan, S, Usami, S, Shyy, J Y, Li, Y S, & Chien, S. 2000. Molecular mechanism of endothelial growth arrest by laminar shear stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**(17), 9385–9.
- Liwski, Robert S, Chase, Jennifer C, Baldrige, William H, Sadek, Irene, Rowden, Geoffrey, & West, Kenneth a. 2006. Prolonged costimulation is required for naive T cell activation. *Immunology letters*, **106**(2), 135–43.

- Luster, Andrew D. 2002. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Current opinion in immunology*, **14**(1), 129–35.
- Ma, Thomas Y, Boivin, Michel a, Ye, Dongmei, Pedram, Ali, & Said, Hamid M. 2005. Mechanism of TNF- α modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier : role of myosin light-chain kinase protein expression. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **288**(3), G422–30.
- Ma, Zhengyu, Janmey, Paul a, & Finkel, Terri H. 2008. The receptor deformation model of TCR triggering. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **22**(4), 1002–8.
- Maciaszek, Jamie L, & Lykotrafitis, George. 2011. Sick cell trait human erythrocytes are significantly stiffer than normal. *Journal of biomechanics*, **44**(4), 657–61.
- Mackay, D J, Esch, F, Furthmayr, H, & Hall, a. 1997. Rho- and rac-dependent assembly of focal adhesion complexes and actin filaments in permeabilized fibroblasts : an essential role for ezrin/radixin/moesin proteins. *The Journal of cell biology*, **138**(4), 927–38.
- Manz, Boryana N, Jackson, Bryan L, Petit, Rebecca S, Dustin, Michael L, & Groves, Jay. 2011. T-cell triggering thresholds are modulated by the number of antigen within individual T-cell receptor clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**(22), 9089–94.
- Marchi, L F, Sesti-Costa, R, Ignacchiti, M D C, Chedraoui-Silva, S, & Mantovani, B. 2014. In vitro activation of mouse neutrophils by recombinant human interferon-gamma : increased phagocytosis and release of reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines. *International immunopharmacology*, **18**(2), 228–35.
- Martinac, B, Buechner, M, Delcour, a H, Adler, J, & Kung, C. 1987. Pressure-sensitive ion channel in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**(8), 2297–301.
- Mattila, Pieta K, & Lappalainen, Pekka. 2008. Filopodia : molecular architecture and cellular functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **9**(6), 446–54.
- Medzhitov, Ruslan. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, **454**(7203), 428–35.
- Mehrbod, Mehrdad, & Mofrad, Mohammad R K. 2011. On the significance of microtubule flexural behavior in cytoskeletal mechanics. *PloS one*, **6**(10), e25627.
- Mekori, Y a, & Metcalfe, D D. 2000. Mast cells in innate immunity. *Immunological reviews*, **173**(II), 131–40.
- Merad, M, Sathe, P, & Helft, J. 2013. The dendritic cell lineage : ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual review of . . .*
- Mitchison, B Y J M, & Swann, M M. 1954. the mechanical properties of the cell surface. *Journal of Experimental Biology*, **31**(3).
- Mitrossilis, Démosthène, Fouchard, Jonathan, Guiroy, Axel, Desprat, Nicolas, Rodriguez, Nicolas, Fabry, Ben, & Asnacios, Atef. 2009. Single-cell response to stiffness exhibits muscle-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**(43), 18243–8.
- Mitrossilis, Démosthène, Fouchard, Jonathan, Pereira, David, Postic, François, Richert, Alain, Saint-Jean, Michel, & Asnacios, Atef. 2010. Real-time single-cell response to stiffness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**(38), 16518–23.
- Mizuno, Daisuke, Tardin, Catherine, Schmidt, C F, & Mackintosh, F C. 2007. Nonequilibrium mechanics of active cytoskeletal networks. *Science (New York, N.Y.)*, **315**(5810), 370–3.

- Mody, Purvi D., Cannon, Judy L., Bandukwala, Hozefa S., Blaine, Kelly M., Schilling, Alexander B., Swier, Kevin, & Sperling, Anne I. 2007. Signaling through CD43 regulates CD4 T-cell trafficking. *Blood*, **110**(8), 2974–2982.
