



HAL
open science

Rhéologie à l'échelle d'une cellule vivante

Nicolas Desprat

► **To cite this version:**

Nicolas Desprat. Rhéologie à l'échelle d'une cellule vivante. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris Diderot, 2005. Français. NNT : 2005PA077095 . tel-01146178

HAL Id: tel-01146178

<https://hal.science/tel-01146178>

Submitted on 27 Apr 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.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

Rhéologie à l'échelle d'une cellule vivante

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 17 mars 2005

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Denis Diderot - Paris VII
(spécialité Physique des Solides et des Milieux Denses)

par

Nicolas Desprat

Composition du jury

Président : Jacques Prost
Rapporteurs : Paul A. Janmey
Daniel Riveline
Examineurs : Jean-Claude Bacri
Maïté Coppey
Directeur : Atef Asnacios

Remerciements

Les remerciements sont, sans doute, l'exercice le plus facile de la rédaction d'un manuscrit de thèse. Néanmoins, il n'en reste pas moins que cet exercice est aussi l'un des plus périlleux car, souvent plus lus que le reste, ils attisent les susceptibilités. Pour autant, au détriment du politiquement correct, je leur préfère la sincérité. Ainsi les quelques personnes qui figureront ci-dessous ont effectivement contribué à l'aboutissement de ces trois années de recherches. Car loin des clichés de l'hermite scientifique à sa paillasse, un travail de recherche expérimental est le résultat de la mise en commun de savoir complémentaires offrant des interactions avec des corps de métier très différents les uns des autres.

Je commencerais par remercier toutes les personnes qui ne figurent jamais sur les publications mais sans qui la mise au point d'un dispositif expérimental deviendrait extrêmement difficile et coûteuse. Merci donc aux mécaniciens de l'atelier : merci Henri pour avoir fabriqué avec soin les pièces de ce rhéomètre cellulaire et merci Manu pour avoir construit la boîte de la thermalisation ainsi que la platine. Ensuite viennent les ingénieurs d'études qui par leurs conseils avisés nous aiguillent sur les bons choix techniques. Merci donc Jean-Louis. Merci aussi Stéphane pour tes nombreux conseils Labview.

Mes remerciements se tourneront ensuite vers les biologistes du laboratoires qui, pour un néophyte comme moi, furent indispensables. C'est ainsi que je remercie Jacqueline et Alain de s'être occupé de la grande majorité de la culture cellulaire.

Viennent ensuite, les gens qui ont apporté leur pierre à cette réalisation. Je pense à Sophie Ferréole, sans qui je n'aurais pu effectuer les expériences sur les macrophages. Merci Julien pour avoir posé tous les concepts de l'analyse théorique sans laquelle il manquerait une dimension à ce travail. Je pense aussi à toute l'équipe de mécanique cellulaire du laboratoire avec qui, autour de longues discussions, nous avons pu raffiner l'analyse des résultats. Merci donc à Sylvie, François et Martial.

De même, je souhaiterais remercier chaleureusement les biologistes avec qui j'ai pu collaborer et qui ont permis d'élargir le spectre de ces recherches. Je pense ainsi à Mireille Lambert (INSERM U440 - Signalisation et Différenciation Cellulaires dans les Systèmes Nerveux et Musculaire - Institut du Fer à Moulin) qui m'a fourni la construction des cadhérines. Je pense aussi à Denise Paulin et Zhigang Xue (Laboratoire de biologie moléculaire de la différenciation - Paris 7) qui m'ont fourni les fibroblastes pour l'étude du rôle des filaments intermédiaires.

Je tenais à remercier spécialement Olivier et Benoit. Olivier, je te remercie pour m'avoir initié à Latex et m'avoir secouru en toute circonstance. Benoit, je te remercie d'avoir pris sur tes fonds afin de m'envoyer aux États Unis dans le but de trouver un postdoc.

Merci à mes collègues de bureau pour avoir eu la patience de m'écouter dans les moments difficiles. Merci Nicolas, merci Laurianne, merci Martial, merci Alexandre et merci Delphine.

Enfin, viens le tour de la personne que je ne saurais remercier suffisamment. En effet, cela pourrait paraître déplacé, mais avant ma thèse, je n'étais pas sûr de vouloir à terme poursuivre dans cette voie. Il se trouve que la vie m'a mis en face d'une personne simple faisant son travail avec cœur et honnêteté. Atef, merci infiniment. . .

*Je dédie cette thèse à mes parents
Sans eux, je ne serais pas,
Sans leur éducation, je ne serais rien.
Merci.*

Table des matières

Introduction générale	1
-----------------------	---

Partie I Mécanique cellulaire

Chapitre 1

Cellules et mécanique

1.1 Réponse à un signal mécanique	5
1.2 Adhésion	6
1.3 Un exemple de production de force : la migration	8

Chapitre 2

L'acteur : le cytosquelette

2.1 F-actine	12
2.1.1 Filaments dynamiques	12
2.1.2 Protéines associées	13
2.2 Microtubules	15
2.2.1 Instabilité dynamique	15
2.2.2 Stabilisation et transport des organelles	16
2.3 Filaments intermédiaires	17
2.3.1 Famille très diversifiée	17
2.3.2 Résistance mécanique et structure du cytoplasme	18
2.4 Conclusion	19

Chapitre 3

Étape 0 : comprendre les propriétés mécaniques passives

3.1	Cytosquelettes synthétiques	22
3.1.1	"Solutions" de F-actine	22
3.1.2	"Gels" d'actine	23
3.2	Cellules vivantes	24
3.2.1	Modèles mécaniques composés de ressorts et d'amortisseurs : nombre fini de temps de relaxation	24
3.2.2	Rhéologie dynamique : nombre infini de temps de relaxation	32
3.3	Conclusion	34

Partie II Le rhéomètre à cellule unique

Chapitre 1

Microplaques à l'échelle d'une cellule

1.1	De l'étirement uniaxial au rhéomètre à cellule unique	39
1.2	Fabrication des microplaques composites	42
1.2.1	Étirement des lamelles de verre	42
1.2.2	Réalisation des Microplaques	44
1.3	Mise en place sur la platine d'un microscope	45
1.3.1	Description des bras porteurs	45
1.3.2	Adaptation des bras sur le microscope	46
1.4	Calibration des microplaques	48
1.4.1	Calibration de la microplaque étalon	48
1.4.2	Calibration d'une microplaque	51

Chapitre 2

Mise en place de la boucle de rétroaction

2.1	Détection de la position de la pointe de la lamelle souple	55
2.1.1	Le capteur optique de position	55
2.1.2	Analyse et filtrage du signal	57

2.2	Asservissement	58
2.2.1	Interfaçage	59
2.2.2	Correcteur PID	60

Chapitre 3 Protocole et principe d'une expérience de fluage
--

3.1	Protocole	63
3.1.1	Préparation des cellules	63
3.1.2	Positionnement des lamelles	63
3.2	Principe	64
3.2.1	Application d'une force constante	64
3.2.2	Évolution des surfaces de contact	66

Partie III Rhéologie à l'échelle d'une cellule vivante isolée

Chapitre 1 Mesure de la fonction de fluage

1.1	La fonction de fluage suit une loi de puissance	74
1.1.1	Exposant	77
1.1.2	Préfacteur	78
1.2	Étude du régime linéaire	79
1.2.1	Dépendance des paramètres ajustables en fonction de la contrainte	79
1.2.2	Expériences d'oscillations sur cellule unique	80

Chapitre 2 Comparaison et confrontation de nos résultats aux données existantes
--

2.1	Comparaison avec les mesures de rhéologie dynamique	83
2.1.1	Comparaison avec les mesures sur cellule vivante	83
2.1.2	Comparaison avec le comportement de "cytosquelettes synthétiques"	84
2.2	Comparaison avec l'étirement uniaxial sans réaction : le problème de l'élasticité instantannée	85
2.2.1	Description de l'expérience	85

2.2.2	Expression de la relation liant contrainte et déformation	86
2.2.3	Cas d'une fonction de fluage en loi de puissance	87

<p>Chapitre 3 Discussion</p>
--

3.1	Remarques générales	89
3.1.1	Indéformabilité à temps court et écoulement à temps long	89
3.1.2	Dimension du préfacteur A	89
3.2	Quels sont les modèles qui prédisent une loi de puissance ?	90
3.2.1	Les matériaux vitreux mous	90
3.2.2	Systèmes à la transition sol-gel	91
3.3	Universalité et comportement multiéchelle	92
3.3.1	Dépendance en fonction du type cellulaire	93
3.3.2	Comportement multiéchelles	94

Partie IV Études préliminaires et Perspectives

<p>Chapitre 1 Grandes déformations : Analyse des expériences à force constante</p>
--

1.1	Résolution analytique à l'aide de la fonction de Mittag-Leffler	98
1.2	Résolution numérique	100

<p>Chapitre 2 Rôle des constituants du cytosquelette dans la réponse en fluage</p>
--

2.1	Sollicitation <i>via</i> des protéines d'adhésion spécifiques	103
2.1.1	<i>via</i> les cadhérines (C2.7)	103
2.1.2	<i>via</i> les fibronectines (macrophage)	105
2.2	Perturbation de l'un des sous-réseaux cytosquelettiques	106
2.2.1	Effet de drogues agissant sur le réseau d'actine : Cytochalasine-D et Jasplakinolide	106
2.2.2	Les filaments intermédiaires maintiennent l'intégrité mécanique à grande déformation	109

Chapitre 3**Adaptation de la force développée lors de l'étalement**

3.1	Protocole	113
3.2	Résultats	114
	Conclusion générale	117

Annexe A Culture et préparation des cellules **119**

A.1	Cultures cellulaires	119
A.1.1	Myoblastes C2.7	119
A.1.2	Fibroblastes Primaires	120
A.1.3	Macrophages	120
A.2	Décollement des cultures et préparation	121
A.2.1	Trypsination	121
A.2.2	Décollement à froid	121
A.2.3	Conditionnement <i>in situ</i>	122

Annexe B Traitement de la surface des microplaques **123**

B.1	Nettoyage	123
B.2	Glutaraldéhyde	123
B.3	Cadhérine	124
B.4	Fibronectine	125

Annexe C La détection optique **127**

C.1	Principe de fonctionnement du capteur de position	127
C.2	Détection de nos lamelles (contraste inversé)	128
C.2.1	Éclairage uniforme	129
C.2.2	Tâche lumineuse d'extension finie	129
C.2.3	Ombre sur un éclairage uniforme	130

Annexe D Expérience de relaxation **131**

D.1	Protocole et principe	131
D.2	Comparaison avec les expériences de fluage	132

Annexe E Matériaux vitreux mous « SGM » **137**

E.1	Description	137
E.2	$x > 1$:	138
E.3	$x < 1$:	139

Bibliographie

141

Introduction générale

Un peu à la manière des atomes pour la matière, notre corps et tous ceux des autres êtres vivants, animaux ou végétaux, sont constitués de cellules, briques élémentaires de la vie. Au sein d'une cellule, on trouve l'ADN, code de l'information génétique, orchestrant le déroulement programmé de la vie cellulaire. Ainsi, chaque espèce présente une espérance de vie qui lui est propre, et les individus qui la constituent meurent en moyenne au même âge. Cependant, il existe des fluctuations dues aux interactions des cellules avec leur environnement. Si les échanges chimiques (alimentation, respiration) constituent une source majeure de communication avec l'extérieur, elle n'est pas la seule. En effet, les êtres animés, en effectuant des mouvements, se déforment, déformant ainsi une partie de leurs sous-structures. De l'épigénétique (méthylation de l'ADN) à la mécanotransduction, il y a un nombre croissant de preuves que les propriétés mécaniques jouent un rôle essentiel dans le développement et la survie des organismes. D'où la nécessité de décrire les propriétés mécaniques de ces objets (cellule, ADN), c'est à dire la rhéologie de ces matériaux.

Éthymologiquement, la rhéologie est la science des écoulements. Faire de la rhéologie signifie donc que l'on s'intéresse à la manière dont un matériau se déforme, autrement dit on cherche à déterminer la relation contrainte-déformation. Pour caractériser expérimentalement cette relation, trois méthodes sont rhéologiquement pertinentes.

1. Le fluage : On fixe la contrainte et on mesure la déformation.
2. La relaxation : On fixe la déformation et on mesure la force.
3. La rhéologie dynamique : On impose une contrainte oscillante et on étudie la déformation.

Notre objet d'étude est une cellule vivante animale. Pour étudier ses propriétés mécaniques, nous avons décidé de mener des expériences de fluages sur différents types cellulaires dans des conditions physiologiques. Afin de solliciter la cellule dans sa globalité de manière contrôlée, nous nous sommes inspirés du dispositif d'étirement uniaxial d'O. Thoumine et d'A. Ott [Thoumine, 1997] permettant d'étirer une cellule vivante entre deux lamelles de verre : l'une étant rigide, l'autre souple. Ce dispositif ne permettant pas de caractériser la relation contrainte-déformation de manière rhéologiquement pertinente, nous l'avons modifié de manière à pouvoir imposer une contrainte constante. Ce manuscrit vise à décrire la manière dont nous avons mis au point ce dispositif et les résultats obtenus. Il se décompose en quatre parties.

Dans la première partie, à travers plusieurs exemples, nous nous intéresserons à l'influence de signaux mécaniques sur le fonctionnement cellulaire et, plus précisément, à la manière dont une cellule perçoit un signal biomécanique à travers ses complexes d'adhésion (cellule-substrat et cellule-cellule). Puis nous nous intéresserons aux forces qu'elles sont capables d'exercer pour, par exemple, produire un mouvement. Ensuite, nous nous pencherons sur la structure cellulaire déformée par l'application d'une contrainte globale : le cytosquelette (squelette cellulaire). Nous décrirons les trois types de filament le constituant ainsi que les protéines qui leurs sont associées. Enfin, nous aborderons le thème central de ce manuscrit, *i.e.* la rhéologie cellulaire, en

commençant par introduire les mesures de rhéologie dynamique effectuées sur des cytosquelettes synthétiques d'actine. Puis nous décrirons, à travers les différents dispositifs expérimentaux existant, les deux classes de comportement reportés dans la littérature :

- D'un côté, les cellules sont représentées par des modèles mécaniques équivalents, à nombre fini de temps de relaxation (ressorts + amortisseurs). Les modèles sont dans ce cas différents et même parfois contradictoires d'une expérience à l'autre.
- De l'autre, quelques mesures locales de rhéologie dynamique révèlent un continuum de temps de relaxation montrant, au contraire, un comportement unifié à travers les différentes expériences et les divers types cellulaires.

Pour déterminer le comportement rhéologique de l'ensemble de la cellule, nous avons décidé de mettre au point un rhéomètre permettant d'appliquer des contraintes constantes (fluage). L'objectif de la deuxième partie est d'exposer les modifications que nous avons apportées au dispositif d'étirement uniaxial pour en faire un véritable rhéomètre à cellule unique. Nous verrons notamment, comment nous avons revu l'érgonomie des microplaques et leur calibration. Puis, grâce à ces nouvelles microplaques optiquement détectables, nous verrons comment nous avons pu concevoir un système d'asservissement.

Muni de ce nouveau dispositif expérimental, nous avons pu mesurer, pour la première fois à l'échelle de la cellule entière, la fonction de fluage de cellules vivantes. Dans la troisième partie, nous verrons que la fonction de fluage mesurée suit une loi de puissance fonction du temps reflétant un continuum de temps de relaxation. Puis, une étude du régime linéaire nous a permis de comparer qualitativement et quantitativement nos résultats aux mesures locales de rhéologie dynamique. De plus, une comparaison détaillée avec l'expérience d'étirement uniaxial a permis de montrer qu'en tenant compte de la relation entre contrainte et déformation dans cette géométrie, il était possible de reproduire, sur une plage temporelle réduite, un comportement reflétant en apparence un nombre fini de temps de relaxation.

Puis pour aller plus loin, nous exposons dans la quatrième partie deux voies d'investigation : l'étude du régime à grande déformation et l'influence de paramètres biochimiques sur la fonction de fluage. Nous verrons, d'abord, que les analyses à grande déformation d'une expérience à force constante permettent de déterminer la forme de la fonction de fluage sur une plage temporelle élargie du côté des grandes valeurs. Nous présentons ensuite des mesures pour lesquelles on a : modifié le traitement des lamelles (glutaraldéhyde, cadhérine, fibronectine) ; testé l'influence de drogues agissant sur le cytosquelette d'actine (cytokalasin D, jasplakinolide) ; regardé l'influence des filaments intermédiaires (vimentine). Nous refermerons cette dernière partie sur des expériences consistant à mesurer la force développée par une cellule lorsqu'elle s'étale entre les lamelles. Les résultats semblent indiquer que les cellules sont capables d'adapter la force développée à la raideur des lamelles.

Ajoutées, à ces quatre parties, cinq annexes viennent clôturer le manuscrit. L'Annexe A et B concernent les détails des protocoles de culture des cellules et du traitement de surface des lamelles. L'Annexe C contient les détails de fonctionnement du capteur de position. On trouvera, dans l'Annexe D, les résultats obtenus lors d'expériences de relaxations. Enfin, l'annexe E présente la rhéologie des matériaux vitreux mous.

Bonne lecture.

Première partie

Mécanique cellulaire

Chapitre 1

Cellules et mécanique

Les cellules vivantes sont capables de s'adapter au milieu mécanique qui les entoure. Comme l'homme adapte sa course sur du sable ou résiste si on lui tire le bras, les cellules sont capables de sonder mécaniquement leur milieu et de s'y adapter en modifiant soit localement, soit globalement l'organisation de leur squelette, donc d'« intégrer » un signal mécanique. Cette réorganisation s'effectue grâce à des voies de signalisation qui induisent des cascades de réactions protéiques [Tamada, 2004], comme on déclencherait une série d'action consécutives en appuyant sur un bouton. Si les cellules perdent leur aptitude à « sentir » mécaniquement leur environnement, les tissus qu'elles constituent montrent des signes de disfonctionnement.

Inversement, les cellules sont capables d'engendrer des forces leur permettant de se mouvoir ou de mieux s'ancrer à leur substrat. Par exemple, les globules blancs (leucocytes) migrent à travers les tissus afin de traiter une infection (ici c'est un signal chimique qui déclenche le mouvement). Ou bien, lors de l'embryogenèse, les cellules entament une série de mouvements morphogénétiques en se différenciant afin de devenir fonctionnelles. La production de forces est aussi un aspect essentiel pour le cycle cellulaire. En effet, lors de la cytokinèse (séparation des deux cellules filles à la fin de la division), les deux cellules filles pour se séparer doivent obligatoirement exercer des forces. L'application de ces forces requiert l'adhésion au substrat sur lequel les cellules migrent ou tirent. Il apparaît ainsi que les propriétés mécaniques des cellules vivantes, *i.e.* leurs réponses aux contraintes imposées par leur environnement, sont intimement liées à leurs fonctions biologiques.

1.1 Réponse à un signal mécanique

La cellule a besoin tout au long de sa vie de communiquer avec l'extérieur. Cette communication lui permet de s'adapter à toutes sortes de changements chimiques (chemotaxie) ou mécaniques (mécano-transduction). Au même titre que les molécules qui en se liant à un récepteur transmembranaire spécifique déclenchent une cascade de signalisation, les signaux mécaniques déclenchent eux aussi des séries de processus biologiques d'activation et de production de protéines changeant ainsi le comportement cellulaire. Les cellules lient d'étroites relations avec leur substrat par l'intermédiaire des complexes d'adhésion. Ces complexes relaient l'information mécanique [Chen, 2004] résultant de la déformation d'un tissu ou du cisaillement provoqué par un écoulement. Le toucher et l'ouïe sont deux sens faisant intervenir des voies de signalisation mécaniques. Les modes de réponses à des signaux mécaniques sont très variés. Cela va de l'ouverture mécanique de pores, à la détection du signal mécanique par des complexes protéiques spécialisés (« complexes mécanosenseurs »). Le premier induit un changement de concentration

de certaines molécules, le second induit la réorganisation, le recrutement et la production de protéines. Dans les deux cas la cellule répond à la modification des conditions extérieures en modifiant sa structure interne.

Les canaux ioniques (pores) sont des complexes protéiques transmembranaires qui forment de véritables tunnels permettant des échanges de molécules entre la cellule et son milieu extérieur. Il est possible, sous l'effet d'une force, d'ouvrir un canal ionique en déformant sur les protéines qui le constituent [Zhu, 2000] [Glogauer, 1997]. De manière générale, les canaux ioniques sont liés au cytosquelette. Dans ce contexte, le cytosquelette sert à réguler le trafic d'ions (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^-) de l'intérieur vers l'extérieur [Janmey, 1998].

Les signaux mécaniques reçus à la surface de la cellule peuvent aussi être convertis en un signal biochimique (cascade de signalisation finement contrôlée par la cellule). Cela va de la régulation des complexes d'adhésion à la transcription de gènes [Yang, 2000] [Farge, 2003]. Par exemple, la vibration des cellules ciliées de la chochlée engendrent un potentiel électrique permettant d'envoyer les informations au cerveau [Kennedy, 2003]. Cette transmission du signal mécanique en « action biologique » est appelé mécano-transduction.

Les capteurs mécaniques ne sont pas tous localisés sous la membrane plasmique. Il en existe aussi à la périphérie du noyau. Afin de les activer, il faut que les forces appliquées au niveau de la membrane leurs soient transmises. Le cytosquelette est le support naturel pour cette transmission. Dans ce cadre, tout modèle d'organisation du cytosquelette doit rendre compte de la transmission des efforts au sein de la cellule. À titre d'exemple, le modèle de tenségrité [Ingber, 2003c] [Ingber, 2003d] décrit le cytosquelette comme une structure sous tension composée de poutres liées entre elles par des élastiques et dont l'intégrité dépend de la tension interne. Si l'on déforme la structure à un endroit, les forces sont transmises partout à travers la structure [Maniotis, 1997]. Cet argument est valable car la structure est sous tension, *i.e.* précontrainte. La cellule générerait alors sa forme en accordant adhésion et tension [Pourati, 1998] [Stamenovic, 1999] [Coughlin, 2003]. Pour tester la validité des modèles proposés, ou permettre l'émergence de nouveaux modèles, il est nécessaire de caractériser la réponse mécanique des cellules vivantes à des contraintes mécaniques contrôlées. C'est l'objet de la rhéologie cellulaire.

La première étape du travail, présenté ici, a consisté en la mise au point d'un véritable rhéomètre à cellule unique (Partie II). Les résultats obtenus, observés pour la première fois à l'échelle d'une cellule entière, sont présentés dans la troisième Partie.

1.2 Adhésion

L'adhésion cellulaire intervient dans de nombreux processus physiologiques, comme l'apoptose, la différenciation [Giancotti, 1999], la migration, la polarisation cellulaire [Chen, 2003]. D'un point de vue adhésif, on pourrait diviser l'ensemble des cellules en trois grandes classes : les cellules circulantes ou migrantes, les cellules des tissus épithéliales ou endothéliales, les cellules du tissu conjonctif.

1. Les cellules migrantes ou circulantes, en réponse à un signal biochimique, s'attachent transitoirement aux autres cellules (liaisons hétérophiles : ICAMs).
2. Les cellules épithéliales ou endothéliales s'accrochent à la fois à la lame basale¹ (liaisons hétérophiles : intégrines) et entre elles (liaisons homophiles : cadhérine, occludine, claudine, connectine).

¹La lame (surface) basale est l'opposé de la surface apicale définie comme la surface libre de croître. Par exemple, pour un épithélium, la surface basale est celle qui est en contact avec la matrice extracellulaire (« gel ») et la surface apicale est celle qui est libre (en contact du fluide).

3. Les cellules des tissus conjonctifs s'accrochent tridimensionnellement à la matrice extracellulaire qui les entoure.

De manière générale l'adhésion assure la cohésion des tissus. Par ailleurs, les complexes membranaires d'adhésion, quels qu'ils soient, sont raccordés aux filaments du cytosquelette, principalement à l'actine. En effet, pratiquement toutes les cellules possèdent un réseau d'actine formant une couche à la périphérie des cellules. Ce réseau quasi bidimensionnel est appelé le cortex. En se liant à la membrane via des protéines d'ancrage, il assure à la membrane une tenue mécanique l'empêchant de fluctuer de manière trop importante et permet de réguler les échanges avec l'extérieur. Au sein de ce cortex, les filaments d'actine sont réticulés principalement par deux protéines, la filamine et l' α -actinine. La gelsoline permet, au contraire, une réorganisation rapide du cortex en le dissociant. Les filaments d'actines s'attachent à la membrane par l'intermédiaire de complexes protéiques. L'adhésion à des substrats biologiques (fibronectine, collagène, laminine) est médiée par une famille de protéines transmembranaires, les intégrines. Il existe différentes organisations de complexes d'adhésion² : les complexes focaux, les contacts focaux (forme mature d'un complexe focal), les contacts fibrillaires.

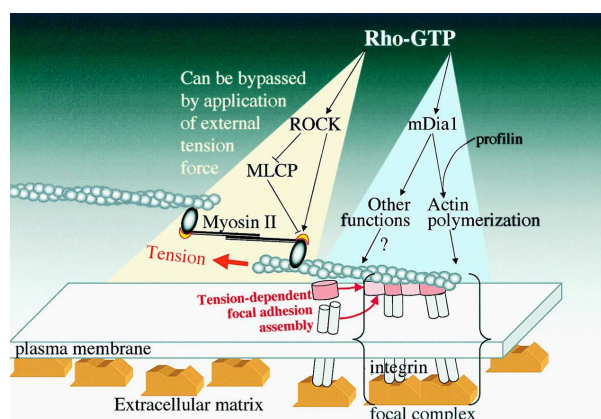


FIG. 1.1 – Le contact focal est formé d'un complexe de protéines. [Riveline, 2001]

- Un complexe focal est le résultat d'une agrégation de protéines transmembranaires, les intégrines. La partie cytosolique des intégrines est ensuite liée aux filaments d'actine par l'intermédiaire d'un échaffaudage de protéines principalement constitué de paxiline, de taline et de vinculine et de *FAK* [Machesky, 1996].
- Les contacts focaux sont des complexes focaux maturés sur lesquels viennent s'attacher des câbles d'actine (fibres de stress), *i.e.* des filaments d'actines parallèles et étroitement liés. La formation de cette assemblée est contrôlée par la famille de protéines Rho [Kaibuchi, 1999] et la tension engendrée par les complexes acto-myosines permet aux fibres de stress de se développer. Les contacts focaux forment des structures allongées. Ces contacts constituent non seulement un ancrage mécanique entre le substrat et la cellule, mais servent également de capteur de force [Bershadsky, 2003] [Nicolas, 2004] [Ingber, 2003b]. Des expériences ont montré que l'on pouvait faire croître ces contacts en leur appliquant une force [Riveline, 2001] [Galbraith, 2002].

²Les complexes d'adhésions présentés ici concernent l'adhésion de cellules déposées sur une surface. On connaît peu de choses de l'adhésion d'une cellule dans une matrice tridimensionnelle car il est difficile de visualiser les complexes d'adhésions.

- Les contacts fibrillaires, à l’instar des complexes focaux, ont une partie transmembranaire constituée d’intégrines. Leur partie cytosolique ne fait intervenir, par contre, que de la tensine. Ces complexes sont dynamiques, *i.e.* mobiles. Ils sont plus petits et moins allongés que les contacts focaux. Ils s’organisent autour des contacts focaux et s’orientent dans le sens de la tension engendrée par les fibres de stress. Ces contacts migrent ensuite, le long des fibres de stress, vers le centre de la cellule [Zamir, 2000]. Si la matrice extracellulaire est trop rigide la formation de ces contacts est réduite [Katz, 2000].

De fait, l’adhésion dépend de la rigidité des substrats³. Des expériences avec des billes recouvertes de fragments de fibronectine (famille de protéines de la matrice extracellulaire qui se lie aux intégrines) et manipulées avec des pinces optiques permet de simuler la rigidité des substrats [Choquet, 1997]. Les auteurs ont observé un renforcement des liens entre intégrines et actine lorsqu’ils augmentaient la force appliquée sur les intégrines via les billes.

Dans ce contexte, nous avons voulu comparer le comportement mécanique de cellules vivantes lorsque des contraintes leur étaient appliquées via différentes protéines de manière spécifique (intégrines, cadhérines) ou de manière non spécifique. Nous rendons compte des résultats obtenus dans la quatrième partie.

1.3 Un exemple de production de force : la migration

L’exemple de production de forces, le plus connu, est la contraction musculaire. Si nos muscles sont capables de se contracter pour exercer des forces, cela signifie que les sous-structures constitutives de nos muscles, *i.e.* nos cellules, possèdent elles aussi cette capacité. La machinerie responsable de la production de forces à l’intérieur de fibres musculaires est le complexe acto-myosine. Le couplage entre le « moteur moléculaire » myosine et les filaments d’actines permet de faire glisser les filaments les uns par rapport aux autres. Ainsi cette machinerie est-elle capable de produire des contractions.

Un deuxième exemple de force développée est la force motrice produite lors de la migration. Par exemple, les fibroblastes de la peau migrent vers les lésions pour ensuite exercer des forces contractiles permettant de rapprocher les deux extrémités de la lésion afin de la cicatrifier [Freyman, 2001]. Pour qu’il y ait effectivement mouvement, la cellule doit être capable de contrôler la polymérisation des filaments de manière coordonnée, de s’ancrer sur son substrat puis de relâcher ses contacts afin d’avancer. Ses attaches sont alors contrôlées par des complexes protéiques transmembranaires d’adhésion.

Les cellules rampantes (fibroblastes, leucocytes, cellules épithéliales), accomplissent un mouvement dirigé en s’allongeant à l’avant et en se rétractant à l’arrière. La protrusion avant, riche en actine, est différente selon les types cellulaires. Par exemple, les kératocytes envoient vers l’avant des lamellipodes (structures planes) et les neutrophiles des pseudopodes (doigts). Étant donné que la cellule adhère au substrat, pour qu’il y ait effectivement mouvement, il faut à un moment que la cellule puisse décrocher une partie de ces attaches. Toute la machinerie de locomotion est contrôlée par des protéines qui assurent un déroulement synchronisé par étapes successives [Rafelski, 2004]. Le moteur de la machinerie est la polymérisation à l’avant et la dépolymérisation à l’arrière. L’avancé se fait en quatre étapes.

1. Tout d’abord les protrusions s’étendent vers l’avant. Cela se fait par polymérisation de l’actine qui vient alors pousser la membrane. Pour optimiser l’extension, *i.e.* optimiser la

³Il est aussi bien connu que les cellules déposées sur un substrat présentant un gradient de rigidité, migrent vers les zones de rigidité élevée [Lo, 2000]. C’est ce qu’on l’on appelle la durotaxie.

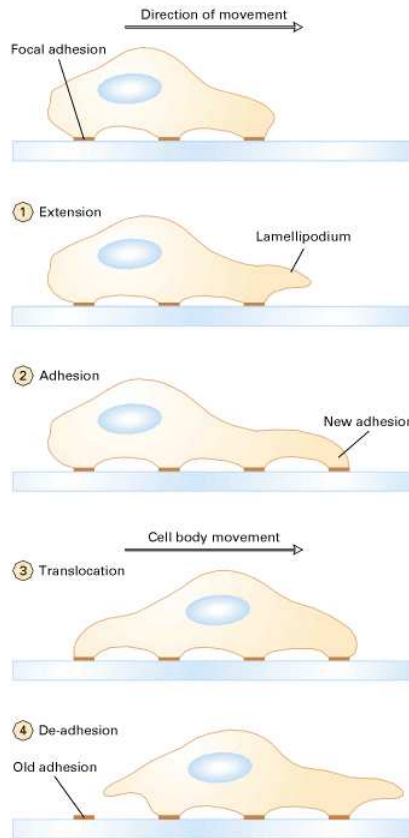


FIG. 1.2 – Les quatre étapes de la migration. (<http://www.uni-leipzig.de/pwm/kas/motility/migration.html>)

polymérisation de l'actine à l'avant, des monomères d'actine supplémentaires dépolymérisés ailleurs [Weiner, 1999] sont apportés entre la membrane et le réseau déjà formé. Un complexe protéique Arp2/3 [Welch, 1998] permet de ramifier le réseau d'actine et stoppe la dépolymérisation à l'extrémité moins⁴. En plus, ce complexe est capable de nucléer de nouveaux filaments. C'est la croissance de ces nouveaux filaments qui poussent la membrane. Les myosines servent à rendre la poussée plus efficace [Jay, 1995].

2. La deuxième étape consiste à attacher l'extension au substrat [Felsenfeld, 1996] [Smilenov, 1999] dans le but de créer un nouveau point de fixation à partir duquel pourra repousser une nouvelle extension. À l'avant des lamellipodes, on peut observer que la membrane fait des sortes de vagues, comme si la cellule par cela était capable de sonder son environnement comme un aveugle avec sa canne [Giannone, 2004].
3. Ensuite le noyau est déplacé vers l'avant de la protrusion [Svitkina, 1997]. On pense que c'est le cortex qui en se contractant pousse le noyau.
4. La dernière étape consiste à détacher la partie arrière afin d'achever la contraction. Ainsi la cellule se déplace en coordonnant ces quatre étapes.

Nous avons employé notre rhéomètre à cellule unique comme un appareil de mesure de la force exercée par la cellule lors de son étalement. Les résultats préliminaires, montrant notamment une

⁴L'extrémité moins d'un filament d'actine est l'extrémité qui polymérise la moins vite.

adaptation de la force développée par la cellule à la raideur des lamelles de verre, sont exposés dans la quatrième partie.

Chapitre 2

L'acteur : le cytosquelette

Plus une cellule est volumineuse et plus ses structures internes (ses organelles) sont spécialisées et doivent être organisées puis coordonnées en son sein. Il faut pour cela une tierce structure capable de contrôler les mouvements des organelles et capable de les maintenir à leur place quand cela est nécessaire. C'est probablement la raison qui a conduit les cellules eucaryotes (possédant un noyau et un cytoplasme distincts) à développer, au cours de l'évolution, un squelette interne : le cytosquelette. Les bactéries, par exemple, ne possèdent pas de telles structures. Le cytosquelette est un réseau complexe composé de filaments protéiques s'étendant à travers toute la cellule. Ces filaments constituent en quelques sortes une charpente faite de poutres, d'étrésillons, de croisillons et d'entretoises. Cette charpente assure donc le maintien mécanique de la cellule. C'est sur elle, en effet, que repose la forme des cellules eucaryotes. Contrairement au squelette humain, le cytosquelette est une structure très dynamique, qui en se réorganisant permet à la cellule de changer rapidement de forme afin de s'adapter à son environnement. Il a aussi été clairement établi que le cytosquelette était la machinerie responsable des mouvements cellulaires [Albrecht-Buelher, 1980] [Bray, 2001]. Le cytosquelette a donc trois fonctions au sein de la cellule : gestion de l'organisation interne, support mécanique et moteur de mouvements. D'un point de vue mécanique, le maintien est assuré par l'élasticité des filaments. D'un point de vue biochimique, ce sont les mécanismes de polymérisation-dépolymérisation qui confère à l'édifice sa nature dynamique. Les différents filaments constituant la structure du cytosquelette sont reliés entre eux par des protéines en charge à la fois de l'organisation interne et de la production de mouvements.

Le cytosquelette ne participe pas seulement à la vie de la cellule en lui offrant une base mécanique lui permettant d'organiser son espace intérieur et de se mouvoir. Il participe également aux prises de décisions en ouvrant des voies de signalisation, soit par des mécanismes d'ouverture de canaux ioniques, soit en faisant le relais d'un signal mécanique entre la membrane et le noyau [Janmey, 1998] [Zhu, 2000]. Dans ce dernier cas, il est donc médiateur d'une expression biologique (génétique) venant répondre à un signal mécanique : la mécanotransduction.

Le cytosquelette est constitué de filaments protéiques (polymères). Il y existe trois types de filaments : les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules. À chaque type de filament est associé un monomère. Les réseaux constitués par ces polymères ne s'organisent pas de la même manière et n'ont donc pas les mêmes fonctions au sein de la cellule. Il est cependant extrêmement difficile de discerner le rôle individuel de chacun.

2.1 F-actine

Les filaments d'actine (F-actine, F pour filament) résultent de la polymérisation de monomères d'actine (G-actine, G pour globulaire). L'actine est une protéine très abondante présente dans les cellules eucaryotes. Elle représente 5 – 10% du nombre de protéines présentes dans la cellule. La proportion atteint même 20% dans les muscles. L'actine est une protéine globulaire composée d'une chaîne unique de 375 acides aminés et dont le poids moléculaire est de $42kDa^5$. Le gène exprimant cette protéine présente la particularité d'avoir peu muté au cours de l'évolution.

2.1.1 Filaments dynamiques

La concentration critique de G-actine se situe autour de $0,2\mu M$ [Bray, 2001]. Au dessus, de cette concentration les monomères polymérisent spontanément. La concentration de monomères d'actine dans la cellule est bien supérieure à cette valeur. La cellule a donc mis au point des stratégies empêchant la majeure partie de son actine monomérique de polymériser. La polymérisation des monomères d'actine conduit à la formation de filaments présentant un arrangement hélicoïdal (Fig 2.1) dont le pas est de $37nm$ [Bamburg, 1999b], dont le diamètre est de $7nm$ [Milligan, 1990] et dont la longueur varie entre quelques micromètres et une cinquantaine de micromètres [Isambert, 1996]. La longueur de persistance des filaments d'actine, *i.e.* la distance sur laquelle est corrélée l'orientation des monomères, est d'environ $15\mu m$ [Gittes, 1993] [Ott, 1993]. À l'échelle de la cellule ce sont donc des polymères semi-flexibles.

Les filaments d'actine sont polarisés. Cette polarisation provient de l'asymétrie du monomère d'actine [Kabsch, 1990]. Une des deux extrémités du monomère, dite moins, présente un site de fixation pour une molécule d'ATP (adénosine triphosphate). L'autre extrémité sera dite plus. Une fois lié à l'ATP les monomères d'actine s'assemblent. Cet assemblage a pour effet d'hydrolyser la molécule d'ATP en ADP (adénosine diphosphate). Puis l'hydrolyse réduit l'affinité des monomères entre eux, ce qui favorise la dépolymérisation. Ces phénomènes expliquent donc la nature dynamique de tels filaments. En effet, les extrémités des filaments polymérisent et dépolymérisent constamment et c'est parce que les vitesses⁶ de polymérisation et de dépolymérisation sont différentes que le filament peut croître. Reconsidérant maintenant l'asymétrie de la molécule d'actine [Rafelski, 2004], il en résulte que les vitesses de polymérisation et de dépolymérisation des deux extrémités sont elles aussi différentes [Pollard, 1986]. Quand il a atteint sa taille d'équilibre, la polymérisation du coté (+) est compensée par la dépolymérisation du coté (-). Si on suit un monomère d'actine venant d'être incorporé à l'extrémité (+), on constate que le filament garde une longueur constante et que le monomère marqué se déplace vers l'extrémité (-). Ce phénomène est connu sous le nom de *treadmilling* ("tapis roulant"). Par ailleurs, une des stratégies mise en place par la cellule afin de contrôler sa concentration en F-actine est la modulation du temps de phosphorylation d'une molécule d'ADP en ATP (de l'ordre de plusieurs minutes).

La fonction principale des filaments d'actine est de servir de base aux mouvements. Par exemple, ce sont eux qui étayent l'avancée des lamellipodes, feuillet guidant la migration de certaines cellules. Ce sont encore eux que l'on retrouve comme constituant principal de l'appareil contractile des cellules musculaires. Afin d'être capable de générer de tels mouvements les filaments d'actine ne sont pas seuls. Il existe toute une batterie de protéines associées servant à faire glisser les filaments les uns par rapport aux autres, à nucléer de nouveaux filaments, à les stabiliser et à les joindre entre eux afin de former des réseaux ou des fibres.

⁵Dalton (Da) = Unité de poids moléculaire correspondant à la masse d'un atome d'hydrogène

⁶de l'ordre de $0,5\text{monomere}\cdot\text{s}^{-1}$

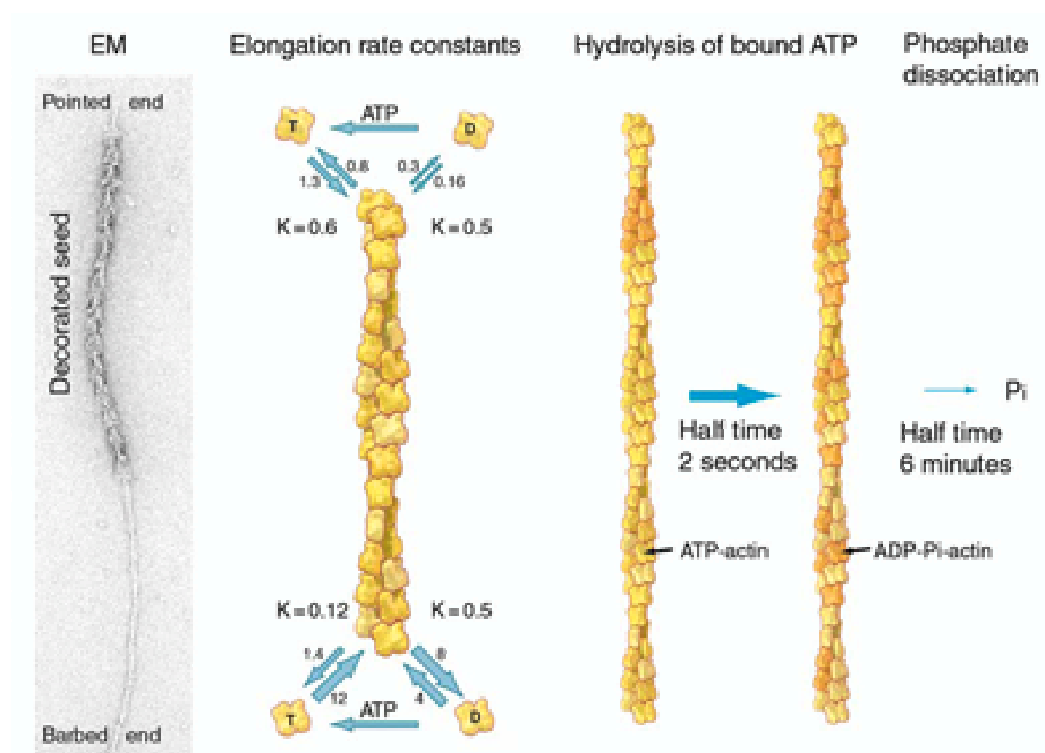


FIG. 2.1 – À gauche, on peut voir une image en microscopie électronique d'un filament d'actine. Les schéma illustrent : 1) la manière dont le filament polymérise avec les molécules d'ATP lié aux monomères d'actine ; 2) l'hydrolyse, qui réduit l'affinité entre monomères au sein du filament, favorise ainsi la dépolymérisation de celui-ci. [Pollard, 1982]

2.1.2 Protéines associées

Les monomères d'actine polymérisent sur les filaments d'actine assez rapidement. Cependant si l'on prépare une solution d'actine avec les bons réactifs et dans les bonnes conditions (température, pH) pour que la polymérisation ait lieu, on observe une phase de latence correspondant à la nucléation de nouveaux filaments. Cette nucléation n'est donc pas spontanée. Par conséquent, la cellule possède des protéines ayant pour fonction la nucléation des nouveaux filaments. Il semblerait que VASP et les protéines du complexe Arp2/3 soient responsables de la nucléation, tout du moins en ce qui concerne les filaments proches de la membrane plasmique [Welch, 1998].

Outre le temps d'échange ADP-ATP, il existe une protéine permettant de bloquer l'ADP sur le monomère d'actine : la thymosine [Safer, 1994]. Le monomère d'actine ainsi lié à la thymosine ne peut se lier au filament déjà préexistant. Ceci permet à la cellule de maintenir une concentration d'actine monomérique voisine de $100\mu M$. La faible affinité du complexe thymosine-actine permet à la cellule, quand elle a besoin d'actine, de dissocier ce complexe pour libérer les monomères d'actine.

La longueur des filaments est contrôlée par des protéines comme la cofiline [Lappalainen, 1997] [Bamburg, 1999a] ou la profiline [Tilney, 1982]. Ces protéines se lient aux monomères d'actine. La profiline a pour but d'accélérer la polymérisation à l'extrémité plus des filaments en catalysant l'échange ATP-ADP en réponse à un stimulus externe. Cette protéine est préférentiellement associée à la membrane plasmique et jouerait un rôle dans la migration. La cofiline accélère quant à elle la dépolymérisation à l'extrémité moins du filament. Ces deux protéines jouent donc

un rôle complémentaire dans le contrôle de la croissance des filaments (Fig 2.2).

Une autre classe importante de protéines liées aux filaments d'actine servent à ponter les filaments entre eux afin de former soit des faisceaux ou des gels tridimensionnels. Par exemple, l' α -actinine pontre latéralement les filaments entre eux afin de former un faisceau de filaments [Blanchard, 1989]. La fimbrine associe les filaments en faisceaux plus serrés que ne le fait l' α -actinine [Furukawa, 1997]. À l'intérieur de la cellule, les faisceaux sont situés soit entre les points focaux d'adhésion (fibre de tension), soit dans les filopodes (faisceaux serrés) qui sont des sortes de doigts permettant à la cellule de sonder son environnement. On peut aussi former des gels tridimensionnels grâce à la fimbrine [Matsudaira, 1991]. Ce gel peut être réorganisé grâce à la gelsoline dont un des rôles est de couper les liens entre filaments appariés [Way, 1993]. Les gels d'actine sont localisés sous la membrane plasmique, dans ce que l'on appelle le cortex. La plupart de ces protéines sont calcium-dépendantes et sont activées à la suite de cascades signalétiques pouvant être très complexes faisant intervenir des phosphoinositides tel PIP_2 en ce qui concerne le cortex et les molécules d'adhésion en ce qui concerne les fibres de tension.