- Monks, CRF, Freiberg, BA, Kupfer, Hannah, Sciaky, N, & Kupfer, A. 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*, **340**(1986), 764–766.
- Morgan, Joshua T, Wood, Joshua a, Shah, Nihar M, Hughbanks, Marissa L, Russell, Paul, Barakat, Abdul I, & Murphy, Christopher J. 2012. Integration of basal topographic cues and apical shear stress in vascular endothelial cells. *Biomaterials*, **33**(16), 4126–35.
- Mosmann, TR, & Coffman, RL. 1989. Th1 and Th2 cells : different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology*.
- Murphy, Kenneth M, & Reiner, Steven L. 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nature reviews. Immunology*, **2**(12), 933–44.
- Nolte, Martijn a, Leibundgut-Landmann, Salomé, Joffre, Olivier, & Reis e Sousa, Caetano. 2007. Dendritic cell quiescence during systemic inflammation driven by LPS stimulation of radioresistant cells in vivo. *The Journal of experimental medicine*, **204**(6), 1487–501.
- O'Connor, Roddy S, Hao, Xueli, Shen, Keyue, Bashour, Keenan, Akimova, Tatiana, Hancock, Wayne W, Kam, Lance C, & Milone, Michael C. 2012. Substrate rigidity regulates human T cell activation and proliferation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **189**(3), 1330–9.
- Ó Maoiléidigh, Dáibhid, Nicola, Ernesto M, & Hudspeth, a J. 2012. The diverse effects of mechanical loading on active hair bundles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**(6), 1943–8.
- Ono, Santa Jeremy, Nakamura, Takao, Miyazaki, Dai, Ohbayashi, Masaharu, Dawson, Maria, & Toda, Masako. 2003. Chemokines : Roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **111**(6), 1185–1199.
- O'Shea, John J, & Paul, William E. 2010. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science (New York, N.Y.)*, **327**(5969), 1098–102.
- Patel, Naimish R, Bole, Medhavi, Chen, Cheng, Hardin, Charles C, Kho, Alvin T, Mih, Justin, Deng, Linhong, Butler, James, Tschumperlin, Daniel, Fredberg, Jeffrey J, Krishnan, Ramaswamy, & Koziel, Henry. 2012. Cell elasticity determines macrophage function. *PloS one*, **7**(9), e41024.
- Paul, Debjani, Achouri, Sarra, Yoon, Young-Zoon, Herre, Jurgen, Bryant, Clare, & Cicuta, Pietro. 2013. Phagocytosis Dynamics Depends on Target Shape. *Biophysical Journal*, **105**(5), 1143–1150.
- Pelham, R J, Yu-li, & Wang. 1997. Locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**(December), 13661–13665.
- Perozo, Eduardo. 2006. Gating prokaryotic mechanosensitive channels. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **7**(2), 109–19.
- Pfeffer, Klaus. 2003. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **14**(3-4), 185–191.
- Pignatelli, M. 1998. Integrins, cadherins, and catenins : molecular cross-talk in cancer cells. *The Journal of pathology*, **186**, 1–2.
- Piragyte, Indre, & Jun, Chang-duk. 2012. Actin Engine in Immunological Synapse. **12**(3), 71–83.
- Pitaval, Amandine, Tseng, Qingzong, Bornens, Michel, & Théry, Manuel. 2010. Cell shape and contractility regulate ciliogenesis in cell cycle-arrested cells. *The Journal of cell biology*, **191**(2), 303–12.

BIBLIOGRAPHIE

- Pollard, Thomas D, & Borisy, Gary G. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, **112**(4), 453–65.
- Preira, Pascal, Aix, Doctorat D E L Université D, Bagnis, Claude, & Valignat, Marie-pierre. 2012. *Etude Microfluidique de la Rigidité Leucocytaire liée au Syndrome de Détresse Respiratoire Aigüe (SDRA)*. Ph.D. thesis, Université Aix-Marseille.