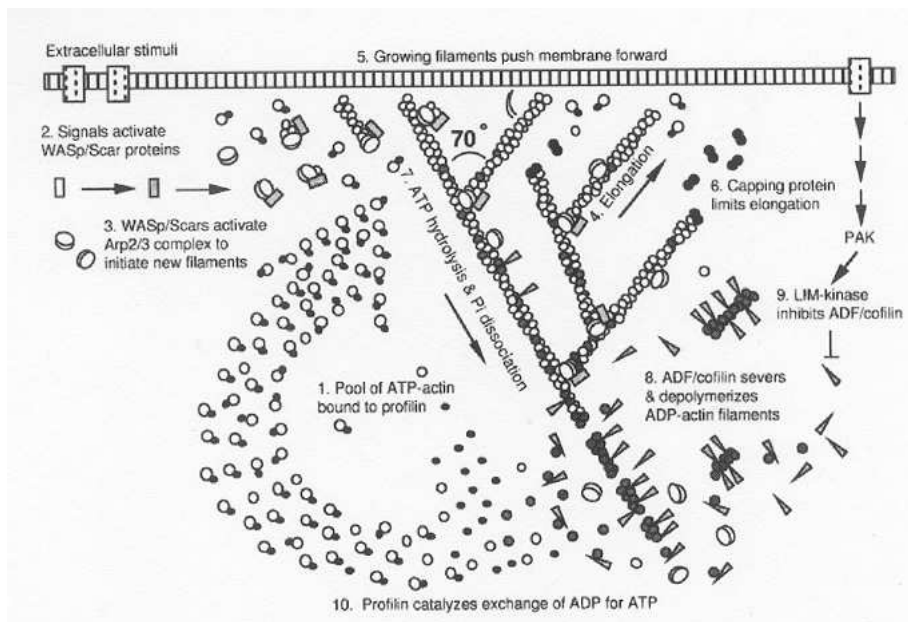


FIG. 2.2 – Illustration de la manière dont certaines protéines associées à l'actine permettent d'organiser le réseau des filaments d'actine. [Pollard, 2000]

La dernière famille de protéines associées à l'actine et non la moindre - car permettant de générer les contractions musculaires ainsi que les mouvements cellulaires - est celle des myosines. Les myosines sont des moteurs moléculaires capables de se mouvoir le long des filaments d'actine. Il existe 7 classes de myosines [Bray, 2001]. Toutes présentent une tête qui se lie au filament et qui en hydrolysant l'ATP trouve l'énergie nécessaire pour pouvoir se déplacer le long de ce filament. La myosine la plus connue est la myosine II. C'est elle qui est à l'origine de la contraction musculaire [Cooke, 1986]. Pour ce faire, les myosines s'associent entre elles et font glisser les filaments d'actine les uns par rapport aux autres dans une structure appelée sarcomère (Fig 2.3). La myosine I est quant à elle impliquée dans le transport de vésicules [Adams, 1989]. La myosine V sert au transport et à l'arrimage des organelles dans la cellule [Titus, 1997].

Il existe nombre d'autres protéines liées à l'actine, nous n'avons cité ici que celles qui ont un rôle "important" pour l'organisation et le fonctionnement du réseau d'actine.

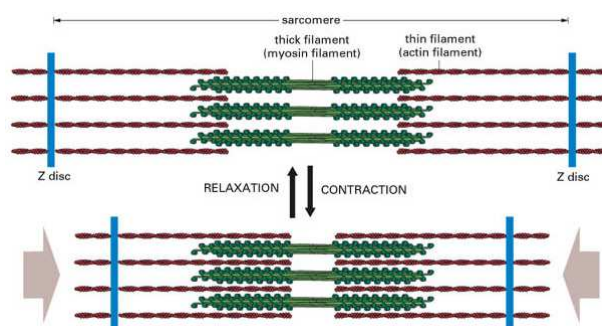


FIG. 2.3 – Le sarcomère est l’unité fondamentale de l’appareil contractile musculaire. Les myosines regroupées en filaments rapprochent deux faisceaux de filaments d’actine. [Alberts, 1994]

2.2 Microtubules

Les microtubules résultent de la polymérisation d’une protéine : la tubuline. La tubuline compte dans sa séquence environ 450 acides aminés pour un poids moléculaire de $50kDa$. Contrairement à l’actine, la tubuline présente plusieurs isoformes classées en deux variétés : l’ α -tubuline et la β -tubuline. *In vivo*, on ne trouve jamais la tubuline sous forme monomérique. La forme stable est en fait un hétérodimère constitué d’un monomère d’ α -tubuline et d’un monomère de β -tubuline. Une autre différence remarquable entre les filaments d’actine et les microtubules est que la proportion de ces derniers dans les cellules eucaryotes est beaucoup moins importante que celle des filaments d’actine. De plus, alors que les filaments d’actine s’organisent soit en faisceaux soit en réseaux complexes, les microtubules sont eux solitaires. Les microtubules sont représentés en grand nombre dans les cellules nerveuses. Ils représentent environ 15% des protéines solubles dans le cerveau des vertébrés.

2.2.1 Instabilité dynamique

Le processus de polymérisation des microtubules requiert de l’énergie comme pour la polymérisation des filaments d’actine. Cependant la polymérisation des hétérodimères de tubuline requiert non pas de l’ATP mais du GTP, guanine triphosphate. Les hétérodimères de tubuline forment en premier lieu des protofilaments, qui sont des arrangements linéaires et polarisés. la polarisation de ces derniers résulte de l’asymétrie du dimère d’ α -tubuline et de β -tubuline. Ensuite ces protofilaments s’organisent parallèlement par 13 pour former un cylindre creux, lui même ayant une structure polaire (Fig 2.4). Le diamètre externe de ces cylindres est d’environ $25nm$ et le diamètre interne d’environ $14nm$ [Wade, 1998]. Leur longueur moyenne se situe entre $1\mu m$ et $10\mu m$ [Bray, 2001] mais ils peuvent aussi bien souvent atteindre plusieurs dizaines voire quelques centaines de microns dans les cils ou les axones.

Comme pour les filaments d’actine, la croissance des deux extrémités ne s’effectue pas à la même vitesse [Rodionov, 1997]. L’extrémité à croissance rapide est appelée extrémité (+), l’autre à croissance moins rapide est appelée extrémité (-). Les dimères de tubuline portent deux molécules de GTP. L’une est attachée à l’ α -tubuline et est enfermée à l’intérieur du dimère, l’autre est liée à la β -tubuline. L’hydrolyse du GTP lié à la β -tubuline en GDP provoque la déstabilisation du polymère et conduit rapidement à son désassemblage. Ce phénomène est connu sous le nom d’instabilité dynamique [Walker, 1988]. Cette instabilité est d’une importance fondamentale. Elle permet par exemple de réorganiser rapidement le réseau de microtubules lors de la mitose afin

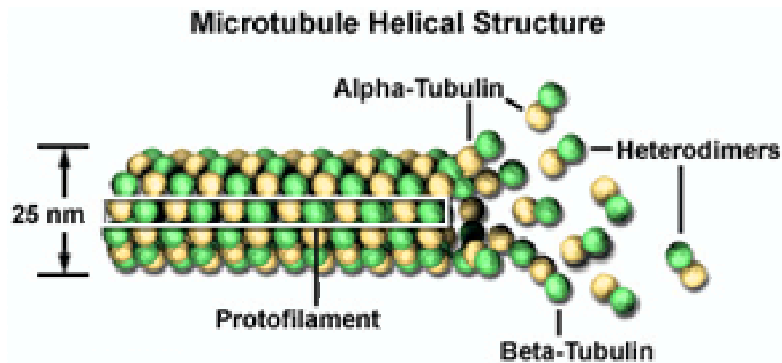


FIG. 2.4 – Structure en tonneau des microtubules résultant de l’assemblage d’hétérodimère d’ α -tubuline et de β -tubuline. (<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/microtubules/microtubules.html>)

de former le fuseau mitotique ou bien encore de polariser la cellule en ne faisant croître les microtubules que dans une région particulière du cytoplasme à l’aide de protéines qui leur sont associées.

Les microtubules poussent à partir d’un centre nucléateur : le centrosome. Le centrosome en interphase se situe à côté du noyau. Il est composé de deux centrioles et du matériel péri-centriolaire entourant les deux centrioles. C’est sur cette partie périphérique⁷ que sont nucléés les nouveaux filaments [Zheng, 1995]. À partir de ce centre nucléateur, les microtubules s’organisent en étoile (ou aster) [Mitchison, 1984]. Les extrémités moins sont situées au niveau du centrosome, *i.e.* proche du noyau donc du centre de la cellule. Les extrémités plus se trouvent au voisinage de la membrane plasmique.

Du fait de leur structure cylindrique, les microtubules sont résistants aux compressions [Mitchison, 1992]. En effet, cette structure en tonneau confère aux microtubules un module élastique de courbure environ 300 fois plus grand que celui des filaments d’actine. Cela implique que les microtubules flambent beaucoup moins facilement. C’est ce qui pourrait expliquer que les microtubules s’associent rarement entre eux, la structure d’un filament étant assez rigide pour qu’il puisse supporter seul les contraintes.

2.2.2 Stabilisation et transport des organelles

Comme un microtubule est intrinséquement instable, *i.e.* qu’il peut de manière complètement stochastique dépolymériser entièrement, il existe des protéines qui en s’y associant à eux permettent de le stabiliser. On les appelle les MAP pour *Microtubule-associated proteins*. Par exemple la protéine tau aide à l’assemblage des microtubules mais aussi les stabilise en se liant le long des microtubules [Drechsel, 1992]. Une autre protéine la stathmine/Op18 peut soit bloquer la polymérisation des microtubules [Lawler, 1998], soit au contraire les stabiliser quand ses quatre domaines se liant à la sérine sont phosphorylés [Belmont, 1996]. CLIP-170 se lie par un mécanisme de phosphorylation à l’extrémité plus des microtubule évitant ainsi qu’il ne dépolymérise [Bray, 2001].

De la même manière que les filaments d’actine possèdent leurs moteurs moléculaires, les microtubules ont deux moteurs qui leur sont associés : les kinésines et les dynéines. Tous deux utilisent l’énergie provenant de l’hydrolyse de l’ATP afin de se déplacer le long des microtubules.

⁷à partir de la γ -tubuline

Les kinésines regroupent une famille de protéines se déplaçant vers l'extrémité plus des microtubules [Vale, 1985] [Block, 1995]. Les dynéines regroupent quant à elles une famille de protéines se déplaçant vers l'extrémité moins des microtubules [Hirokawa, 1998]. Ces moteurs ne servent pas à produire de mouvements contractiles comme les myosines conventionnelles. Leur utilité se situe au niveau du transport des organelles et des vésicules. Les dynéines⁸ sont donc utilisées dans le but de ramener les organelles près du noyau, alors que les kinésines sont utilisées au contraire pour les en éloigner. Ces deux familles de protéines sont donc en charge du trafic intracellulaire.

La liste des protéines associées aux microtubules n'est pas exhaustive. Il en existe un grand nombre, notamment celles utilisées pour former les faisceaux que l'on trouve dans les cils et les axones.

2.3 Filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires tirent leur nom de leur diamètre qui est intermédiaire entre celui des filaments d'actine et celui des filaments de myosines. En effet, ils ont pour la première fois été observés dans les muscles striés. Par voie de fait, il se trouve que leur diamètre d'environ $10nm$ est aussi intermédiaire entre celui des filaments d'actine et celui des microtubules. Les filaments intermédiaires sont constitués de protéines fibreuses dont la séquence et la structure sont bien plus variées que celles de leurs homologues, actine et tubuline. La principale fonction qui leur est attribuée est le maintien de l'intégrité mécanique cellulaire.

2.3.1 Famille très diversifiée

Chez l'humain, il existe plus de 50 types de filaments intermédiaires. Malgré cette diversité, l'assemblage des protéines les constituant, conduit à la formation de fibres résistantes et insolubles dans la plupart des tampons biologiques. Ces fibres présentent toutes une partie centrale constituée d'environ 310 acides aminés formant un dimère superenroulé de deux chaînes polypeptidiques qui sont la répétition d'heptades, motif de sept acides aminés. La partie centrale est flanquée à ses extrémités d'une tête N-terminale et d'une queue C-terminale [Fuchs, 1994]. Ces parties terminales en se liant latéralement à un autre dimère avec les extrémités tête-bêches conduisent à la formation d'un tétramère stable. Ensuite les tétramères s'empaquent en un arrangement hélicoïdal afin de former le filament intermédiaire [Stewart, 1993] (Fig 2.5). L'association antiparallèle des dimères pour former des tétramères a pour conséquence que ces tétramères et donc les filaments intermédiaires ne sont pas polarisés.

Vraisemblablement, il semblerait que la famille des lamines ait été le premier type de filaments intermédiaires apparu dans l'évolution [Alberts, 1994]. Les lamines (type V) s'organisent en un réseau bidimensionnel sous la membrane interne du noyau la lamina nucléaire. Ce réseau est ponctué de pores permettant aux macromolécules d'atteindre le noyau. La lamina nucléaire se dissocie rapidement en début de mitose pour se reformer en fin de mitose. Cette enveloppe est un support mécanique nécessaire pour la réplication de l'ADN [Moir, 2000].

La famille des filaments intermédiaires la plus variée est celle des kératines (type I et II). On les trouve abondamment dans les cellules épithéliales, notamment celles de la peau et celles des poils. Les membres de cette famille sont capables de s'assembler entre eux pour former des filaments. Les interactions entre ces protéines sont connues pour être les plus résistantes de la nature [Bray, 2001]. Les filaments de kératines s'étendent du noyau auquel ils sont attachés jusqu'à proximité de la membrane sur les desmosomes, plaque dense de protéines spécialisées

⁸L'attachement des dynéines aux vésicules se fait via un complexe protéique appelé dynactine [Holleran, 1998]

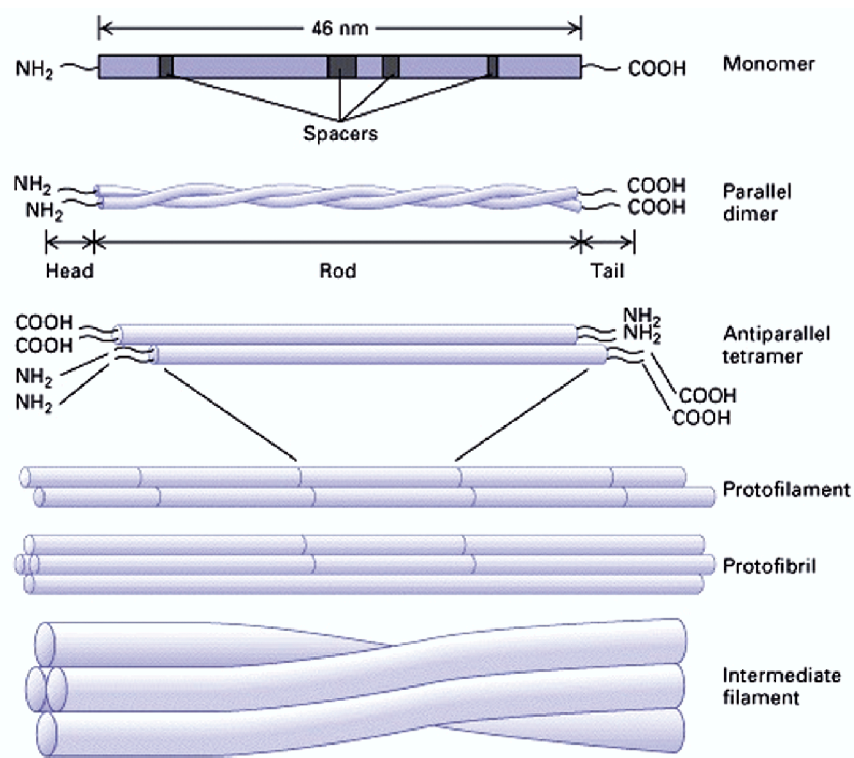


FIG. 2.5 – Du monomère au filament intermédiaire. [Lodish, 2000]

dans la jonction cellule-cellule, où ils s'ancrent. De la même manière, ils relient noyau et matrice extracellulaire via les hémidesmosomes, analogue aux desmosomes mais situés sur la surface basale [Mogensen, 1998].

Les filaments intermédiaires de type III, contrairement aux filaments intermédiaires de type I et II, ne forment que des homopolymères. Le type III comprend entre autres : les filaments de vimentine (filaments auxquels nous nous intéresserons par la suite) et les filaments de desmine. Le réseau de vimentine s'étend à travers toute la cellule et ses associations avec les microtubules et les microfilaments permettent de le stabiliser. Si l'on dissocie, par exemple, le réseau de microtubule, alors le réseau de filaments de vimentine s'effondre [Pralhad, 1998]. La desmine est la protéine des filaments intermédiaires spécifique des cellules musculaires. Dans les cellules du muscle squelettique, les filaments de desmine servent à coordonner la contraction des myofibrilles individuelles en liant les sarcomères adjacents à la fois entre eux et aussi à la membrane plasmique [Danowski, 1992]. Dans les cellules du muscle lisse, les filaments de desmines offrent une résistance mécanique à l'élongation des cellules [Bray, 2001].

Encore une fois la liste des filaments intermédiaires présentée ici n'est pas exhaustive. J'ai présenté les principaux types qui nous intéressent pour la compréhension des propriétés mécaniques des cellules avec lesquelles nous avons travaillé. J'ai donc passé sous silence les neurofilaments qui sont exprimés dans les cellules nerveuses.

2.3.2 Résistance mécanique et structure du cytoplasme

Les tétramères constitués de protéines fibreuses s'associent pour former la structure hélicoïdale du filament intermédiaire lui garantissant ainsi une résistance mécanique aux forces d'étirement [Janmey, 1991b]. De plus les filaments intermédiaires se trouvent être connectés au réseau

de microtubules et à celui d'actine via une famille de protéines : les plakines. Cette famille de protéines très versatiles permet de lier les différents éléments du cytosquelette en une structure unique. Ainsi, en plus de la résistance mécanique que confère les filaments intermédiaires, ils servent à structurer le cytoplasme. Le membre principal de la famille des plakines est la plectine [Wiche, 1998] [Yang, 1996]. La plectine est une grosse protéine de $500kDa$ (10 fois supérieure à la tubuline ou l'actine). Elle a de nombreuses isoformes ayant des domaines de liaisons pour ses homologues (liaisons homophiles), pour la vimentine, pour les lamines ainsi que pour les MAPs. Une autre protéine importante de la famille des plakines est la BPAG1 qui existe aussi sous plusieurs isoformes avec des domaines ayant des affinités avec les microtubules et avec les protéines associées à l'actine et aux filaments intermédiaires.

2.4 Conclusion

Le cytosquelette est constitué de filaments protéiques soutenant l'architecture cellulaire. Son rôle est primordiale. Il permet d'éviter que la structure cellulaire s'effondre sur elle-même. De plus, en maintenant la membrane loin du noyau, sa présence aide au positionnement des organelles et facilite le trafic intracellulaire. Mais sa plus grande utilité est sûrement de préserver les cellules des contraintes extérieures. En effet, la plupart des cellules subissent continuellement des contraintes (keratynocytes de l'épiderme, cellules sanguines, cellules pulmonaires, cellules musculaires, etc...). Il faut donc que le cytosquelette aient des propriétés mécaniques adéquates permettant à la cellule de se déformer sous l'effet de ces contraintes sans en altérer son bon fonctionnement. La compréhension des liens qui existent entre propriétés mécaniques cellulaires et fonctions biologiques passe tout d'abord par la mesure rhéologique des propriétés mécaniques. Je décrirai dans le chapitre suivant les différentes méthodes permettant de mesurer ces propriétés. Puis dans la deuxième partie, je montrerai comment, pour la première fois, nous avons pu mettre au point un rhéomètre à cellule unique grâce auquel on sollicite l'ensemble du cytosquelette. Enfin, j'exposerai les résultats de nos mesures dans la troisième partie. Après avoir effectué cette étape d'ordre zéro et malgré l'interconnection étroite des trois sous réseaux, il serait intéressant de déterminer la contribution de chacun aux propriétés mécaniques de la cellule.

Chapitre 3

Étape 0 : comprendre les propriétés mécaniques passives

Comme nous l'avons vu précédemment, les propriétés mécaniques conditionnent en grande partie le fonctionnement des cellules. Une altération de ces propriétés peut conduire à un dysfonctionnement des cellules [Ingber, 2003a] et du tissu qu'elles constituent, induisant ainsi des maladies comme l'épidermolyse bulleuse [Fuchs, 1992], la drépanocytose [Canalli, 2004], l'asthme [Fabry, 2003a] ou encore certaines myopathies [Olive-Plana, 2003]. La plupart ces maladies résultent d'une erreur d'expression d'un gène codant pour une protéine du cytosquelette perturbant ainsi son intégrité mécanique. On comprend alors que pour percer les mécanismes de ces maladies mais aussi des problèmes plus fondamentaux comme la migration cellulaire ou les cascades signalétiques mécaniquement activées, il faille investir ce vaste champ de recherche qu'est la mécanique cellulaire dans l'espoir de remonter à l'organisation de la structure afin de mieux comprendre ses altérations et ses dysfonctionnements.

Avant de s'intéresser aux cellules, faute de moyens techniques, les recherches en biomécanique s'étaient penchées au début des années⁹ 70 sur la mécanique des tissus comme les muscles, la peau, les cartilages, les os [Fung, 1984] et les poumons [Hildebrandt, 1970]. Les premières investigations en mécanique cellulaire, au milieu des années 70 et au début des années 80, se sont tournées vers le globule rouge en sondant le module surfacique de courbure élastique par aspiration avec une micropipette [Evans, 1976b]. Aujourd'hui les recherches se portent sur un très grand nombre d'espèces cellulaires avec des méthodes expérimentales très variées. Cependant bien qu'il semble y avoir un consensus sur la nature viscoélastique de ces objets, deux écoles s'affrontent encore à l'heure actuelle. La plus ancienne et la plus représentée, décrit le comportement mécanique de la cellule par des modèles mécaniques équivalents formés d'un nombre fini de ressorts et d'amortisseurs. Les modèles mécaniques proposées, bien que très différents d'une expérience à l'autre, ont alors en commun d'attribuer à la cellule un nombre fini de temps de relaxation. Au début des années 2000, apparaît une seconde école qui à partir de mesures rhéologiques dynamiques, montre au contraire que la cellule est caractérisée par un continuum de temps de relaxation. Avant de s'intéresser aux résultats obtenus par les différentes techniques sur cellule vivante, on commencera par exposer les mesures effectuées *in vitro* sur des "cytosquelettes synthétiques" d'actine. Puis nous nous pencherons, dans un premier temps, sur les mesures sur cellules faisant apparaître un nombre fini de temps de relaxation et sur les modèles méca-

⁹Ces recherches ont de fait débuté des siècles auparavant avec notamment Borelli (1680) et Hooke (1664) [Singer, 1959]. Mais ces recherches aussi importantes furent elles ne déclenchèrent pas une vague d'investigation à l'échelle de la communauté entière.

riques utilisés permettant d'en rendre compte. Enfin, nous exposerons les résultats de rhéologie dynamique faisant apparaître un continuum de temps de relaxation.

3.1 Cytosquelettes synthétiques

Afin de mimer et d'identifier la contribution au comportement mécanique du cytosquelette de chacun des trois sous-réseaux de polymères formant le cytosquelette, des mesures rhéologiques sur des gels élaborés à partir de chacun de ces filaments ont été réalisées. Les trois sous réseaux n'ont cependant pas bénéficié du même traitement. La grande majorité des mesures réalisées concerne les gels d'actine. Ceci tient probablement au fait que l'actine joue un rôle central dans de nombreux processus biologiques tels que la migration [Rafelski, 2004], le renforcement des contacts focaux lors de l'adhésion [Delanoé-Ayari, 2004] ou bien encore le modelage des vésicules d'endocytoses ou d'exocytoses [Shafer, 2003], mais surtout parce que les solutions de F-actine constituent le paradigme pour les polymères semi-flexibles.

3.1.1 "Solutions" de F-actine

L'actine *in vitro*, sous certaines conditions, forme des "solutions"¹⁰ de filaments dont la longueur est comprise entre $5\mu\text{m}$ et $20\mu\text{m}$ avec une longueur de persistance d'environ $15\mu\text{m}$ [Gittes, 1993] [Ott, 1993]. Du fait de leur semi-flexibilité, les polymères d'actine en solution s'enchevêtrent même à basse concentration pour former des gels non réticulés dont la maille ξ varie en fonction de la concentration en monomère c_A comme $\xi = \frac{0.3}{\sqrt{c_A}}$ [Schmidt, 1989]. À cause de l'encombrement stérique résultant de la présence des autres, un filament voit ses possibilités de mouvement réduites. Les temps du système sont le temps de réptation $\tau_r = 10^4\text{s}$ et le temps d'enchevêtrement $\tau_e = 0.1\text{s}$ [Gardel, 2003], ce qui correspond à des fréquences allant de 10^{-4}s^{-1} à 10s^{-1} . On s'attend donc à ce qu'en dessous de 10s^{-1} , le module élastique $G'(\omega)$ reste constant¹¹. Or, il est observé que ce module croît avec ω pour des fréquences inférieures à 10s^{-1} et qu'il n'atteint un plateau qu'à des fréquences bien plus basses que $0,1\text{s}^{-1}$. La valeur du plateau a longtemps été un sujet de dispute entre mesures macroscopiques (échantillon de taille millimétrique sondés avec un rhéomètre classique) et mesures microscopiques (bille de quelques microns de diamètre incorporées à la "solution") et entre mesures microscopiques elles mêmes. Mais des arguments théoriques sont venus démontrer que pour calculer un module élastique correspondant au module élastique macroscopique $G'(\omega)$, il fallait prendre en compte la longueur des filaments, la taille de la sonde et la géométrie de la contrainte [Maggs, 1998]. Ces arguments ont été validés par des mesures macroscopiques effectuées à partir d'un rhéomètre rotatif cylindrique et des mesures microscopiques effectuées sur les mêmes échantillons à l'aide de billes magnétiques enchassées dans le réseau d'actine et manipulées avec un champ magnétique pour des fréquences comprises entre 10^{-3}s^{-1} et 2.10^{-2}s^{-1} [Schmidt, 2000]. En ce qui concerne la gamme de fréquence sur laquelle le module élastique est croissant, on observe à partir des fluctuations thermiques de billes enchassées dans le réseau d'actine [Amblard, 1996][Gittes, 1997] que le déplacement quadratique moyen se comportait comme $t^{3/4}$ sur un domaine de fréquence allant de $0,5.10^{-1}\text{s}^{-1}$ à 10^2s^{-1} . Ces observations ont été appuyées par des mesures de pinces magnétiques [Schmidt, 2000] donnant $G'(\omega) \propto \omega^{3/4}$. Ce comportement anormal à ces fréquences du module élastique a pu être expliqué par les relaxations longitudinales de la conformation des chaînes

¹⁰L'actine polymérise dans un F-tampon [Tempel, 1996]. On appelle "solution" une telle préparation à laquelle on n'ajoute pas de protéine se liant à l'actine (*Actin Binding Protein*).

¹¹Car pour une sollicitation avec un temps caractéristique supérieur au temps d'enchevêtrement, les filaments peuvent "glisser". Par contre pour des temps inférieurs, le matériau n'a pas le temps de se réorganiser.

dans le solvant [Gittes, 1998][Morse, 1998a][Morse, 1998b]. Par ailleurs des mesures de rhéologie à deux points [Crocker, 2000], *i.e.* des mesures de la corrélation du déplacement quadratique moyen de deux particules diffusant dans le réseau d'actine, ont aussi permis de réconcilier mesures microscopiques et mesures macroscopiques effectuées à partir d'un rhéomètre plan à translation [Gardel, 2003]. Mais ces mesures de microrhéologie à deux points ont remis en cause les résultats obtenus par la microrhéologie classique en faisant apparaître une dépendance en $\omega^{1/2}$ pour $G'(\omega)$ et $G''(\omega)$ pour des fréquences comprises entre $10^{-3}s^{-1}$ et $10s^{-1}$ [Crocker, 2000][Gardel, 2003].

Nous retiendrons qu'en dépit de la controverse sur l'exposant, sur un domaine de fréquence¹² allant de $10^{-2}s^{-1}$ à $10s^{-1}$, ces mesures s'accordent à dire que ces "solutions", *i.e.* sans protéines se liant à l'actine, ont un comportement en loi de puissance avec un exposant 1/2 ou 3/4. On peut se demander alors ce que l'on obtient pour des "cytosquelettes synthétiques" plus proches de la réalité.

3.1.2 "Gels" d'actine

Les mesures décrites précédemment ont été effectuées sur des "solutions" d'actine sans lien chimique entre les filaments. Pour se rapprocher des conditions *in vivo*, des expériences *in vitro* ont été réalisées à partir de "gels" d'actine pour lesquels les filaments sont reliés chimiquement entre eux par des protéines se liant à l'actine.

Des mesures ont été réalisées avec des "gels" d'actine pontés avec de l' α -actinine. Pour rappeler l' α -actinine rassemble les filaments d'actine en faisceaux espacés que l'on retrouve au niveau des contacts focaux et des fibres de stress. Des échantillons macroscopiques ont été testés au moyen d'un rhéomètre cone-plan [Tseng, 2001]. Les résultats obtenus ont montré que pour des fréquences comprises entre $10^{-3}s^{-1}$ et $10s^{-1}$, le module élastique $G'(\omega)$ suivait une loi de puissance avec un exposant α compris entre 0.1 et 0.35. Cette variabilité est fonction du rapport entre la concentration d'actine et la concentration d' α -actinine. Plus ce rapport devient grand, plus l'exposant α augmente indiquant que le réseau est moins réticulé et donc plus "fluide". Il en ressort que l' α -actinine permettrait de moduler les propriétés mécaniques du réseau d'actine *in vivo* [Xue, 1998]. De plus, cette protéine permet de mieux mimer les réseaux d'actine *in vivo* qui sont plus rigide que les réseaux *in vitro* [Yamada, 2000].

L' α -actinine est un *cross-linker* passif. Des mesures sur des solutions d'actine réticulées à partir de myosines, *cross-linker* actif, ont aussi pu être réalisées. Par des expériences de diffusion de la lumière sur de tels échantillons, il a été mis en évidence qu'en saturant l'activité de la myosine S1 par une forte concentration d'ATP, on observe une dépendance en $\omega^{7/8}$ pour $G'(\omega)$ [LeGoff, 2002]. Quand la réserve d'ATP de la solution est consommée, on retrouve une dépendance en $\omega^{3/4}$ pour $G'(\omega)$. Ces observations ont été confirmées par des mesures de l'amplitude du déplacement de billes magnétiques soumises à un champ oscillant dans une solution d'actine contenant des fragments HMM de myosine II [Uhde,].

Remarque : Lorsqu'on synthétise un solution d'actine, la solution obtenue est hétérogène [Janmey, 1991a], *i.e.* des îlots denses de filaments formant des faisceaux cotoyent des régions moins denses en filaments sans de telles structures en câble. Cette hétérogénéité explique que ces gels soient thixotropes [Kerts, 1990]. Elle se manifeste d'autant plus si l'on ajoute des *cross-linker* comme l' α -actinine. Si l'on suit des billes fluorescentes enchassées dans le gel d'actine et que l'on trace la distribution des déplacements quadratiques moyens, on observe que la distribution devient asymétrique lorsqu'on augmente la concentration d' α -actinine [Tseng, 2001].

¹²Domaine de fréquence correspondant à la plage de temps sur laquelle nous faisons notre mesure.

3.2 Cellules vivantes

3.2.1 Modèles mécaniques composés de ressorts et d'amortisseurs : nombre fini de temps de relaxation

Bien souvent, en l'absence d'un contrôle de la contrainte appliquée (ou de la déformation), le seul moyen d'analyser le comportement mécanique d'une cellule est de présupposer un modèle permettant d'ajuster les données expérimentales.

$$\epsilon(t) = \sigma(0)J(t) + \int_0^t J(t-t')\dot{\sigma}(t')dt' \quad (3.1)$$

$$\sigma(t) = \epsilon(0)G(t) + \int_0^t G(t-t')\dot{\epsilon}(t')dt' \quad (3.2)$$

En effet, d'après les équations constitutives ci-dessus, on remarque que si l'on ne fixe pas la contrainte (Eq 3.1) ou la déformation (Eq 3.2), le terme intégral nous empêche d'accéder aux grandeurs rhéologiques : fonction de fluage ($J(t)$) ou fonction de relaxation ($G(t)$). Donc, si le dispositif n'est pas pourvu d'une boucle de rétroaction permettant de maintenir soit une contrainte soit une déformation, on est obligé de présupposer un modèle pour analyser une réponse où déformation et contrainte évoluent simultanément. Un modèle mécanique est composé de ressorts et d'amortisseurs associés en série et/ou en parallèle. Les ressorts servent à rendre compte d'un comportement de solide élastique parfait. Un solide élastique parfait répond instantanément à l'application d'une contrainte en se déformant de manière proportionnelle à la contrainte appliquée. Quant aux amortisseurs, ils modélisent des liquides visqueux parfaits. Un liquide visqueux parfait présente la propriété de se déformer indéfiniment et proportionnellement au temps sous l'effet d'une contrainte [Couarraze, 2000] (Fig 3.1). Les modèles générés à partir de ces "circuits

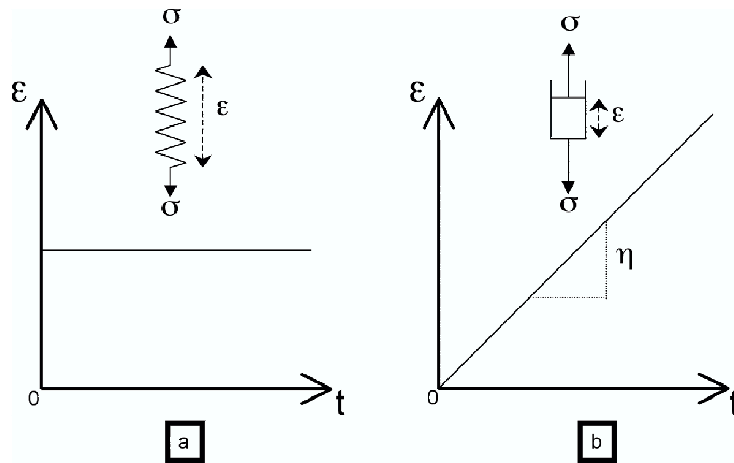


FIG. 3.1 – a) Solide élastique parfait : soumis à une contrainte constante σ , le solide élastique parfait se déforme instantanément et proportionnellement à la contrainte. On appelle élasticité, le facteur de proportionnalité entre la contrainte et la déformation. b) Liquide visqueux parfait : soumis à une contrainte constante, le liquide visqueux parfait se déforme indéfiniment et proportionnellement au temps. On appelle viscosité le facteur de proportionnalité entre la déformation et le temps.

mécaniques" obéissent à des équations linéaires. L'équation constitutive (reliant contrainte et

déformation) la plus générale dans le cadre d'une description avec un nombre fini de temps de relaxation est :

$$\sum_{i=0}^n a_i D^{(i)}[\sigma(t)] = \sum_{j=0}^p b_j D^{(j)}[\epsilon(t)] \quad (3.3)$$

Mesures locales

Aspiration par micropipette Les premières techniques de micromanipulation à l'échelle cellulaire ¹³ sont apparues au milieu des années 70. E.A Evans, un des pionniers, a mis au point un dispositif permettant de mesurer les propriétés viscoélastiques des cortex membranaires. Le principe de son dispositif consiste à aspirer une portion de cellule, typiquement un globule rouge, à l'aide d'une micropipette de quelques microns de diamètre [Evans, 1976a] (Fig 3.2). La défor-

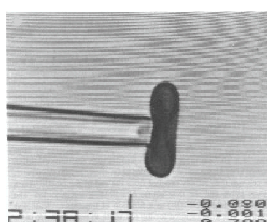


FIG. 3.2 – Une dépression ΔP permet d'aspirer la membrane du globule rouge à l'intérieur de la pipette. [Evans, 1984]

mation ($< 10\%$) à temps court ($< 1s$) d'un leucocyte aspiré par une micropipette a été modélisée par un solide standard élastique [Schmid-Schonbein, 1981] (Fig 3.3). Une étude au temps long

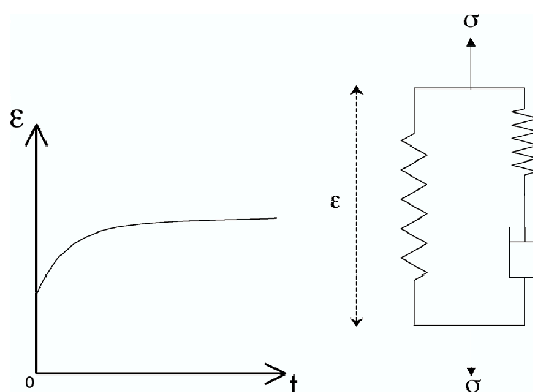


FIG. 3.3 – Solide standard élastique : L'élasticité instantanée résulte de la présence des deux ressorts en parallèle. À temps long, le ressort seul limite la déformation et le matériau se comporte comme un solide. L'amortisseur a pour effet de retarder l'élasticité finale.

[Evans, 1989] a permis d'observer que le leucocyte (granulocyte) s'écoulait dans la pipette. Ainsi la structure du granulocyte a été modélisée par une coque élastique renfermant un liquide purement visqueux, *newtonian liquid drop model* (Fig 3.4). La tension corticale mesurée sur ces granulocytes est de $2.7 \cdot 10^{-2} nN \cdot \mu m^{-1}$. La viscosité du cytoplasme varie inversement à la pression d'aspiration (comprise entre $100 Pa$ et $900 Pa$) entre $50 Pa \cdot s^{-1}$ et $500 Pa \cdot s^{-1}$ [Evans, 1989].

¹³Dans les années 30, on compressait des oeufs d'oursins avec des faisceaux de particules d'or [Coles, 1932] (la référence est tirée de [Petersen, 1982])

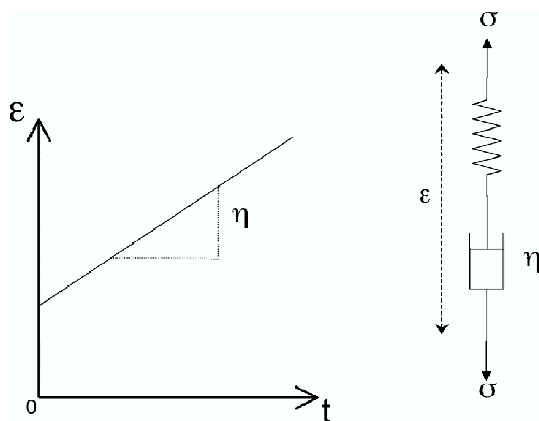


FIG. 3.4 – *Newtonian liquid drop model* : La membrane supposée être élastique est modélisée par un ressort. Le cytoplasme supposé visqueux est modélisé par un amortisseur. Un matériau modélisé ainsi possède une élasticité instantanée et s’écoule ensuite comme un liquide newtonien.

Ce modèle avait été remis en question deux ans plus tard, quand il avait été observé qu’après avoir été aspirés les neutrophiles récupéraient leur forme en deux étapes [Tay, 1991]. Une première quasi instantanée suivie d’une deuxième lente, suggèrerait que les neutrophiles se comportent comme un liquide de Maxwell avec une tension corticale, plutôt qu’un liquide newtonien avec une tension corticale comme le prévoit le *newtonian liquid drop model*. Quant à la variation de la viscosité apparente, elle reflèterait un comportement non-newtonien. Des simulations numériques ont permis d’estimer le taux de cisaillement moyen $\dot{\gamma}$ permettant ainsi d’établir que la viscosité η variait en fonction de $\dot{\gamma}$ avec une loi de puissance [Tsai, 1993], $\eta \propto \dot{\gamma}^b$ avec $b = 0.5$. Ce comportement est caractéristique des liquides en loi de puissance¹⁴ pour lesquels $\sigma = K.\dot{\gamma}^n$, où σ est la contrainte et K la consistance. Cette fois ci, le liquide Newtonien du *newtonian liquid drop model* est remplacé par un fluide en loi de puissance. D’autres approches ont été faites à partir de ce modèle en modifiant soit la nature de la coque (coque élastique précontrainte [Dong, 1988][Needham, 1992][Dong, 2003], coque élastique précontrainte avec une viscosité [Yeung, 1989], coque élastique avec un module de courbure [Zhelev, 1994]), soit la nature du corps (fluide de Maxwell avec des coefficients dépendant de la déformation [Dong, 1991], structure multicouches pour prendre en compte le noyau [Kan, 1999]).

Ces expériences présentent toutefois une difficulté qui est de savoir dans quelle mesure la membrane interagit avec les bords de la micropipette. Néanmoins, elles ont eu le mérite de mettre en évidence des tendances biologiques comme la rigidification des cellules soumises à un écoulement[Sato, 1987]. Il a aussi été montré que la tension corticale ainsi que la viscosité apparente augmentaient quand la cellule s’étalait indiquant que les fibroblastes avaient tendance à se rigidifier lors de l’étalement [Thoumine, 1999]. Des expériences utilisant un tel dispositif ont aussi été réalisées sur la lamina nucléaire montrant que l’enveloppe du noyau était 100 fois plus rigide que la membrane plasmique des granulocytes et que l’on ne pouvait pas la compresser indéfiniment suggérant que la lamina sert d’absorbeur de chocs protégeant ainsi les molécules qu’elle renferme[Evans, 2004].

¹⁴On prendra bien soin de distinguer : le rhéogramme $\sigma = K.\dot{\gamma}^n$ (non linéaire) où σ et $\dot{\gamma}$ sont définies en régime permanent et la fonction de fluage $J(t) = A.t^\alpha$ définie dans le régime linéaire et tenant compte du régime transitoire.

Pression exercée par une tige de raideur calibrée Une approche un peu similaire, parce qu'à la même échelle, a été d'appuyer sur la cellule plutôt que de l'aspirer. Cette technique est connue sous le nom de *cell poking*. Le principe consiste à appuyer une pointe d'environ $2\mu\text{m}$ de large et de raideur calibrée sur une cellule, et à mesurer la force appliquée en fonction de l'indentation résultant de cette force. Des courbes de forces en fonction de l'indentation tirées de ces mesures, il est possible de déduire une raideur effective proportionnelle au coefficient directeur de la droite qui interpole les points. Les raideurs trouvées [Petersen, 1982] [Zahalak, 1990] sont de l'ordre de $10\text{nN}\cdot\mu\text{m}^{-1}$ pour des fibroblastes, donc 1000 fois supérieures à ce qui est observé par les micropipettes. Ceci peut s'expliquer par le fait que les contraintes sont de l'ordre de 10^3Pa , donc légèrement supérieure à celle appliquées par les micropipettes. Malgré cette différence, ces expériences ont permis de montrer que, suivant la région indentée, la raideur apparente variait et que si l'on traitait les fibroblastes avec de la cytochalasine B qui inhibe la polymérisation de l'actine, cela avait pour effet de diminuer la raideur des régions autour du noyau. Le noyau conserve quant à lui ses propriétés mécaniques, indiquant que l'actine n'est pas responsable de la raideur du noyau. De plus, les courbes force-indentation présentent une hystérésis si l'on approche et l'on retire la pointe de la cellule. Ceci indique donc un caractère viscoélastique.

Cette outil a aussi été utilisé pour l'étude du rôle que joue la tension corticale dans la forme cellulaire [Albrecht-Buehler, 1987] et pour mesurer les forces exercées par les lamellipodes lors de la migration en plaçant perpendiculairement au plan d'avancé d'un fibroblaste une fibre optique de diamètre $0.5\mu\text{m}$ dont la raideur est de $400\text{nN}\cdot\mu\text{m}^{-1}$ [Felder, 1990].

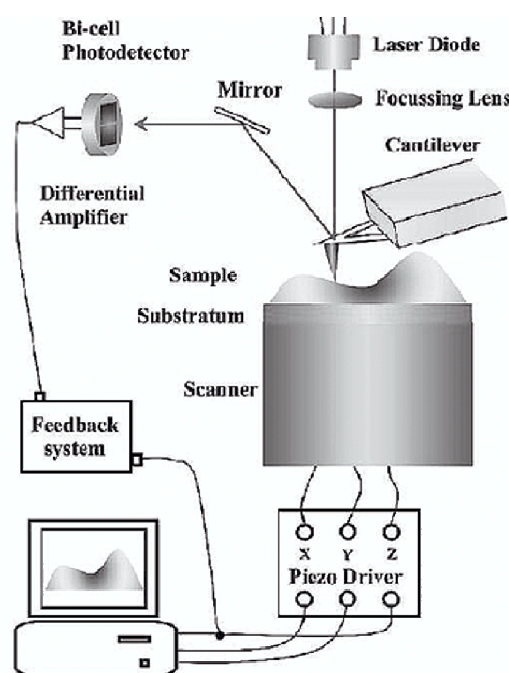


FIG. 3.5 – Schéma de principe de l'AFM. Le cantilever est déplacé verticalement. La déflexion du faisceau permet de savoir de combien s'est déplacée la pointe.