- Puig-De-Morales, M, Grabulosa, M, Alcaraz, J, Mullol, J, Maksym, G N, Fredberg, J J, & Navajas, D. 2001. Measurement of cell microrheology by magnetic twisting cytometry with frequency domain demodulation. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, **91**(3), 1152–9.
- Qin, Zhao, Buehler, Markus J, & Kreplak, Laurent. 2010. A multi-scale approach to understand the mechanobiology of intermediate filaments. *Journal of biomechanics*, **43**(1), 15–22.
- Revenu, Céline, Athman, Rafika, Robine, Sylvie, & Louvard, Daniel. 2004. The co-workers of actin filaments : from cell structures to signals. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **5**(8), 635–46.
- Reymann, Anne-Cécile, Boujemaa-Paterski, Rajaa, Martiel, Jean-Louis, Guérin, Christophe, Cao, Wenxiang, Chin, Harvey F, De La Cruz, Enrique M, Théry, Manuel, & Blanchoin, Laurent. 2012. Actin network architecture can determine myosin motor activity. *Science (New York, N.Y.)*, **336**(6086), 1310–4.
- Ridge, Karen M, Linz, Laura, Flitney, Frederick W, Kuczumski, Edward R, Chou, Ying-Hao, Omary, M Bishr, Sznajder, Jacob Iasha, & Goldman, Robert D. 2005. Keratin 8 phosphorylation by protein kinase C delta regulates shear stress-mediated disassembly of keratin intermediate filaments in alveolar epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*, **280**(34), 30400–5.
- Rieser, By Claudia, Böck, Günther, Klocker, Helmut, Bartsch, Georg, & Thurnher, Martin. 1997. Prostaglandin E2 and Tumor Necrosis Factor alpha Activate Human Dendritic Cells : Synergistic Activation of Interleukin 12 Production. *Journal of Experimental Medicine*, **186**(9).
- Riveline, D, Zamir, E, Balaban, N Q, Schwarz, U S, Ishizaki, T, Narumiya, S, Kam, Z, Geiger, B, & Bershadsky, a D. 2001. Focal contacts as mechanosensors : externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *The Journal of cell biology*, **153**(6), 1175–86.
- Robson, R L, McLoughlin, R M, Witowski, J, Loetscher, P, Wilkinson, T S, Jones, S a, & Topley, N. 2001. Differential regulation of chemokine production in human peritoneal mesothelial cells : IFN-gamma controls neutrophil migration across the mesothelium in vitro and in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **167**(2), 1028–38.
- Roca-Cusachs, Pere, Almendros, Isaac, Sunyer, Raimon, Gavara, Núria, Farré, Ramon, & Navajas, Daniel. 2006. Rheology of passive and adhesion-activated neutrophils probed by atomic force microscopy. *Biophysical journal*, **91**(9), 3508–18.
- Roca-Cusachs, Pere, Alcaraz, Jordi, Sunyer, Raimon, Samitier, Josep, Farré, Ramon, & Navajas, Daniel. 2008. Micropatterning of single endothelial cell shape reveals a tight coupling between nuclear volume in G1 and proliferation. *Biophysical journal*, **94**(12), 4984–95.
- Ryser, Jean-etienne, Tungger-Brändle, Elisabeth, Chaponnier, Christine, Gabbiani, Giulio, & Vassalli, Pierre. 1982. The area of attachment of cytotoxic T lymphocytes to their target cells shows high motility and polarization of actin, but not myosin. *The Journal of Immunology*, **128**(3), 0–3.
- Saez, Alexandre, Ghibaudo, Marion, Buguin, Axel, Silberzan, Pascal, & Ladoux, Benoît. 2007. Rigidity-driven growth and migration of epithelial cells on microstructured anisotropic substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**(20), 8281–6.
- Saha, Krishanu, Keung, Albert J, Irwin, Elizabeth F, Li, Yang, Little, Lauren, Schaffer, David V, & Healy, Kevin E. 2008. Substrate modulus directs neural stem cell behavior. *Biophysical journal*, **95**(9), 4426–38.