Un peu à la manière du *cell poking*, on peut grâce à une pointe d'AFM (microscope à force atomique) indenter la surface des cellules [Radmacher, 1992]. Le principe est de déplacer la base du cantilever en direction de la face basale¹⁵ de la cellule. Le cantilever se comporte comme

¹⁵surface en contact avec le substrat

une poutre en flexion qui commence à se défléchir au contact de la cellule. Sa raideur étant calibrée, il est possible en détectant la position de sa pointe de connaître à la fois la déflexion et l'indentation. A partir des courbes de force-indentation, il est possible de déterminer une raideur effective de la surface de cellules épithéliales (MDCK, *Madin-Darby Dog Kidney*) de $2nN.\mu m^{-1}$ pour des forces appliquées de l'ordre de $4nN$ et des indentations inférieures à $1\mu m$ [Hoh, 1994]. Pour des indentations supérieures, la raideur n'est plus constante et varie même notablement. Le même dispositif a permis de mesurer que le module d'Young des MDCK était compris entre $0.013MPa$ et $0.15MPa$ [Weissenhorn, 1993]. D'autres auteurs ont pu mesurer la variation de raideur effective des myocytes atriales (cardiomyocyte) lors de leur contraction [Shroff, 1995].

Pour éviter de supposer un modèle *a priori*, le dispositif a été doté quelques années plus tard d'une boucle de rétroaction permettant d'exercer des forces constantes à la surface de fibroblastes (L929) [Wu, 1998] (Fig 3.5). Les auteurs ont montré que les courbes de compression en fonction du temps étaient relativement bien approximées par modèle mécanique de solide standard élastique (Fig 3.3). Ils trouvent des raideurs de l'ordre de $6.10^3Pa.s$ et des modules d'Young pour les deux ressorts dont la somme vaut 2.10^3Pa . Il est à noter que dans cette expérience, contrainte et déformation évoluent indépendamment, mais que les auteurs sont obligés de faire des hypothèses¹⁶ sur la nature du matériau pour calculer l'indentation.

Par ailleurs, des mesures en fréquence avaient pu être réalisées mais seulement sur moins d'une demi décade, entre $50Hz$ et $300Hz$ [Mahaffy, 2004b]. Les auteurs voyaient dans leurs mesures qu'au delà de $100Hz$, le module élastique semblait tendre vers un plateau, alors que G'' continuait à augmenter [Mahaffy, 2004a]. Les auteurs imputaient le comportement observé au réseau d'actine.

Billes magnétiques attachées à la cellule Une autre alternative, consiste à déposer des billes magnétiques recouvertes de fibronectine à la surface de cellules étalées et à leur appliquer un champ magnétique. En plaçant un aimant à proximité des billes, il est possible de provoquer un déplacement tangentiel des billes à la surface des cellules. Un tel dispositif a été employé pour mesurer les propriétés viscoélastiques locales de fibroblastes [Bausch, 1998]. Suite à l'application d'une force quasi constante F , les auteurs observent que la bille se déplace ($x(t)$) avec trois régimes, ce qu'ils modélisent par un solide linéaire standard mis en série avec un amortisseur (Eq 2.2, Fig 3.6).

$$\frac{x(t)}{F} = \frac{1}{k_0} \left[1 - \frac{k_0}{k_0 + k_1} \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right] + \frac{t}{\gamma_0} \quad (3.4)$$

$$\tau = \frac{\gamma_1(k_0 + k_1)}{k_0 k_1} \quad (3.5)$$

Ils trouvent que $k = k_0 + k_1 = 10nN.\mu m^{-1}$, $\tau = 0.1s$ et $\gamma_0 = 0.031Pa.s.m$. On remarquera qu'à temps long cette structure est dominée par le comportement de l'amortisseur. Cela signifie que sous l'effet de forces, la bille accrochée à la membrane devrait se rapprocher¹⁷ continuellement de la pointe polaire entourée de la bobine créant le champ magnétique jusqu'à rupture de la membrane. Ce comportement est en désaccord avec tous les modèles précédant prédisant un comportement solide à temps long (la déformation tend vers une valeur finie lorsque t tend vers l'infini). Les constantes mécaniques qui sont déduites de ce modèle sont relativement dispersées,

¹⁶L'hypothèse en question est de considérer que la pointe d'AFM s'enfonce dans un milieu viscoélastique infini ayant les propriétés mécaniques d'un solide standard linéaire.

¹⁷Si l'on veut prétendre travailler à force constante avec ce genre de dispositif, on ne peut pas vérifier ce régime car on est limité aux petits déplacements.

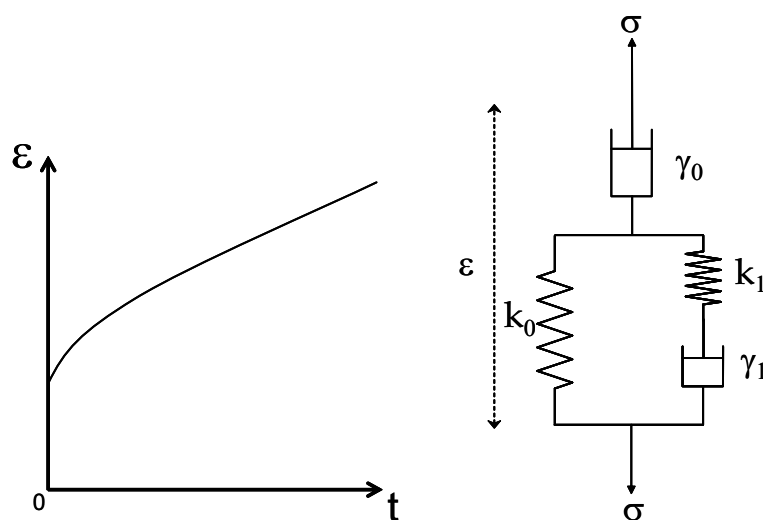


FIG. 3.6 – La cellule modélisée ainsi possède une élasticité instantanée et s’écoule comme un liquide à temps long.

de l’ordre de 100% pour le module d’Young effectif et de l’ordre de 50% pour la viscosité effective [Bausch, 1999].

La méthode précédente mesurait le déplacement de la bille et l’analysait en terme de modèle mécanique. Une approche similaire basée sur la mesure d’impédance liée à la distance cellule-substrat [Lo, 1998b] a permis de mesurer l’effet de la déformation induite par le mouvement des billes déplacées par un champ magnétique [Lo, 1998a]. En supposant que la contrainte était constante, les auteurs ont analysé la réponse avec un modèle de solide linéaire standard mis en série avec un ressort (Fig 3.7). Notons que les auteurs mesurent aussi les propriétés d’adhésion de la cellule à l’électrode et que, la force varie au fur et à mesure que la bille se déplace dans le champ magnétique.

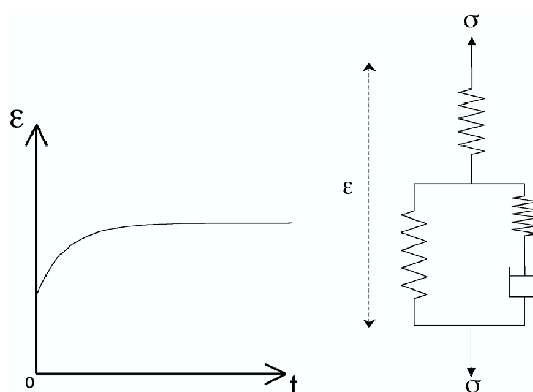


FIG. 3.7 – La cellule modélisée ainsi possède une élasticité instantanée et se comporte comme un solide à temps long, *i.e.* la déformation est finie à temps long.

La dernière approche que j’exposerai ici consiste à utiliser cette fois des chapelets de billes magnétique afin de sonder les propriétés viscoélastiques du milieu [Wilhelm, 2003]. Pour cela des nanoparticules sont déposées sur les cellules puis internalisées par endocytose. En présence

d'un champ magnétique les particules ferromagnétiques s'alignent dans le sens du champ pour former des petits chapelets de $1\mu m$ à $6\mu m$ de long. Un champ tournant est utilisé pour induire la rotation de ces chapelets. Le déplacement relatif entre la rotation du champ et la rotation du chapelet permet de mesurer la déformation locale autour du chapelet. En mesurant la relaxation du chapelet en fonction du temps suite à une rotation du champ magnétique (contraintes entre $30Pa$ et $200Pa$), les auteurs modélisent la réponse à l'aide d'un solide de Voigt placé en série avec un amortisseur (Fig 3.8). Notons encore une fois que déformation et contrainte évoluent de paire car le couple de rappel est proportionnel à l'angle de rotation du chapelet, donc à la déformation. Cette méthode a le gros avantage de sonder l'hétérogénéité du cytoplasme. Cette étude a notamment montré que dans la région périnucléaire, les endosomes déformaient plus difficilement le milieu que dans des régions éloignées du noyau, *i.e.* pour une même contrainte les endosomes tournaient moins que dans les régions "cytoplasmiques".

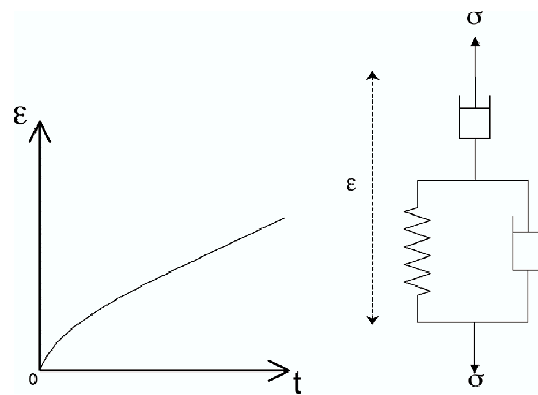


FIG. 3.8 – La présence des deux amortisseurs fait que la cellule est indéformable à temps court et se comporte comme un liquide à temps long, *i.e.* s'écoule indéfiniment.

Suivi de particules La troisième classe de mesures à l'échelle locale regroupe les mesures réalisées à partir du suivi de particules. Cette classe d'expériences consiste à suivre soit le mouvement d'organelles, soit de particules insérées dans le cytoplasme. Dans ce cas, c'est le théorème de fluctuation-dissipation qui fait le lien avec les grandeurs viscoélastiques. L'avantage de ces mesures est qu'elles sont moins perturbatives, *i.e.* il n'y a pas de contraintes mécaniques exercées de l'extérieur.

La LTM, *laser tracking microrheology*, consiste à suivre le mouvement de particules individuelles endocytées par les cellules [Yamada, 2000]. Il est alors possible de mesurer un module élastique $G'(\omega)$ pour des fréquences allant de $10^{-1}s^{-1}$ à 10^3s^{-1} . En échelle log-log, on peut distinguer trois régimes : deux droites entrecoupées d'une transition vers $10s^{-1}$ (plateau observé aussi par Mahaffy [Mahaffy, 2004b]). Les auteurs analysent cette courbe en termes de grandeurs viscoélastiques effectives. Il s'attachent à l'étude des variations de la hauteur des courbes, *i.e.* la valeur de $G'(\omega)$, en fonction de paramètres physiologiques plutôt qu'à la variation de G' en fonction de ω . Il est aussi possible d'obtenir la fonction de fluage [Tseng, 2002], toujours à partir du déplacement quadratique moyen de particules individuelles. Cette fonction reflète les mêmes dépendances que G' avec le plateau situé cette fois à $0.1s$, soit $10s^{-1}$.

Mesures globales

Les mesures viscoélastiques à l'échelle de la cellule entière sont moins nombreuses. Il y a essentiellement deux types d'appareils capables de mesurer des grandeurs viscoélastiques. Le principe dans les deux cas est d'étirer la cellule de manière globale.

Étirement uniaxial Dans le dispositif d'étirement uniaxial [Thoumine, 1997], une cellule est collée entre deux lamelles de verre. L'une est rigide, l'autre est flexible. La lamelle flexible se comporte comme un ressort dont la raideur est calibrée par ailleurs. L'expérience [Thoumine, 1997] consiste à déplacer la lamelle rigide et à observer la relaxation de la force au cours du temps, *i.e.* le retour de la lamelle souple à sa position d'équilibre. Sous l'effet de la force appliquée par la déflexion de la lamelle souple, la cellule se déforme. Notons qu'une fois de plus contrainte et déformation évoluent de manière concomitante. En effet au fur et à mesure que la déformation augmente, la force relaxe. Les auteurs observent deux régimes distincts. Un régime "passif" d'une dizaine de minutes pendant lequel la cellule est étirée, suivi d'un régime "actif" d'une quarantaine de minutes pendant lequel la cellule se contracte et tire sur la lamelle flexible. La partie passive est analysée grâce à un modèle de solide standard élastique (Fig 2.3). Les raideur des deux ressorts sont alors de l'ordre du kPa et la viscosité de l'amortisseur est de $10^4 Pa.s$. Ce dispositif a été réutilisé dernièrement avec un système de rétroaction utilisant un faisceau laser passant par une fibre optique accolée à la lamelle souple [Beil, 2003]. Cependant, les auteurs n'ont pas effectué d'analyse rhéologique, mais ont utilisé la valeur d'un module d'Young équivalent pour montrer l'influence d'un lipide sur l'organisation des filaments de kératines.

Optical stretcher L'*optical stretcher* [Guck, 2001] consiste à déformer une cellule en la plaçant entre deux faisceaux lasers divergents. Comme la cellule est un matériau diélectrique d'indice supérieur à l'indice du milieu dans lequel elle baigne, lorsqu'un photon entre dans la cellule sa quantité de mouvement augmente. Comme par ailleurs la quantité de mouvement totale est conservée, alors la surface des cellules est poussée dans le sens inverse de l'incidence du faisceau. En plaçant un laser de chaque côté de la cellule, on étire globalement la cellule, la résultante totale des forces appliquées à la cellule étant nulle. Les forces opposées générées de chaque côté de la cellule sont de l'ordre de quelque pN . Les contraintes appliquées sont alors de l'ordre du Pa et les déformations résultantes de l'ordre de 5%. Comme la courbe déformation en fonction de la contrainte a un comportement linéaire¹⁸, les auteurs mesurent des modules d'Young [Guck, 2001]. Il a été montré qu'avec cet appareil, il était possible d'identifier des cellules cancéreuses par la mesure de leur module d'Young [Lincoln, 2004].

Si toutes les méthodes d'investigations permettent de déterminer l'influence d'un paramètre de contrôle sur les caractéristiques ou l'intégrité mécanique des cellules, on s'aperçoit que, selon la méthode, la cellule peut être envisagée par des modèles aussi différents que ceux d'un liquide ou d'un solide. On peut alors se demander comment il est possible d'observer des comportements si différents sur des objets sensiblement identiques. Cette disparité des comportements n'est-elle pas liée aux conditions expérimentales particulières. N'est-il pas possible de trouver une description universelle du comportement rhéologique des cellules ? Nous allons voir, dans la section suivante, que de véritables mesures rhéologiques, avec différents dispositifs sur différents types cellulaires, conduisent à des comportements mécaniques identiques.

¹⁸mesures de pseudo équilibre

3.2.2 Rhéologie dynamique : nombre infini de temps de relaxation

Les lois de puissance en biorhéologie sont apparues à la fin des années 70 quand fut mesurée la relaxation de la contrainte suite à l'arrivée d'un volume d'air injecté dans un ballon en caoutchouc mimant des poumons [Hildebrandt, 1970]. De manière générale, c'est l'étude des propriétés visco-élastiques du tissu pulmonaire au début des années 90 [Hantos, 1987] [Peslin, 1990] [Suki, 1994] qui a fait émerger l'idée que les cellules pourraient, elles aussi, obéir à des lois de puissances. À la différence des modèles mécaniques avec nombre fini de temps de relaxation dont les équations constitutives (reliant contrainte et déformation) sont des équations aux dérivées entières (Eq 2.1), le formalisme mathématique rendant compte de distributions continues de temps de relaxation est décrit par des équations aux dérivées fractionnaires :

$$\sum_{i=0}^n a_i D^{(\alpha_i)}[\sigma(t)] = \sum_{j=0}^p b_j D^{(\beta_j)}[\epsilon(t)] \quad (3.6)$$

Où $\forall (i, j) \in ([0; n] \times [0; p])$, $(\alpha_i, \beta_j) \in ([0; 1] \times [0; 1])$. Bien que les dérivés soient fractionnaires, ces équations restent linéaires car l'opérateur $D^{(\alpha)}$ est linéaire. La dérivé fractionnaire α^{ieme} d'une fonction f est définie par :

$$D^{(\alpha)}(f) \equiv \frac{1}{\Gamma(1-\alpha)} \frac{d}{dt} \int_0^t \frac{f(t')}{(t-t')^\alpha} dt' \quad (3.7)$$

Magnétocytométrie La technique de magnétocytométrie s'inspire des manipulations de billes magnétiques. Le principe consiste à déposer des billes magnétiques sur des cultures de cellules et à les aimanter par une impulsion de champ magnétique intense. Ensuite on applique un champ de faible intensité dans une direction orthogonale au premier afin d'exercer un couple sur les billes [Wang, 1993] (Fig 3.9). En mesurant l'orientation du champ rémanent par rapport au

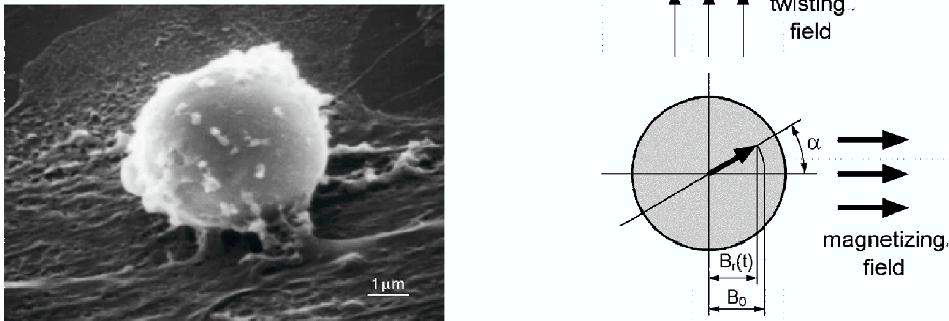


FIG. 3.9 – Schéma de principe de la MTC. On aimante la bille dans une direction (ici horizontalement). Puis on fait appliquer un champ dans la direction perpendiculaire qui fait tourner la bille. Avec des magnétomètres on détecte de combien a tourné le champ.

champ appliqué, il est possible de déterminer des grandeurs viscoélastiques. Ainsi en faisant osciller le champ appliqué pour la mesure (OMTC, *oscillating magnetic twisting cytometry*), il est possible d'obtenir G' et G'' [Maksym, 2000]. Les auteurs ont mis en évidence que pour des fréquences comprises entre $0.05s^{-1}$ et $0.4s^{-1}$ $G'(\omega)$ suivait une loi de puissance avec un exposant de 0.20 et le rapport constant $\delta \equiv \frac{G''(\omega)}{G'(\omega)}$ montre que G' et G'' sont liés. Ces caractéristiques, couplage des processus élastiques et dissipatifs, sont associées à un modèle de "*structural damping*" [Crandall, 1970]. En partant du même dispositif expérimental, il a été possible d'élargir la plage

de fréquence en rajoutant une démodulation [de Morales, 2001]. Grâce à ce système, les auteurs ont montré qu'entre $3 \cdot 10^{-2} s^{-1}$ et $10 s^{-1}$, G' et G'' suivaient en fonction de la fréquence une loi de puissance avec un exposant $\frac{1}{4}$. Par ailleurs, ils ont aussi mis en évidence que sur cette plage de fréquence, δ était constant et égal à $\frac{1}{2}$.

Les billes étant attachées à la membrane des cellules, une rotation de la bille se traduit aussi par un déplacement latéral (Fig 3.10). Grâce à une détection optique par vidéomicroscopie per-

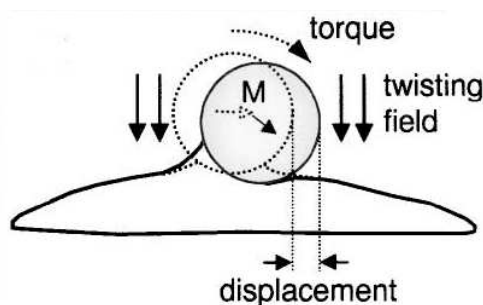


FIG. 3.10 – MTC optique : La rotation du moment magnétique de la bille (induit par le couple magnétique) se traduit en un mouvement de rotation de la bille mais aussi de translation car celle-ci est attachée au substrat.

mettant de détecter la position du centre de la bille (donc de d), il a été possible de déterminer G' et G'' non plus à partir d'une valeur moyenne du champ rémanent mais à partir de la détection de billes individuelles. De plus la plage de fréquence s'est élargie de $10^{-2} s^{-1}$ à $10^3 s^{-1}$ [Fabry, 2001a]. Les auteurs ont pu montrer que, pour des fréquences inférieures à $10 s^{-1}$, G' et G'' suivaient une loi de puissance avec un exposant de 0.17. Pour des fréquences supérieures à $10 s^{-1}$, G'' augmente plus vite que G' et, à partir de $10^2 s^{-1}$, l'exposant de G'' devient égal à 1. Les auteurs ont alors analysé la réponse viscoélastique en terme de matériau vitreux mou [Sollich, 1997]. Ce type de matériau est caractérisé par un désordre structural et par des états d'énergie métastables. Le désordre structural est modélisé par une distribution d'énergies, le caractère métastable se manifeste par une dynamique lente de réarrangement. Les auteurs suggèrent que l'exposant de la loi de puissance reflète une température de bruit effective mesurant l'aptitude des cellules à se déformer et se réorganiser [Fabry, 2003b]. Pour une fréquence déterminée (0.75 Hz), il a été montré que le déplacement d engendré par la rotation de la bille se distribuait selon une loi log-normale [Fabry, 2001b]. Les auteurs ont attribué la forme de la distribution à la géométrie variable de l'accroche des billes sur les cellules.

Microscopie à force atomique Le comportement décrit précédemment a aussi été observé par des mesures en fréquence effectuées à partir d'un AFM, dont le principe est expliqué plus haut (§ 3.2.1). En indentant périodiquement la surface de cellules épithéliales pulmonaires [Alcaraz, 2003], les auteurs montrent qu'une estimation rigoureuse de G' et G'' révèle en fonction de la fréquence le même comportement que celui observé par l'OTMC décrite précédemment. La gamme de fréquence s'étend entre $10^{-1} s^{-1}$ et $10^2 s^{-1}$. Les auteurs interprètent cette dépendance en ω de la même manière que Fabry *et al.* [Fabry, 2001a].

Suivi de particules Récemment des expériences de rhéologie à deux points (§ 3.2.1) menée sur la diffusion d'organelles à l'intérieur de la cellule (temps d'attente compris entre $10^{-2} s$ et $10 s$) [Lau, 2003]. Les auteurs ont modélisé la cellule par un milieu continu viscoélastique à

gros grains (*coarse-grained*). Bien que les auteurs voient que la corrélation du déplacement quadratique moyen de deux particules évolue en fonction du temps d'attente comme une loi de puissance, l'exposant trouvé n'est pas égal à celui trouvé par Fabry [Fabry, 2001a]. Le théorème de fluctuation-dissipation ne peut s'appliquer si on considère la température classique ce qui signifie que les fluctuations sont dominées par des forces d'origine non thermique. Ils voient en cela un comportement actif des propriétés mécaniques des cellules.

3.3 Conclusion

Alors que les expériences mesurant les paramètres viscoélastiques des cellules à une échelle locale sont relativement bien représentées, aussi bien chez les groupes obtenant un nombre fini de temps de relaxation que chez les autres, il n'existe pas d'expérience de rhéologie au sens strict du terme à l'échelle de la cellule entière. Par ailleurs, la loi de puissance (ajustée avec un nombre minimal de paramètres) donnant d'un groupe à l'autre des valeurs cohérentes semblent refléter un caractère plutôt universel du "matériau cellule". Ces mesures en plus d'être effectuées à une échelle locale, sont des mesures en dynamique. C'est pourquoi, il nous a semblé intéressant de mettre au point un rhéomètre permettant à la fois de sonder mécaniquement une cellule dans son ensemble et de faire ces mesures non pas en fonction de la fréquence mais du temps. L'expérience la plus simple que l'on puisse imaginer est alors une expérience de fluage en géométrie uniaxiale, consistant à mesurer la déformation (l'allongement) d'une cellule vivante entière lorsqu'elle est soumise à une force constante.

Deuxième partie

Le rhéomètre à cellule unique

Nous avons mis au point un rhéomètre à cellule unique tirant parti de la simple géométrie uniaxiale du dispositif d'O. Thoumine et A. Ott [Thoumine, 1997] [Hudspeth, 1997]. Dans cette géométrie, une cellule vivante est attachée entre deux lamelles de verres *via* ses protéines transmembranaires. Une des lamelles est rigide. L'autre, flexible, est une lame-ressort de raideur calibrée. En d'autres termes, cette lamelle souple est une tige rectangulaire analogue à un cantilever d'AFM permettant d'appliquer ou de mesurer des forces allant de quelques dixièmes de nanoNewton à plusieurs centaines de nanoNewton. En modifiant la conception des lamelles, il nous a été possible de surmonter les difficultés inhérentes au dispositif d'étirement d'O. Thoumine et A. Ott, et de concevoir une détection optique de la pointe de la lamelle souple permettant la mise en place d'une boucle d'asservissement. Cette rétroaction fait de notre dispositif un véritable rhéomètre permettant d'appliquer, à l'échelle¹⁹ d'une cellule vivante unique, soit des forces constantes (expérience de fluage), soit des déformations constantes (expérience de relaxation).

Cette partie vise à décrire les détails techniques qui nous ont permis de mettre au point ce rhéomètre. Je commencerai par expliquer le processus de fabrication des lamelles, puis comment il est possible d'adapter ces lamelles de taille micronique sur un microscope de sorte qu'elles puissent être manipulées avec 5 degrés de liberté. Dans un second temps, j'expliquerai le système de détection de la lamelle souple et la mise en place de la boucle de rétroaction. Puis, j'exposerai le principe et le protocole d'une expérience de fluage²⁰.

¹⁹contrainte et déformation sont appliquées à l'ensemble de la cellule

²⁰Les expériences de relaxation sont décrites en annexe (Annexe C).

Chapitre 1

Microplaques à l'échelle d'une cellule

1.1 De l'étirement uniaxial au rhéomètre à cellule unique

Le cœur du dispositif d'étirement uniaxial d'O. Thoumine et A. Ott [Thoumine, 1997] est constitué de deux lamelles rectangulaires (Fig 1.1) dont la géométrie présente trois obstacles majeurs à l'utilisation du dispositif en tant que véritable rhéomètre.

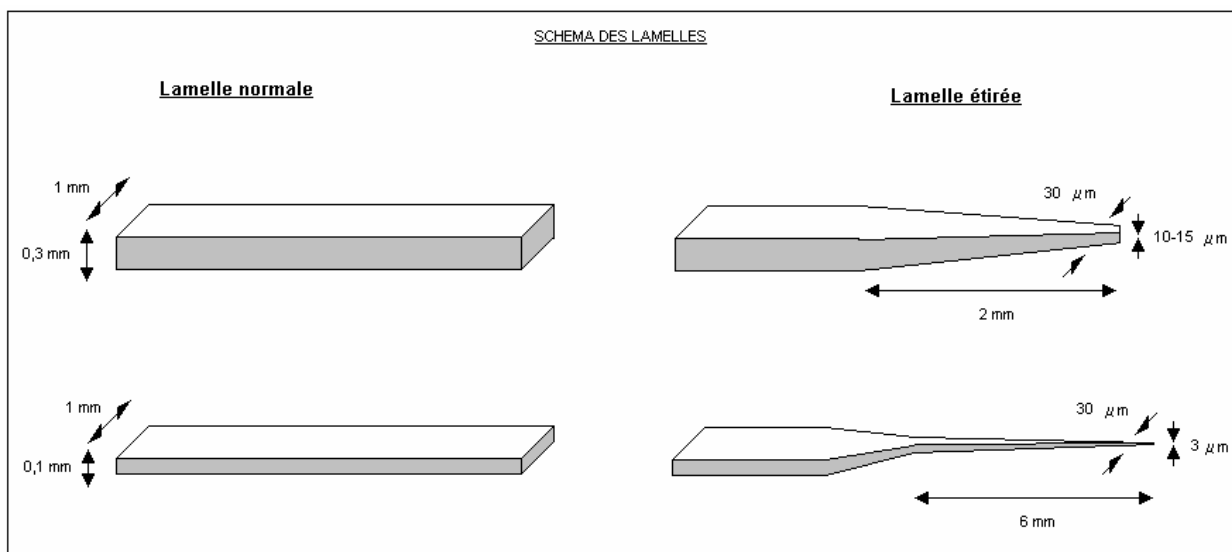


FIG. 1.1 – Profil de lamelle étirée : la lamelle rigide est représentée en haut, alors que la souple est représentée en bas. À partir de lamelles rectangulaire, on étire des lamelles. Les profils sont indiqués à droite.

i) Les cellules devant être manipulées dans leur milieu de culture, les expériences de micro-manipulation sont menées dans un récipient (chambre expérimentale) dont les parois obligent à incliner les lamelles d'un angle non négligeable ($\approx 30^\circ$) par rapport au plan focal du microscope (Fig 1.2). Cet angle a pour effet de défocaliser une bonne partie des lamelles, ce qui rend difficile l'analyse optique de la déformation cellulaire ou l'analyse d'images de fluorescence. Mais leur inconvénient majeur est surtout qu'elles sont difficilement détectable optiquement (Fig 1.3).

Dans ces conditions, pour espérer détecter la pointe de la lamelle souple, une solution est

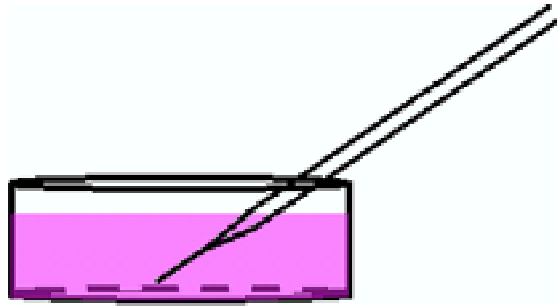


FIG. 1.2 – L'angle entre la lamelle de verre et le fond de la chambre expérimentale est d'environ 30° .



FIG. 1.3 – Les lamelles arrivant avec un angle dans la chambre expérimentale traversent le plan focal et sont de fait complètement défocalisées.

de coupler cette pointe à une fibre optique. Pour ce faire, il faut que la raideur de la fibre soit très inférieure à celle de la lamelle souple afin de ne pas perturber son mouvement. Expérimentalement, ceci est assez compliqué à réaliser car le couplage n'est jamais parfait et l'on se rend compte par ailleurs que la fibre introduit plus de bruit mécanique qu'autre chose.

ii) Avec la géométrie de figure 1.2, les lamelles sont sensibles à la tension superficielle du milieu dans lequel elles sont plongées. En effet, la raideur k d'une poutre en flexion est proportionnelle à $\frac{Ee^3l}{L^3}$ où E représente le module d'Young du verre, e l'épaisseur de la poutre, l sa largeur et L sa longueur. Ainsi, la raideur de la partie étirée (senseur de force en contact avec la cellule) est de l'ordre du nanonewton par micromètre. Alors que la raideur de la partie non étirée (simple support) est de l'ordre du dixième de millinewton par micromètre, donc bien plus raide que la portion étirée. Cependant considérant que la tension superficielle du milieu est voisine de celle de l'eau et que la largeur de la lamelle est de l'ordre du millimètre, la force capillaire qui s'applique sur la partie de la lamelle à l'interface est de l'ordre du dixième de millinewton. On constate donc que les variations de tension superficielle peuvent conduire à des déplacements micrométriques du même ordre de grandeur que les déflexions que nous cherchons à mesurer. De fait, lors d'expériences de contrôle, on constate que la surface du milieu cellulaire se "solidifie" au cours du temps et que la pointe de la lamelle souple subit une dérive concomitante de plusieurs microns.

iii) Avant d'être collées aux lamelles, les cellules doivent être décollées de leur substrat de culture et redispersées en suspension dans la chambre de micromanipulation. Alors, on attend qu'elles se déposent au fond de la chambre expérimentale pour aller en "capturer" une. Les lames de la figure 1.1, inclinées par rapport au fond de la chambre, ne permettent pas de coller simultanément la cellule sur les deux lamelles (rigide et souple) en vis-à-vis. En effet, seules les extrémités éfilées, *i.e.* de taille inférieure au diamètre cellulaire, touchent le fond. Elles ne peuvent donc pas offrir une surface de contact suffisante pour coller une cellule entière. Pour passer outre cette difficulté, on doit dans un premier temps positionner une des lamelles parallèlement au fond de la chambre expérimentale, *i.e.* à la manière d'une pelle à pain. Puis on laisse incubé avant faire pivoter la lamelle de 90° afin d'amener la cellule au contact de la deuxième lamelle. Il résulte de cette manipulation délicate, outre la perte d'un grand nombre de cellules, un délai de dix minutes minimum entre l'établissement des contacts cellule-"première lamelle" et cellule-"deuxième lamelle". Ce délai entre contacts a pour conséquence une adhérence asymétrique des cellules sur les lamelles (Fig 1.4) et donc une contrainte qui varie notablement d'un bord à l'autre de la cellule.

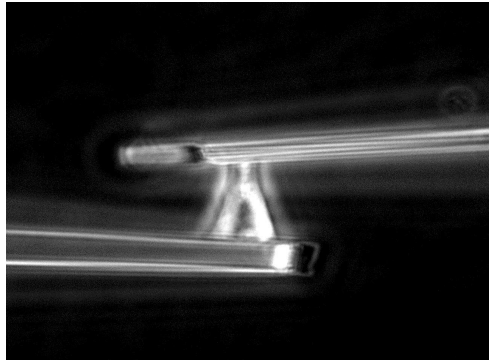


FIG. 1.4 – Les surfaces de contact ne sont pas identiques sur les deux lamelles.

Pour pallier à ces inconvénients, il est possible d'ajouter une huile visqueuse à la surface du milieu afin de ralentir son oxydation et donc de diminuer les effets de tension superficielle. Il est aussi possible de rajouter un troisième bras au montage [Beil, 2003] afin d'attraper et d'approcher la cellule entre les deux lamelles servant à l'étirement pour obtenir une adhésion simultanée, mais ceci augmente les difficultés de manipulations et les sources d'artefacts.

Nous avons opté pour la mise au point d'une nouvelle géométrie de lamelles répondant au cahier des charges dicté par les inconvénients cités ci-dessus. Nous désignerons par microplaque ces nouvelles lamelles. Une microplaque est un objet composite formé d'un capillaire de verre de géométrie cylindrique à l'extrémité duquel on fusionne à chaud la pointe étirée d'une lamelle de verre, senseur de force à géométrie parallélépipédique (Fig 1.1). Un angle d'une vingtaine de degrés entre les deux parties des microplaques permet aux lamelles étirées d'être parallèles au fond de la chambre expérimentale et par conséquent au plan focal aussi (Fig 1.5).

Ainsi, il devient aisé de détecter optiquement la position des lamelles étirées (Fig 1.6). De plus, le senseur est dorénavant totalement immergé et ne peut subir l'influence des variations de tension superficielle. Il est à noter que le capillaire, qui traverse l'interface solution-air, permet par sa symétrie cylindrique, outre sa très grande raideur, d'éviter toute dérive dans le plan de focalisation.

Enfin, les lamelles des microplaques étant quasi-parallèles au fond de la chambre expérimentale, il devient possible de capturer (prendre en sandwich) une cellule simultanément entre les

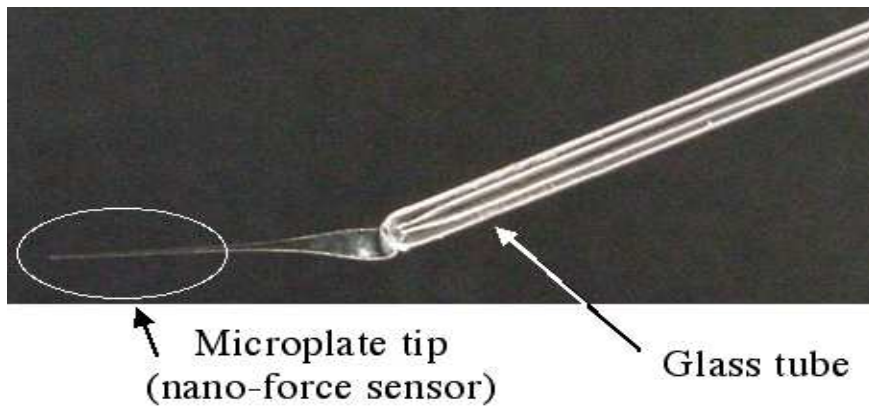


FIG. 1.5 – Microplaque : Une lamelle de verre est greffée sur un capillaire avec un angle d'environ 20° .

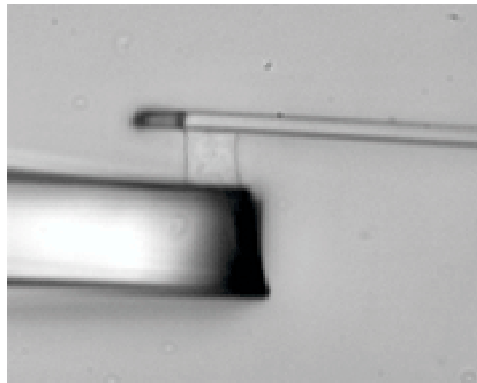


FIG. 1.6 – Avec la nouvelle géométrie des microplaques, la tranche des lamelles est focalisée.

deux microplaques, assurant ainsi des conditions d'adhérence similaires sur les deux plaques.

Je décrirai dans la suite, la manière dont nous fabriquons ces microplaques, puis comment nous les avons adaptées sur un microscope inversé afin de contrôler leurs mouvements de translation et de rotation. Enfin, nous verrons qu'il est relativement facile de calibrer de manière précise la raideur de tels objets.

1.2 Fabrication des microplaques composites

La fabrication des microplaques se fait en deux étapes. La première consiste à étirer une lame de verre en une lamelle. La seconde consiste à greffer la lamelle au bout d'un capillaire en verre.

1.2.1 Étirement des lamelles de verre

Le processus de fabrication des lamelles souples et des lamelles rigides est identique. La différence entre souple et rigide réside dans le fait que les lamelles rigides sont étirées à partir de lames plus épaisses que celles utilisées pour obtenir des lamelles souples.

Nous avons utilisé des lames en verre de section rectangulaire. Ces lames de verres ont été découpées par Lecordier-Siverso à partir de plaque de verre borosilicate D-262 de Schott-Duran.

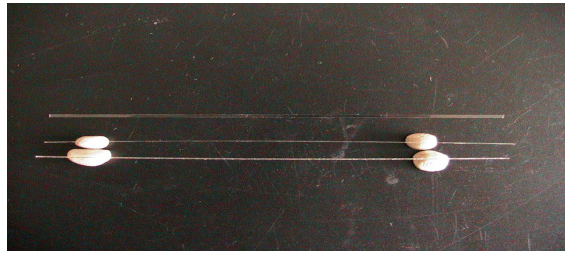


FIG. 1.7 – Lames de verre : La lame du haut repose sur sa largeur. Les deux autres lames reposent sur leur tranche. Celle du bas est rigide, l'autre est souple. On voit nettement la différence d'épaisseur.

Elles font 10cm de long et 1mm de large. L'épaisseur des lames souples est de $100\mu\text{m}$, celle des lames rigides est de $300\mu\text{m}$, *i.e.* 3 fois plus épaisses que les souples (Fig 1.7).

L'étirage à chaud de ces lames se fait au moyen d'une étireuse de micropipettes verticale (Narishige PB-7, Japon). L'extrémité supérieure de la lame est accrochée de manière fixe au bâti de l'appareil, tandis que l'extrémité inférieure est attachée à une partie mobile. La lame est entourée en son milieu par une résistance chauffante (Fig 1.8 a). Le chaleur fait fondre le verre puis sous l'effet du poids de la partie mobile, la lame s'étire (Fig 1.8 b). Pour que la partie

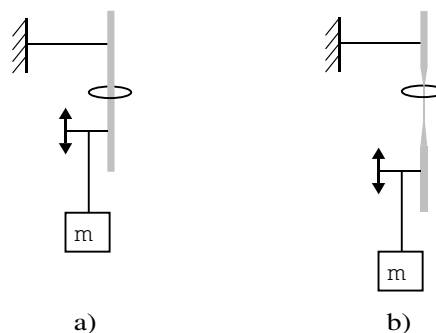


FIG. 1.8 – Principe d'étirement des lames : a) La partie supérieure de la lame est fixe alors que sa partie inférieure est attachée à une masse mobile. b) La chaleur produite par la résistance chauffante sert à faire fondre partiellement la lame et sous le poids de la partie mobile, la lame s'étire.

étirée se présente sous la forme d'une lamelle de section micronique faisant quelques millimètres de longueur, on règle la puissance de l'appareil au maximum afin que le chauffage soit le plus intense possible. Très vite la lame s'étire jusqu'à ce que la partie mobile à laquelle est rattachée son extrémité inférieure déclenche l'arrêt du chauffage en butant sur un commutateur. Ce chauffage intense et rapide permet d'obtenir un "cheveu" long et fin entre les deux extrémités qu'on sépare en coupant. La dernière étape de fabrication des lamelles consiste à ajuster la longueur des parties étirées. Pour ce faire on utilise des petits ciseaux chirurgicaux et on coupe à la bonne longueur. Cette étape en apparence facile est la moins reproductible du processus de fabrication et pourtant elle est cruciale. En effet comme nous le verrons par la suite, la section de coupe des lamelles doit être la plus plane²¹ possible pour pouvoir coller facilement une cellule et pour ne pas détecter les deux lamelles sur le capteur qui servira à la rétroaction. On conserve une partie

²¹Le conseil que je peux donner est d'appuyer la partie large des lamelles contre la lame de coupe du ciseau et de couper avec un geste sec en ayant son bras bloqué.

étirée de $7mm$ pour les lamelles souples et de $1mm$ pour les lamelles rigides.

Afin d'assurer une quasi indéformabilité des lamelles rigides, on les étire à partir d'une lame de verre trois fois plus épaisse que les lames utilisées pour étirer les lamelles souples. De plus, on ne garde qu'un millimètre de la partie étirée contre sept millimètres pour les lamelles souples. On constate alors que $e_{rigide} = 3 \times e_{souple}$ et que $l_{rigide} = 5 \times l_{souple}$ où e est l'épaisseur et l la largeur (Fig 1.9). Si l'on suppose que la partie étirée est une poutre élastique de section

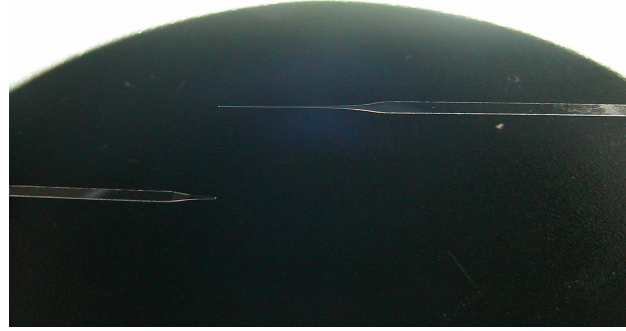


FIG. 1.9 – Lamelles de verre : La lamelle de gauche est rigide, celle de droite est souple.

rectangulaire et si on la défléchit selon la perpendiculaire au plan défini par sa longueur et sa largeur, alors cette dernière exerce une force de rappel élastique avec une constante de raideur $k \propto \frac{Ee^3l}{L^3}$ où E représente le module d'Young du verre, e l'épaisseur de la poutre, l sa largeur et L sa longueur. Comme $e_{rigide} = 3 \times e_{souple}$, que $L_{rigide} = \frac{1}{7}L_{souple}$ et que $l_{rigide} = 5 \times l_{souple}$, alors $\frac{k_{rigide}}{k_{souple}} \approx 10^4$. On vérifie cela expérimentalement en appuyant une lamelle souple contre une lamelle rigide afin de s'assurer que la déflexion de la lamelle rigide est négligeable. On observe effectivement que la lamelle rigide se défléchit de moins d'un dixième de micron pour un déplacement de la base de la lamelle souple de $100\mu m$.

1.2.2 Réalisation des Microplaques

La deuxième étape de fabrication des microplaques consiste à greffer la lamelle au bout d'un capillaire en verre de $1mm$ de diamètre et de $4cm$ de long (Vitrex, Danemark). Dans un premier temps on bouche le bout du capillaire en y faisant fondre du verre. Pour cela, on place le bout du capillaire au milieu de la résistance de l'étireuse. On règle le chauffage sur la position maximale, puis on approche une chute de lame souple qui fond sous la chaleur et bouche ainsi le capillaire. La lame souple moins épaisse que le capillaire fond plus vite. Ainsi, la section du capillaire reste à peu près droite. Cette planéité sert à maximiser la surface de contact entre le bout du capillaire et la lamelle à greffer. Les capillaires sont bouchés afin qu'il n'y ait pas de liquide qui monte par capillarité dans le tube lors d'un traitement et aille se déverser dans le bain servant au traitement suivant.

Dans un second temps, on effectue le greffage. De la même manière que celle utilisée lors du bouchage, on place cette fois le capillaire bouché au centre de la résistance. On approche la lamelle du bout du capillaire et on fusionne les deux pièces en chauffant de sorte à faire légèrement fondre le verre. Toutefois, il faut s'assurer de deux choses. Premièrement, la section de la lamelle doit être alignée avec un diamètre du capillaire. Puis la génératrice de cette section doit faire un angle d'une vingtaine de degrés avec l'axe du capillaire (Fig 1.5).