- Saito, Takashi, Yokosuka, Tadashi, & Hashimoto-Tane, Akiko. 2010. Dynamic regulation of T cell activation and co-stimulation through TCR-microclusters. *FEBS letters*, **584**(24), 4865–71.
- Satterwhite, L L, & Pollard, T D. 1992. Cytokinesis. *Current opinion in cell biology*, **4**(1), 43–52.
- Savignac, Magali, Mellström, Britt, & Naranjo, Jose R. 2007. Calcium-dependent transcription of cytokine genes in T lymphocytes. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, **454**(4), 523–33.
- Sawada, Yasuhiro, Tamada, Masako, Dubin-Thaler, Benjamin J, Cherniavskaya, Oksana, Sakai, Ryuichi, Tanaka, Sakae, & Sheetz, Michael P. 2006. Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell*, **127**(5), 1015–26.
- Schiff, D E, Rae, J, Martin, T R, Davis, B H, & Curnutte, J T. 1997. Increased phagocyte Fc gammaRI expression and improved Fc gamma-receptor-mediated phagocytosis after in vivo recombinant human interferon-gamma treatment of normal human subjects. *Blood*, **90**(8), 3187–94.
- Schlesinger, Larry S, & Horwitz, Marcus A. 1991. phagocytosis of myobacterium leprae by human monocyte-derived macropages is mediated by complement receptors CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) and IFN-g activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium. *The Journal of Immunology*, **147**(6), 1983–1994.
- Schroder, Kate, Hertzog, Paul J, Ravasi, Timothy, & Hume, David A. 2004a. Interferon-gamma : an overview of signals , mechanisms and functions. *Journal of Leucocyte Biology*, **75**(February).
- Schroder, Kate, Hertzog, Paul J, Ravasi, Timothy, & Hume, David A. 2004b. Interferon-gamma : an overview of signals , mechanisms and functions. *Journal of Leucocyte Biology*, **75**(February).
- Schwartz, R, Yano, A, & Stimpfling, J. 1979. T and B lymphocytes : recognition and function. *UCLA symposia on Molecular and Cellular Biology*, **XVI**.
- Shaw, AS. 2001. FERMIing Up the Synapse. *Immunity*, **15**, 683–686.
- Sleep, J, Wilson, D, Simmons, R, & Gratzer, W. 1999. Elasticity of the red cell membrane and its relation to hemolytic disorders : an optical tweezers study. *Biophysical journal*, **77**(6), 3085–95.
- Smith-Garvin, Jennifer E, Koretzky, Gary a, & Jordan, Martha S. 2009. T cell activation. *Annual review of immunology*, **27**(Jan.), 591–619.
- Sollich, Peter, Lequeux, François, Hébraud, Pascal, & Cates, Michael. 1997. Rheology of Soft Glassy Materials. *Physical Review Letters*, **78**(10), 2020–2023.
- Solon, Jérôme, Levental, Ilya, Sengupta, Kheya, Georges, Penelope C, & Janmey, Paul a. 2007. Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates. *Biophysical journal*, **93**(12), 4453–61.
- Sperling, AI, & Sedy, JR. 1998. Cutting edge : TCR signaling induces selective exclusion of CD43 from the T cell-antigen-presenting cell contact site. *The Journal of Immunology*.
- Stricker, Jonathan, Aratyn-Schaus, Yvonne, Oakes, Patrick W, & Gardel, Margaret L. 2011. Spatiotemporal constraints on the force-dependent growth of focal adhesions. *Biophysical journal*, **100**(12), 2883–93.
- Suresh, Subra. 2007. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta biomaterialia*, **3**(4), 413–38.
- Svanborg, C, Godaly, G, & Hedlund, M. 1999. Cytokine responses during mucosal infections : role in disease pathogenesis and host defence. *Current opinion in microbiology*, **2**(1), 99–105.