1.3 Mise en place sur la platine d'un microscope

Une fois ces microplaques fabriquées, il faut les adapter sur un microscope afin de pouvoir les micromanipuler de manière précise. Je décrirai dans un premier temps comment on peut concevoir les bras porteur que nous avons doté de 5 degrés de libertés : 3 en translation et 2 en rotation. Puis, je décrirai la manière dont ces bras sont montés sur le microscope ainsi que les moyens mis en œuvre pour isoler mécaniquement le microscope, pour thermaliser à $37^{\circ}C$ et pour acquérir des images numériques.

1.3.1 Description des bras porteurs

Les microplaques sont fixées au bout de bras métalliques cylindriques²² (Fig 1.10). Elles sont enfichées dans une pièce en plastique encastrée dans les bras métalliques. Sur cette pièce vient se refermer un écrou de serrage. Les bras passent dans une machoire métallique que l'on serre avec une visse. Cette machoire est montée sur une rotation autour de l'axe O_y permettant de régler l'angle entre le bras et le plan focal afin de placer grossièrement la tranche de la lamelle dans le plan focal. Une autre rotation autour de O_x , contrôlée manuellement avec une précision de l'ordre d'un dixième de degré par un micromanipulateur M-UTR46A (Micro-Contrôle, France), permet de positionner la microplaque de telle sorte que la tranche de la lamelle soit bien parallèle au plan focal de l'objectif du microscope, *i.e.* positionner les deux arêtes de la tranche dans le plan focal. Ceci est important pour bien étalonner la raideur de la lamelle souple. Ces rotations

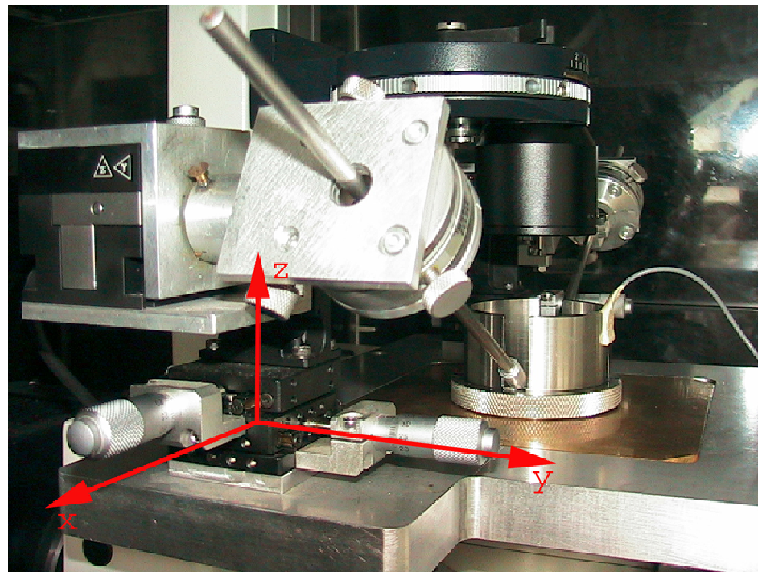


FIG. 1.10 – Dispositif de manipulation des microplaques : les microplaques sont fixées sur un bras porteur monté sur un dispositif microcontrôlé possédant 5 degrés de liberté.

sont montées sur un cube piézoélectrique 3 axes Nano-Cube XYZ (Polytech-PI, France). Ce cube permet d'effectuer des déplacements fins dans les trois directions de l'espace avec une précision de l'ordre de $50nm$ ²³. C'est lui qui est en charge du déplacement fin des microplaques lors des expériences. L'amplitude maximale des déplacements autorisés est de $100\mu m$. Ces nanocubes

²²Les pièces sont réalisées à l'atelier de mécanique du laboratoire.

²³Le constructeur affiche une précision dix fois supérieure. Or l'amplificateur fournit par le constructeur et délivrant les courants au cube est relativement bruité. Ce qui nous empêche d'atteindre la résolution annoncée.

sont à leur tour montés sur des micromanipulateurs manuels (OptoSigma Photonetics, France). Leur course est de 13mm . Ils servent à positionner grossièrement les lamelles en regard l'une de l'autre au voisinage du fond de la chambre expérimentale avant les expériences.

En résumé, ce dispositif possède 5 degrés de liberté. Les 3 degrés de translation servent au positionnement des microplaques dans l'espace. Un micromanipulateur manuel permet d'effectuer les réglages grossiers, tandis qu'un cristal piézoélectrique effectue les déplacements fins ou contrôlé par ordinateur pour l'asservissement. Un des deux degrés de rotation fait tourner les microplaques autour des axes O_x et O_y pour assurer que la tranche des lamelles soit parallèle au fond de la chambre expérimentale.

La direction O_y est la direction dans laquelle se fléchissent ces lamelles. La partie étirée des lamelles souples mesure 7mm , en considérant que la pointe est fixe et que l'on impose un déplacement de la base de la microplaque de $100\mu\text{m}$, cela génère un déplacement angulaire de la pointe de moins d'un degré. La composante selon O_x de la force appliquée est donc environ 100 fois plus faible que la composante selon O_y . Par conséquent, nous ferons l'approximation que la force est appliquée uniquement selon l'axe O_y , d'où la géométrie uniaxiale de notre dispositif.

1.3.2 Adaptation des bras sur le microscope

Le dispositif des bras porteurs est monté sur un microscope inversé DMIRB (Leica Microsystèmes, France). Pour cela, nous avons fait usiner au laboratoire une platine sur laquelle viennent se visser les dispositifs de micromanipulation des microplaques souple et rigide. Les micromanipulateurs manuels qui soutiennent tout le dispositif des bras sont disposés de part et d'autre de l'objectif à environ une quinzaine de centimètres de celui-ci. L'axe de rotation permettant d'approcher la pointe des lamelles du fond de la chambre expérimentale est situé 8 cm au dessus de la platine. Les bras font donc un angle d'environ 30° avec l'horizontale. C'est à cause de cet angle que les lamelles sont fusionnées aux capillaires avec un angle d'environ 20° . Si l'on donnait un angle de 30° , la pointe serait parallèle au plan focal mais ne pourrait pas toucher le fond de la chambre expérimentale à cause de la forme en entonnoir des lamelles (Fig 1.1, Fig 1.11).

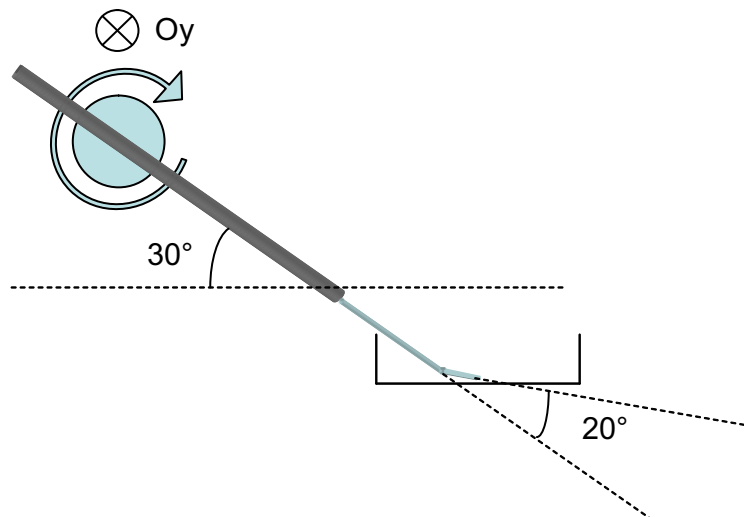


FIG. 1.11 – Schéma illustrant l'utilité de l'angle entre la lamelle et le capillaire.

Si l'on souhaite réaliser des expériences sur des cellules avec des temps d'observation supérieurs à quelques minutes, on se doit de leur fournir un environnement adéquat. Pour cela on

place les cellules et leur milieu dans une chambre expérimentale (Fig 1.2). On les maintient à $37 \pm 0.2^\circ C$ grâce à une thermalisation Air-Therm (World Precision Instruments, Angleterre). Le microscope est enfermé dans une boîte en altuglass fabriquée au laboratoire. L'entrée et la sortie d'air se font par deux ouvertures circulaires percées de chaque côté du microscope. Sur la face avant de la boîte sont percées quatre ouvertures permettant de déplacer la chambre expérimentale et d'accéder aux réglages du microscope (Fig 1.12). De plus l'atmosphère doit être régulée



FIG. 1.12 – Une boîte en altuglass englobe la majeure partie du microscope. Les deux tuyaux sur le côtés sont en charge de la circulation d'air. La caméra CCD est placée sur la sortie photo du microscope. Le tout repose sur une table antivibration placée sur une table optique.

en CO_2 à un taux de 5%, ce qui n'est pas le cas ici. Pour pallier à cet inconvénient nous tamponnons le milieu avec de l'HEPES et nous recouvrons le milieu de $5mm$ d'une huile imperméable à l'oxygène et perméable au dioxyde de carbone. Ajouté à cela, l'huile qui est visqueuse, protège la surface du milieu cellulaire en atténuant les ondulations dues aux mouvements d'air.

D'autre part, étant donné que nous travaillons à une échelle micronique avec une précision souhaitée de quelques centièmes de micromètre, on se doit d'isoler mécaniquement le microscope des vibrations produites par le bâtiment. L'isolation est effectuée par l'intermédiaire d'une table anti-vibrations TS-150 (HWL Scientific Instruments GmbH, Allemagne). L'avantage de cette table est en premier lieu sa taille qui en fait un appareil facile à insérer sur un montage. Son second atout majeur réside dans la manière dont elle amortit les vibrations. Contrairement à la plupart des dispositifs actuels qui utilisent des systèmes visqueux pour amortir les vibrations, cette table est dotée d'un système de contre-réaction permettant de contrecarrer les mouvements de son tablier pour des amplitudes inférieures à $60\mu m$. Cette table active (dotée d'un système d'asservissement) amortit donc les vibrations beaucoup plus vite qu'un système visqueux soumis à l'inertie. Elle est placée elle-même sur une table optique infiniment rigide afin encore de minimiser les effets d'inertie. Ce système permet de couper les vibrations de $1Hz$ à $1kHz$.

Enfin, l'acquisition d'image se fait *via* une caméra numérique Micromax (Roper Scientific) avec un capteur CCD 13. La caméra est placée sur la sortie photo du microscope et reçoit la

moitié de l'intensité lumineuse. Avec un objectif Plan Fluotar L $63 \times /0.70$ (Leica), le champ couvert par la caméra est d'environ $150\mu m \times 100\mu m$, ce qui est équivalent à une surface couverte typiquement par une centaine de cellules avec lesquelles nous travaillons. La caméra est contrôlée par l'intermédiaire du logiciel WinView²⁴ (Roper Scientific). Le temps d'ouverture, *i.e.* le temps d'exposition de la cellule CCD, est de $50ms$. Le carte d'acquisition ne permet pas de vider les 1300×1024 pixels du capteur CCD (pixels carrés de $6.7\mu m$) et nous pouvons acquérir au maximum neuf images par seconde, ce qui est très lent devant les $25images.s^{-1}$ de la vidéo. Toutefois, le signal de la caméra passe par un amplificateur avec une sortie vidéo analogique nous permettant d'enregistrer les séquences sur cassettes VHS. La prise d'images numériques à intervalles de temps réguliers nous sert essentiellement à contrôler les surfaces de contact cellule-lamelles.

Le dispositif que nous avons conçu permet donc de manipuler sous microscope et dans un environnement adéquat des cellules par les microplaques. La lamelle souple sert soit à mesurer les forces que peuvent exercer les cellules soit à leurs appliquer des forces calibrées. Ces microplaques souples sont en quelques sorte une sonde mécanique. La suite explique la manière dont ces lamelles équivalentes à des ressorts sont étalonnées.

1.4 Calibration des microplaques

Les lamelles souples sont assimilables à des "poutres" de section rectangulaire en flexion. Cette approximation permet de se faire une idée *a priori* sur les dimensions que la pointe doit avoir. Mais en aucun cas, cette approximation ne donne une valeur précise de la raideur des lamelles. Il est nécessaire de calibrer les lamelles afin de connaître précisément leur raideur. La calibration se fait en deux étapes. La première consiste à calibrer une lamelle dite "étalon" de manière extrêmement précise. Ensuite, les lamelles servant aux manipulations sont calibrées à partir de cette lamelle étalon.

1.4.1 Calibration de la microplaque étalon

Le protocole adopté pour calibrer précisément la lamelle étalon consiste à déposer des poids calibrés sur la largeur de la lamelle et d'observer la déflexion que ces derniers produisent. En quelque sorte cela revient à calibrer une balance connaissant les masses que l'on pèse.

On place tout d'abord la lamelle dans le plan focal sur sa largeur et on dépose à son extrémité un bout de fil de cuivre de diamètre $35\mu m$ (Fig 1.13).

²⁴Le système qui exploite ce logiciel est Windows 98.

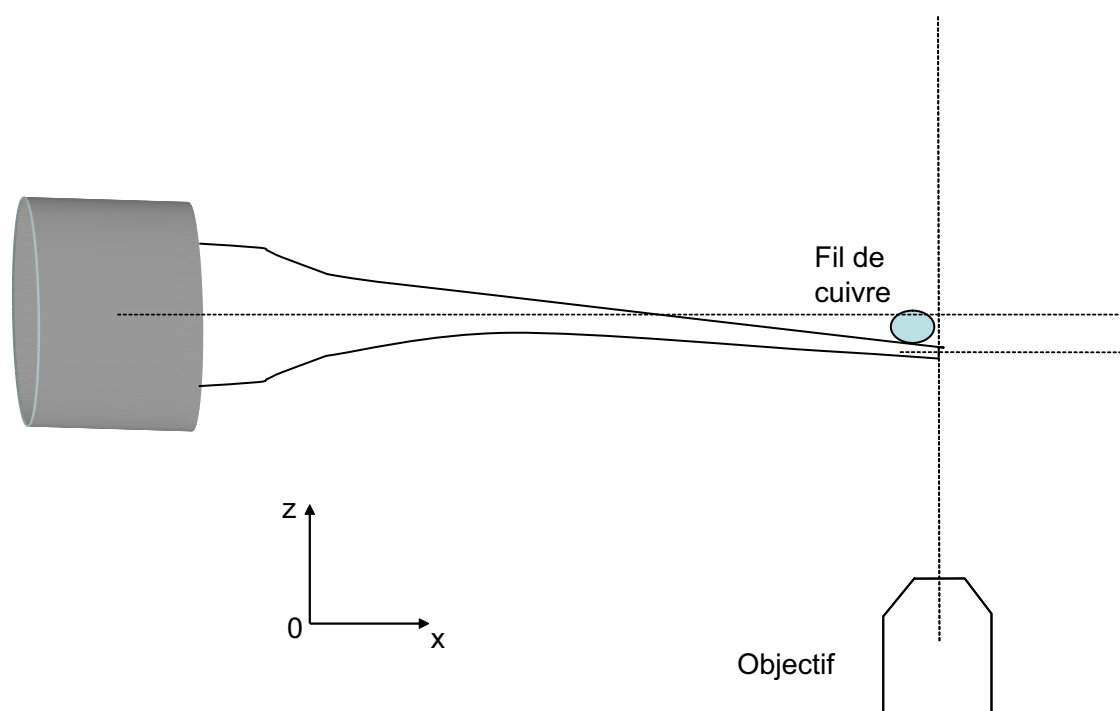


FIG. 1.13 – Principe d'étalonnage de la lamelle étalon : On voit ici la tranche de la lamelle. La lamelle se défléchit sous le poids du fil de cuivre posé dessus. On lit la variation de graduation sur la molette de focalisation du microscope.

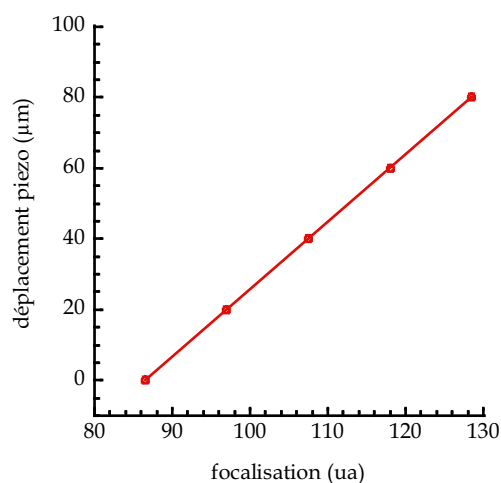


FIG. 1.14 – Calibration de la molette de focalisation

Le principe de la pesée consiste à focaliser la pointe avant et après avoir posé le fil. Comme on peut lire la variation de graduation sur la molette de focalisation du microscope, on mesure en microns la déflexion de la lamelle provoquée par la présence du morceau de cuivre à sa pointe. Pour étalonner la raideur de la lamelle étalon avec précision il faut donc au préalable calibrer la molette de la focalisation, *i.e.* faire correspondre une graduation lue sur la molette avec un déplacement vertical en micromètre.

Pour effectuer la calibration de la molette de focalisation, on place une lamelle dans le champ

d'observation. On fait la mise au point sur un détail de la lamelle. On repère la graduation sur la molette, puis on déplace verticalement la lamelle par l'intermédiaire du cristal piézo-électrique. On lit alors la variation de graduation (Fig 1.14).

On trouve ainsi qu'une unité de graduation correspond à un déplacement vertical de $1.9\mu m$.

Maintenant il faut connaître le poids des bouts de fil que l'on va disposer au bout de la lamelle. Après avoir découpé des bouts de fil de cuivre, on mesure leur longueur sous microscope. Comme la longueur des bouts varie du dixième de millimètre à plusieurs millimètres, nous utilisons un objectif $\times 10$ (Leica). Pour mesurer la longueur des bouts, nous prenons des images. Ces images nous donnent la longueur en pixel du bout de fil. En plaçant une mire calibrée dans le champ de la caméra, on obtient la correspondance pixel-micron. Donc en faisant la conversion, nous obtenons la longueur des morceaux. Connaissant par ailleurs la masse linéique du fil de cuivre, on remonte à la masse des bouts. La masse linéique du fil est elle aussi mesurée. On pèse pour cela plusieurs mètres de ce fil avec une balance de précision. La valeur trouvée pour la masse linéique est de $11,84.10^{-6}g.m^{-1} \pm 0,06$. Le poids des masses mesurées varie de $10nN$ à $200nN$.

Enfin, la pesée s'effectue en déposant les bouts de fils calibrés sur la lamelle et en lisant la déflexion qui en résulte (Fig 1.15).

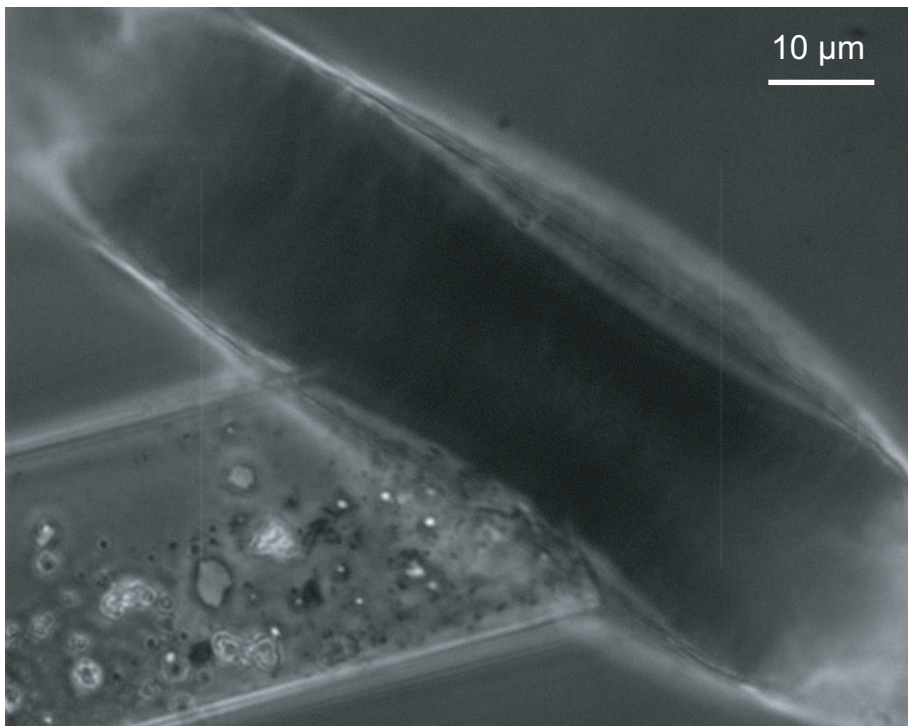


FIG. 1.15 – Le bout de fil de cuivre a un diamètre de $35\mu m$. Il est déposé sur la largeur de la lamelle.

Nous obtenons ainsi une courbe de calibration qui s'ajuste très bien par une loi linéaire (Fig 1.16).

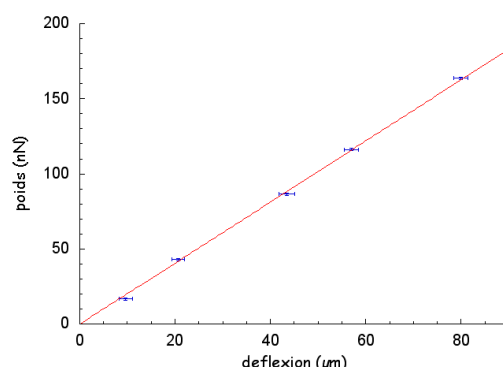


FIG. 1.16 – Courbe d'étalonnage de la lamelle étalon. Chaque point correspond à la moyenne de 20 mesures, *i.e.* 20 charges du fil sur la lamelle.

Le coefficient directeur de la droite interpolée est la raideur de la lamelle étalon. Elle s'exprime en $nN.\mu m^{-1}$. Les lamelles étalons que nous avons calibrées vont de $0.83nN.\mu m^{-1}$ à $2.03nN.\mu m^{-1}$. Celle à $2.03nN.\mu m^{-1}$ sert plutôt à calibrer des lamelles souples de raideur supérieure à $5nN.\mu m^{-1}$, celle à $0.83nN.\mu m^{-1}$ sert plutôt à calibrer des lamelles souples de raideur inférieure à $5nN.\mu m^{-1}$.

1.4.2 Calibration d'une microplaque

Pour calibrer nos microplaques, on applique la lamelle à calibrer contre la lamelle étalon, tranches parallèles au plan focal. Puis on déplace la base de la lamelle étalon²⁵ par pas de $10\mu m$. En lisant la variation de position de la pointe des lamelles, on remonte ainsi à la raideur de la lamelle que l'on souhaite calibrer (Fig 1.17).