- Swanson, J a, Johnson, M T, Beningo, K, Post, P, Mooseker, M, & Araki, N. 1999. A contractile activity that closes phagosomes in macrophages. *Journal of cell science*, **112** (Pt 3)(Feb.), 307–16.

- Sykulev, Y, Joo, M, Vturina, I, Tsomides, T J, & Eisen, H N. 1996. Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity*, **4**(6), 565–71.
- Takigawa, Toshikazu, Morino, Yoshiro, Urayama, Kenji, & Masuda, Toshiro. 1996. Poisson's ratio of polyacrylamide (PAAm) gels. *Polymer Gels and Networks*, **4**(1), 1–5.
- Tamada, Masako, Sheetz, Michael P, & Sawada, Yasuhiro. 2004. Activation of a signaling cascade by cytoskeleton stretch. *Developmental cell*, **7**(5), 709–18.
- Tan, J L, Ravid, S, & Spudich, J a. 1992. Control of nonmuscle myosins by phosphorylation. *Annual review of biochemistry*, **61**(Jan.), 721–59.
- Tan, John L, Tien, Joe, Pirone, Dana M, Gray, Darren S, Bhadriraju, Kiran, & Chen, Christopher S. 2003. Cells lying on a bed of microneedles : an approach to isolate mechanical force. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**(4), 1484–9.
- Tanaka, Hajime, Jabbari-Farouji, Sara, Meunier, Jacques, & Bonn, Daniel. 2005. Kinetics of ergodic-to-nonergodic transitions in charged colloidal suspensions : Aging and gelation. *Phys. Rev. E*, **71**(2), 21402.
- Théry, Manuel, Pépin, Anne, Dressaire, Emilie, Chen, Yong, & Bornens, Michel. 2006. Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell motility and the cytoskeleton*, **63**(6), 341–55.
- Tinevez, Jean-Yves, Schulze, Ulrike, Salbreux, Guillaume, Roensch, Julia, Joanny, Jean-François, & Paluch, Ewa. 2009. Role of cortical tension in bleb growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**(44), 18581–6.
- Tracey, Kevin J. 2002. The inflammatory reflex. *Nature*, **420**(6917), 853–9.
- Trepac, Xavier, Grabulosa, Mireia, Buscemi, Lara, Rico, Fèlix, Farré, Ramon, & Navajas, Daniel. 2005. Thrombin and histamine induce stiffening of alveolar epithelial cells. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, **98**(4), 1567–74.
- Trepac, Xavier, Deng, Linhong, An, Steven S, Navajas, Daniel, Tschumperlin, Daniel J, Gerthoffer, William T, Butler, James P, & Fredberg, Jeffrey J. 2007. Universal physical responses to stretch in the living cell. *Nature*, **447**(7144), 592–5.
- Trichet, Léa, Le Digabel, Jimmy, Hawkins, Rhoda J, Vedula, Sri Ram Krishna, Gupta, Mukund, Ribault, Claire, Hersen, Pascal, Voituriez, Raphaël, & Ladoux, Benoît. 2012. Evidence of a large-scale mechanosensing mechanism for cellular adaptation to substrate stiffness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**(18), 6933–8.
- Tsai, Richard K, & Discher, Dennis E. 2008. Inhibition of "self" engulfment through deactivation of myosin-II at the phagocytic synapse between human cells. *The Journal of cell biology*, **180**(5), 989–1003.
- Tse, Justin R, & Engler, Adam J. 2010. Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.]*, **Chapter 10**(June), Unit 10.16.
- Tseng, Y, Fedorov, E, McCaffery, J M, Almo, S C, & Wirtz, D. 2001. Micromechanics and ultrastructure of actin filament networks crosslinked by human fascin : a comparison with alpha-actinin. *Journal of molecular biology*, **310**(2), 351–66.
- Tseng, Yiider, Kole, Thomas P, Lee, Jerry S H, Fedorov, Elena, Almo, Steven C, Schafer, Benjamin W, & Wirtz, Denis. 2005. How actin crosslinking and bundling proteins cooperate to generate an enhanced cell mechanical response. *Biochemical and biophysical research communications*, **334**(1), 183–92.

- Tufail, a, Holland, G N, Fisher, T C, Cumberland, W G, & Meiselman, H J. 2000. Increased polymorphonuclear leucocyte rigidity in HIV infected individuals. *The British journal of ophthalmology*, **84**(7), 727–31.
- Ueda, Hironori, Morpew, Mary K, McIntosh, J Richard, & Davis, Mark M. 2011. CD4+ T-cell synapses involve multiple distinct stages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**(41), 17099–104.
- Unanue, ER. 1984. Antigen-presenting function of the macrophage. *Annual review of immunology*, **1**(c), 395–428.
- Uyeda, T Q, Abramson, P D, & Spudich, J a. 1996. The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**(9), 4459–64.
- Valberg, PA. 1984. Magnetometry of Ingested Particles in Pulmonary Macrophages. *Science*, **163**(May), 513–516.
- Vale, R. D. 2000. The Way Things Move : Looking Under the Hood of Molecular Motor Proteins. *Science*, **288**(5463), 88–95.
- Valignat, Marie-Pierre, Theodoly, Olivier, Gucciardi, Alexia, Hogg, Nancy, & Lellouch, Annemarie C. 2013. T lymphocytes orient against the direction of fluid flow during LFA-1-mediated migration. *Biophysical journal*, **104**(2), 322–31.
- Valitutti, By Salvatore, Dessing, Mark, Aktories, Klaus, Gallati, Harald, & Lanzavecchia, Antonio. 1995. Sustained Signaling Leading to T Cell Activation Results from Prolonged T Cell Receptor Occupancy. Role of T Cell Actin Cytoskeleton. *J. Exp. Med.*, **181**(February), 577–584.
- van der Merwe, P Anton, & Dushek, Omer. 2011. Mechanisms for T cell receptor triggering. *Nature reviews. Immunology*, **11**(1), 47–55.
- van der Merwe, P.Anton. 2002. Formation and function of the immunological synapse. *Current Opinion in Immunology*, **14**(3), 293–298.
- Van Gool, S W, Vandenberghe, P, de Boer, M, & Ceuppens, J L. 1996. CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model. *Immunological reviews*, **153**(Oct.), 47–83.
- van Helden, Suzanne F G, Oud, Machteld M, Joosten, Ben, Peterse, Niels, Figdor, Carl G, & van Leeuwen, Frank N. 2008. PGE2-mediated podosome loss in dendritic cells is dependent on actomyosin contraction downstream of the RhoA-Rho-kinase axis. *Journal of cell science*, **121**(Pt 7), 1096–106.
- Van Seventer, G A, Shimizu, Y, Horgan, K J, & Shaw, S. 1990. The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **144**(12), 4579–86.
- van Seventer, G A, Newman, W, Shimizu, Y, Nutman, T B, Tanaka, Y, Horgan, K J, Gopal, T V, Ennis, E, O'Sullivan, D, & Grey, H. 1991. Analysis of T cell stimulation by superantigen plus major histocompatibility complex class II molecules or by CD3 monoclonal antibody : costimulation by purified adhesion ligands VCAM-1, ICAM-1, but not ELAM-1. *The Journal of experimental medicine*, **174**(4), 901–13.
- Wang, Hong-bei, Dembo, Micah, Wang, Yu-li, Provenzano, Paolo P, Keely, Patricia J, Schedin, Pepper, Liu, Fei, Mih, Justin D, Shea, Barry S, Kho, Alvin T, Sharif, Asma S, Tager, Andrew M, & Tschumperlin, Daniel J. 2000. Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(5), C1345–50.

- Wang, N, Butler, J P, & Ingber, D E. 1993. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science (New York, N.Y.)*, **260**(5111), 1124–7.
- Wang, N, Naruse, K, Stamenović, D, Fredberg, J J, Mijailovich, S M, Tolić-Nørrelykke, I M, Polte, T, Mannix, R, & Ingber, D E. 2001. Mechanical behavior in living cells consistent with the tensegrity model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**(14), 7765–70.
- Wang, Wei, & Gulden, PH. 1997. A Naturally Processed Peptide Presented by HLA-AW207 Is Expressed at Low Abundance and Recognized by an Alloreactive CD8+ Cytotoxic T Cell with Apparent High Affinity. *The Journal of Immunology*, **158**(12), 5797–5804.
- Webster, Kevin D, Crow, Ailey, & Fletcher, Daniel a. 2011. An AFM-based stiffness clamp for dynamic control of rigidity. *PloS one*, **6**(3), e17807.
- Weeks, E. R. 2000. Three-Dimensional Direct Imaging of Structural Relaxation Near the Colloidal Glass Transition. *Science*, **287**(5453), 627–631.
- Wu, Xiaodong, Hou, Wanqiu, Sun, Shuhui, Bi, Enguang, Wang, Yuan, Shi, Mude, Zang, Jingwu, Dong, Chen, & Sun, Bing. 2006. Novel function of IFN-gamma : negative regulation of dendritic cell migration and T cell priming. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **177**(2), 934–43.
- Wülfig, C. 1998. A Receptor/Cytoskeletal Movement Triggered by Costimulation During T Cell Activation. *Science*, **282**(5397), 2266–2269.
- Xu, J, Wirtz, D, & Pollard, T D. 1998. Dynamic cross-linking by alpha-actinin determines the mechanical properties of actin filament networks. *The Journal of biological chemistry*, **273**(16), 9570–6.
- Yeung, Tony, Georges, Penelope C, Flanagan, Lisa a, Marg, Beatrice, Ortiz, Miguelina, Funaki, Makoto, Zahir, Nastaran, Ming, Wenyu, Weaver, Valerie, & Janmey, Paul a. 2005. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell motility and the cytoskeleton*, **60**(1), 24–34.
- Yi, Jason, Wu, XS, Crites, Travis, & Hammer, JA. 2012. Actin retrograde flow and actomyosin II arc contraction drive receptor cluster dynamics at the immunological synapse in Jurkat T cells. *Molecular biology of the cell*, **23**(5), 834–852.
- Yonemura, Shigenobu, Wada, Yuko, Watanabe, Toshiyuki, Nagafuchi, Akira, & Shibata, Mai. 2010. alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nature cell biology*, **12**(6), 533–42.
- Yoshigi, Masaaki, Hoffman, Laura M, Jensen, Christopher C, Yost, H Joseph, & Beckerle, Mary C. 2005. Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement. *The Journal of cell biology*, **171**(2), 209–15.
- Yu, Cheng-han, Wu, Hung-jen, Kaizuka, Yoshihisa, Vale, Ronald D, & Groves, Jay T. 2010. Altered actin centripetal retrograde flow in physically restricted immunological synapses. *PloS one*, **5**(7), e11878.
- Zhang, W, Triple, R P, & Samelson, L E. 1998a. LAT palmitoylation : its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity*, **9**(2), 239–46.
- Zhang, W, Sloan-Lancaster, J, Kitchen, J, Triple, R P, & Samelson, L E. 1998b. LAT : the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell*, **92**(1), 83–92.
- Zhu, Jiang, & Emerson, SG. 2002. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene*, 3295–3313.

Title : THE ROLE OF INFLAMMATION ANTIGEN PRESENTING CELL RHEOLOGY :
PERSPECTIVES FOR T-LYMPHOCYTE ACTIVATION

Summary : T Lymphocyte activation is a crucial event in immune responses, since it is the first and necessary step for the initiation of adaptative responses. During this activation process, the T lymphocyte forms a contact with myeloid antigen presenting cells, the only cells able to trigger the engagement of the T cell receptor. While myeloid antigen presenting cells have various shape and sizes, T cell activation requires cytoskeleton remodeling. Besides, it has been shown that T lymphocytes may exert forces on antigen presenting cells, and that T cell signaling can be triggered after purely mechanical sollicitation of the TCR : these are all clues for T cell mecanosensitivity during activation. We thus took advantage of the emerging field of cell biomechanics, for the understanding of these phenomena. We first measured the mechanical properties of antigen presenting cells, and their modification upon inflammatory treatments. We discovered that the presenting cells rigidity span over a very wide range, and that it can be affected by inflammatory conditions. The evolution of rigidity upon inflammation was independent of the evolution of maturation molecules at the cell surface. We therefore identified rigidity as a new marker of inflammation. Following these results, we conducted experiments in order to decipher the underlying molecular mechanisms to these varying rigidities. We observed that while the composition of each cell type in cytoskeleton proteins is very variable, it remains stable throughout inflammatory treatments. This suggests that the differentiation in a myeloid type implies deep structural modifications, that are likely to be coupled to functional changes. Last, we developped a protocol for the fabrication of soft gels of controled rigidity. We then used these gels for T lymphocyte activation on substrates of varying rigidity, and the preliminary results of these experiments are presented. Overall, by providing the rigidity range to which T lymphocyte is exposed during the interaction with myeloid antigen presenting cells, this study establishes a solid basis for further investigation of T lymphocyte mecanosensitivity.

Keywords Cell Mechanics, Immunology, Mecanosensing, T Lymphocyte Activation, Antigen Presenting Cells, Inflammation.

Titre : RÔLE DE L'INFLAMMATION SUR LA RHÉOLOGIE DES CELLULES PRÉSENTATRICES D'ANTIGÈNE : PERSPECTIVES POUR L'ACTIVATION DU LYMPHOCYTE T

Résumé : L'activation du lymphocyte T est une étape cruciale de la réponse immunitaire, car c'est l'étape initiale permettant d'orchestrer la réponse adaptative, ciblée contre un type de pathogène particulier. Au cours de cette activation, le lymphocyte T entre en contact avec des cellules présentatrices d'antigène d'origine myéloïde, seules capables de déclencher l'engagement des récepteurs du lymphocyte T. Alors que les cellules présentatrices sont de taille et de forme variée, il se trouve que cette étape d'activation met en jeu un remodelage du cytosquelette, que le lymphocyte T est capable d'exercer des forces sur les cellules présentatrices, et que l'activation du lymphocyte T peut-être induite par une simple force mécanique exercée sur le TCR : autant d'indices de la mécano-sensibilité du lymphocyte T. Nous avons donc mis à profit les connaissances d'une science nouvelle, la biomécanique cellulaire, pour la compréhension de ces phénomènes de mécano-sensibilité. Nous avons tout d'abord mesuré les propriétés mécaniques de cellules présentatrices d'antigène myéloïdes, et les variations de ces propriétés après traitement par différents facteurs inflammatoires. Nous y avons découvert que les cellules présentatrices présentent des rigidités différentes, qui évoluent après traitements inflammatoires, et cela indépendamment de l'évolution des marqueurs de présentation antigénique que l'on trouve à leur surface. Nous avons donc identifié la rigidité comme un nouveau marqueur d'inflammation. A la suite des résultats de ces expériences, nous avons tenté de déchiffrer les mécanismes moléculaires sous-jacents aux différences de rigidité observées. Si les concentrations en protéines du cytosquelette varient d'un type cellulaire à l'autre, leur composition respective reste stable lors des traitements inflammatoires, ce qui indique que la différenciation en type cellulaire myéloïde implique des changements structurels profonds, qui sont probablement en lien avec leurs fonctions cellulaires. Enfin, nous avons mis au point un protocole pour la fabrication de gels mous de rigidité contrôlée, que nous avons ensuite utilisés pour l'activation des lymphocytes T. Les résultats préliminaires de l'influence de la rigidité du substrat sur l'activation du lymphocyte T sont présentés. Dans l'ensemble, en fournissant la gamme physiologique de rigidité à laquelle le lymphocyte T est soumis lors de son interaction avec les cellules présentatrices, cette étude constitue une base solide pour l'investigation de la mécano-sensibilité du lymphocyte T.

Mots-clés : Mécanique cellulaire, immunologie, mécano-sensibilité, lymphocyte T, activation, cellules présentatrices d'antigène, inflammation.