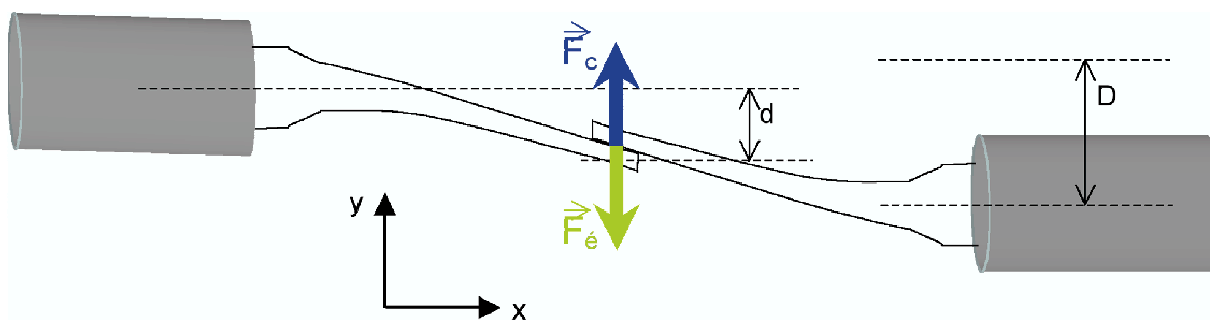


FIG. 1.17 – Principe de calibration des lamelles expérimentales. La lamelle à calibrer est à gauche, la lamelle étalon est à droite. D représente le déplacement de la base de la lamelle étalon. d est le déplacement des points par rapport à leur position au repos. \vec{F}_e est la force qu'applique la lamelle étalon sur la lamelle à calibrer. \vec{F}_c est la force qu'applique la lamelle à calibrer sur la lamelle étalon. Connaissant la raideur de lamelle étalon, de l'écriture de l'équilibre des forces, on déduit la raideur de l'autre.

²⁵Déplacer la base de la lamelle souple ou celle de la lamelle étalon revient au même. La seule différence se fait au niveau du calcul de la raideur.

Avant d'effectuer les déplacements successifs de la microplaque étalon, on repère un point au niveau du contact entre les deux lamelles et on note ses coordonnées. Après chaque déplacement de la microplaque étalon, on note les nouvelles coordonnées de ce point. On obtient donc le déplacement d de la pointe de la lamelle souple en fonction du déplacement D de la base de la lamelle étalon (Fig 1.18).

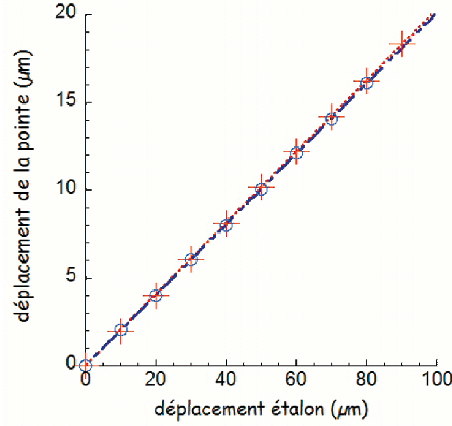


FIG. 1.18 – Courbe de calibration d'une lamelle souple. Les points en croix correspondent à la charge, *i.e.* quand on incrémente le déplacement de la microplaque étalon. Les ronds correspondent à la décharge, *i.e.* quand on diminue le déplacement de la microplaque étalon. Les phénomènes de stick-slip font que l'on observe une légère hystérésis entre l'aller et le retour.

Pour calculer la raideur, on écrit l'équilibre des forces qui s'exercent au niveau des deux pointes :

$$\vec{F}_e = \vec{F}_c \quad (1.1)$$

On projète sur l'axe Oy . k est la raideur des lamelles

$$k_e \cdot (D - d) = k_c \cdot d \quad (1.2)$$

ce qui est équivalent à

$$d = \frac{k_e}{k_e + k_c} D \quad (1.3)$$

On pose

$$a = \frac{k_e}{k_e + k_c} \quad (1.4)$$

On détermine donc a expérimentalement en ajustant les points expérimentaux par une loi de proportionnalité. Quand on impose un déplacement de la base selon Oy , il se produit entre les lamelles un léger cisaillement selon Ox . Comme les lamelles ne glissent pas parfaitement l'une sur l'autre, la contrainte de cisaillement n'est pas toujours relaxée. Ceci donne lieu à un phénomène de stick-slip et a pour effet de produire une légère hystérésis dans la courbe de calibration, ce qui se traduit par une pente différente entre l'aller et le retour (charge et décharge). Pour calculer la raideur des lamelles, on prend donc la pente moyenne. On trouve ainsi deux coefficients de proportionnalité différents correspondant à la charge et à la décharge. On fait la moyenne des deux, puis le résultat est identifiée à a . Donc en résolvant l'équation (1.4), connaissant a et k_e , on déduit la valeur de k_c :

$$k_c = k_e \cdot \left(\frac{1}{a} - 1 \right) \quad (1.5)$$

Les lamelles que nous avons calibrées ont des raideurs allant de $0.031nN.\mu m^{-1}$ à $15.5nN.\mu m^{-1}$. L'erreur moyenne sur la détermination de k est d'environ 3%.

Nous venons donc de voir comment il est possible de fabriquer des microplaques capables d'exercer des forces calibrées à l'échelle de cellules vivantes. Afin de construire un véritable rhéomètre, il faut maintenant être capable d'exercer ces forces de manière constante. Pour cela, il faut doter le montage d'une boucle de rétroaction.

Chapitre 2

Mise en place de la boucle de rétroaction

Dans ce chapitre nous allons voir comment nous avons pu mettre en place une boucle de rétroaction capable de maintenir, à l'échelle de la cellule entière, soit une force constante, soit une déformation constante. Comme dans toute boucle de rétroaction, il y a une consigne à laquelle est comparée un signal détecté physiquement. La boucle corrige, par l'intermédiaire de sa sortie, l'écart à la consigne, *i.e.* l'erreur. Dans notre cas, vouloir travailler à force constante revient à maintenir une déflexion constante de la lamelle souple. Il nous faut donc détecter la position de la pointe de cette lamelle et la maintenir constante. Donc pour mettre en place cette boucle de rétroaction, il faut tout d'abord être capable de détecter cette position, puis ensuite de la corriger.

2.1 Détection de la position de la pointe de la lamelle souple

La détection de la pointe de la lamelle souple peut se faire de plusieurs façons. On peut défléchir un laser sur la pointe de la lamelle souple et recueillir le faisceau réfléchi par une diode à cadran. L'inconvénient de cette méthode est que l'alignement optique est difficile à réaliser proprement. Un autre moyen consiste à attaquer une fibre optique à l'acide nitrique, jusqu'à ce que son diamètre atteigne une dimension telle que la fibre soit infiniment souple comparée à la lamelle souple. On fait ensuite passer par cette fibre un faisceau laser détecté par une cellule photosensible. L'inconvénient de cette méthode est que la fibre est une antenne acoustique qui capte tous les mouvements d'air. En ce qui nous concerne, nous avons opté en faveur d'une détection optique directe. Les lamelles sont éclairées par la lumière du microscope et nous détectons l'image de la pointe de la lamelle souple sur un capteur optique linéaire situé sur la sortie latérale du microscope normalement dédiée à la caméra. La position du capteur est ajustée au moyen d'un micromanipulateur 3 axes M-MT-XYZ (Micro-Control, France). On aurait pu aussi imaginer une détection numérique avec reconnaissance de forme. L'inconvénient aurait été les délais supplémentaires introduits par le traitement des images.

2.1.1 Le capteur optique de position

Le capteur optique que nous avons utilisé est un S3979 Position Sensitive Detector (Hamamatsu, France). Il mesure $3\text{mm} \times 1\text{mm}$. Physiquement, ce capteur est doté d'une résistance linéique ρ et délivre, lorsqu'il est éclairé par un faisceau incident en un point d'abscisse x le long

de son axe principal, deux courants i_1 et i_2 dont la différence est proportionnelle à x (Fig 2.1).

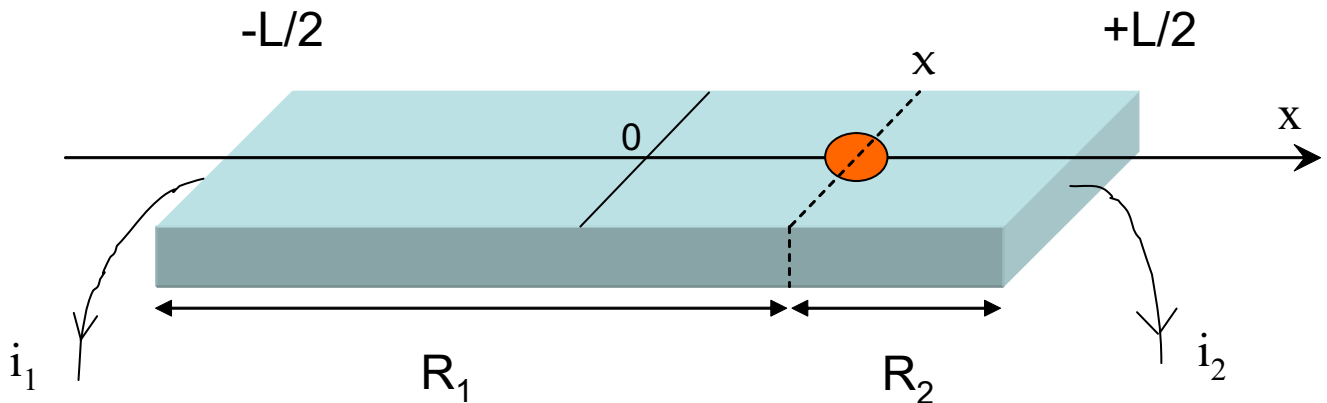


FIG. 2.1 – La position d'une tâche lumineuse sur ce capteur est proportionnelle à la différence des courants i_1 et i_2 .

Pour nos expériences, nous avons directement imagé la pointe de la lamelle souple sur le capteur (Fig 2.2). En quelque sorte, nous avons travaillé en "contraste inversé" avec un capteur uniformément éclairé sur lequel se fait l'image de la lamelle souple. Cette image présente typiquement une large bande sombre (minimum de la figure de diffraction) encadrée de deux minces bords brillants (maximum d'intensité). On peut montrer que la réponse du capteur présente encore dans ce cas une plage linéaire (Annexe C). Simplement, plus la bande sombre est mince, plus la sensibilité diminue par rapport aux conditions nominales prévue par le fabricant du détecteur.

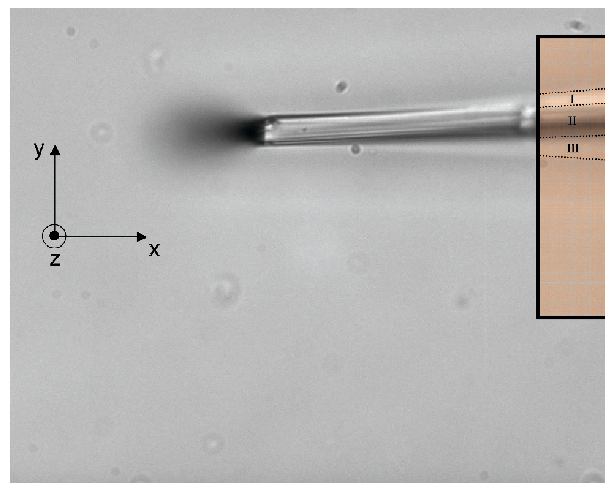


FIG. 2.2 – La partie détectée de la lamelle souple se situe à une soixantaine de microns de la pointe. La lamelle se déplace parallèlement à Oy . Le rectangle symbolise le capteur. La partie détectée des lamelles est celle indiquée sur le schéma. Les régions I et III correspondent à des tâches brillantes de diffraction. La région II est une région sombre (minimum de diffraction).

Le signal typique de sortie du capteur est représenté en figure 2.3. Ce signal est relevé au début de chaque expérience et l'on place la lamelle souple au centre de la plage centrale (la plus sensible) où elle sera maintenue tout au long de l'expérience par la boucle d'asservissement.

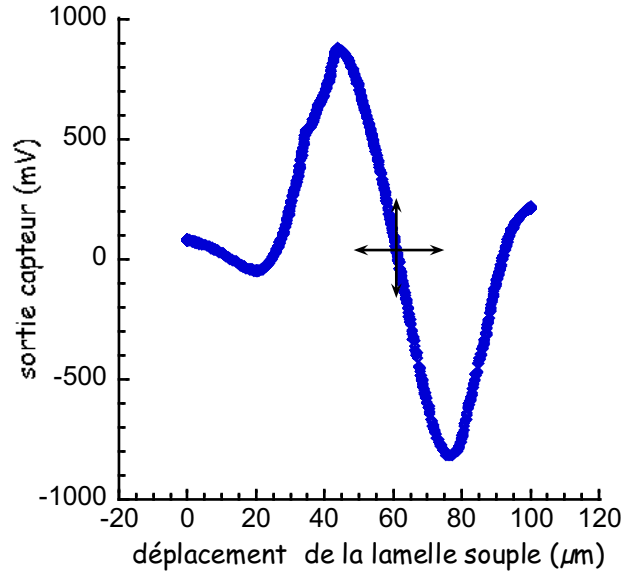


FIG. 2.3 – Signal en sortie du détecteur optique lorsque l'on déplace la lamelle parallèlement à la longueur du capteur. La plage utile est la partie linéaire centrale où l'on se place avant chaque début d'expérience.

2.1.2 Analyse et filtrage du signal

Ce que nous avons désigné précédemment par la sortie du capteur correspondait au signal amplifié puis filtré provenant du capteur, autrement dit cette sortie correspondait à la sortie d'un circuit électrique que nous avons élaboré afin d'amplifier et de filtrer le signal sortant directement du capteur. En réalité, ce détecteur délivre directement à sa sortie deux courants i_1 et i_2 . On peut montrer que (Annexe C) :

$$\frac{i_2 - i_1}{i_1 + i_2} = -\frac{x}{\frac{L}{2}} \frac{\Delta x}{L - \Delta x} \quad (2.1)$$

où x est l'abscisse du centre géométrique de l'image de la lamelle sur le capteur, Δx la largeur de la bande sombre et L la longueur du capteur. C'est la différence $i_2 - i_1$ qui est proportionnelle à la position de la tâche sur le capteur. Cette différence est divisée par la somme $i_1 + i_2$ afin que la position détectée ne soit pas sensible aux variations globales d'intensité lumineuse.

Le schéma du circuit que nous avons réalisé est donné en figure 2.4. En résumé, les courants i_1 et i_2 sont d'abord transformés en tension U_1 et U_2 à l'aide d'amplificateurs opérationnels OPA121KP (Burr-Brown, États unis). Puis on fait la somme et la différence des tensions U_1 et U_2 grâce à deux amplificateurs opérationnels AMP03 (Analog Devices, États Unis), l'un monté en additionneur et l'autre en soustracteur.

Ensuite, on filtre somme et différence par l'intermédiaire d'un filtre Butterworth couplé à un filtre R-C. La figure 2.5 représente la fonction de transfert de l'ensemble : circuit électronique (Fig 2.4) et filtres. Puis on demande à Labview d'effectuer la division de la différence par la somme car un AO diviseur introduirait trop de bruit.

Au final, le signal sortant présente une déviation standard de $1.5mV$, ce qui équivaut en moyenne (dépendant de la forme de la lamelle souple) à une erreur sur la détection de la position du bout de la lamelle souple de $0.07\mu m$.

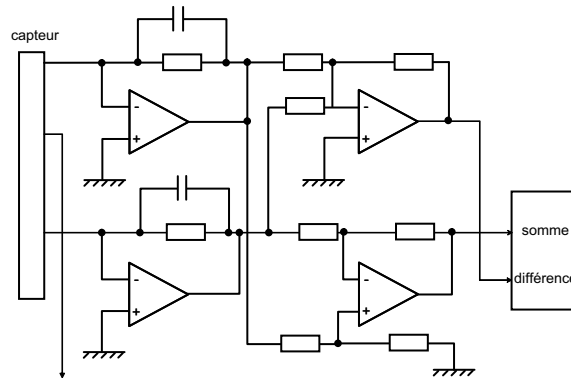


FIG. 2.4 – Schéma du circuit électrique permettant l'amplification, l'addition et la soustraction des courants i_1 et i_2 .

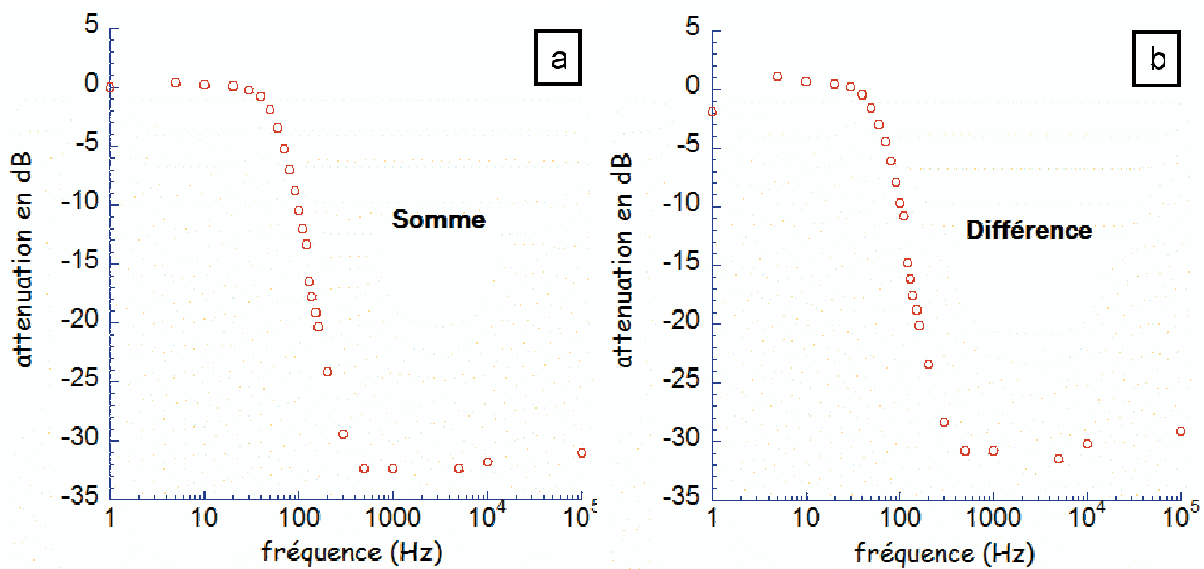


FIG. 2.5 – Diagramme de Bode expérimental de la somme et de la différence après filtrage.

2.2 Asservissement

La grandeur qui est asservie dans notre dispositif est la position de la pointe de la lamelle souple, plus exactement la position de son image sur le capteur. Au début de chaque expérience, cette image est placée au centre de la plage linéaire centrale du capteur (croix au centre de la figure 2.3). Cette position est ensuite maintenue constante par un correcteur PID (*Proportionnel Integral Différentiel*) par l'intermédiaire d'une tension envoyée sur un des cubes piézo-électriques. Cette tension a pour effet de déplacer la base des lamelles. Ainsi, si l'on veut travailler à force constante, la sortie du PID sera envoyée sur le cube piézo-électrique en charge du déplacement de la microplaque rigide (Fig 2.6) et la cellule est alors étirée sous force constante. Si l'on souhaite maintenir une déformation constante, la sortie du PID servira à faire déplacer la microplaque souple (Fig 2.7). Dans ce cas, la microplaque rigide et la pointe de la lamelle souple sont immobiles assurant ainsi une déformation cellulaire constante. En revanche, la base de la lamelle souple est mobile permettant ainsi de relaxer la force.

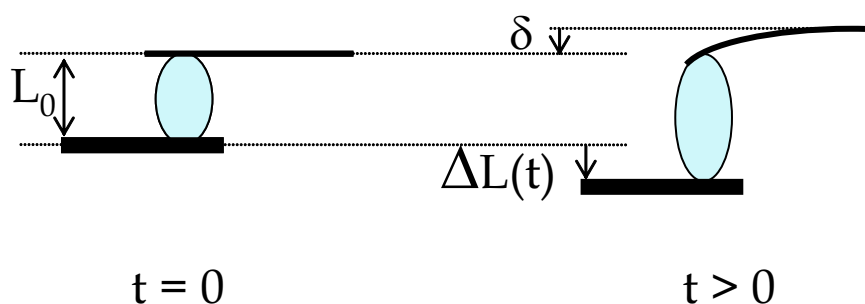


FIG. 2.6 – Fluage : On impose une déflexion δ de la lamelle souple. La position de sa pointe est maintenue constante ($\delta = cte$) par un déplacement de la lamelle rigide ($\Delta L(t)$).

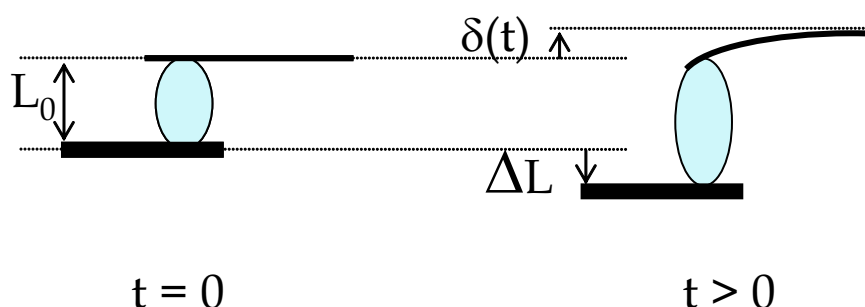


FIG. 2.7 – Relaxation : On impose un déplacement ΔL de la lamelle rigide. La position de la pointe de la lamelle souple est maintenue constante par un déplacement de la base de la lamelle souple ($\delta(t)$).

2.2.1 Interfaçage

Le signal qui sort du détecteur passe d'abord par notre montage électrique où il est amplifié, filtré et additionné. Puis le signal arrive sur une carte d'acquisition PCI-6035E (National Instruments, France). Il est ensuite envoyé au logiciel LabView (National Instruments, France) sous lequel tourne le correcteur PID. La sortie du correcteur PID est alors envoyée ensuite *via* une carte de sortie PCI-6713 (National Instruments, France) vers les cubes piézo-électriques. Le signal qui arrive sur les piézo-électriques sert à déplacer les microplaques. La sortie du PID est envoyée sur le cube piézo contrôlant la microplaque souple lorsque nous faisons une expérience à déformation constante. Quand nous souhaitons réaliser une expérience à force constante, la sortie du PID actionne le piézo contrôlant la microplaque rigide (Fig 2.8). Nous reviendrons dans la partie III sur la manière dont le déplacement des microplaques permet de corriger la position de la pointe de la lamelle rigide.

Par ailleurs un programme LabView permet de déplacer au choix et de manière simultanée un des trois axes des deux cubes piézo-électrique. Le déplacement simultané des axes Ox permet de positionner la pointe à une soixantaine de microns du capteur. Le déplacement des axes simultanément Oy permet d'étalonner le capteur. Le déplacement simultané des axes Oz permet de remonter la cellule après l'avoir collée au fond de la chambre expérimentale. Ce programme permet donc de placer finement les lamelles avec à leur bout une cellule. Ainsi, la cellule collée ne subit pas de contrainte mécanique avant l'expérience. De plus, le fait de pouvoir déplacer simultanément les deux lamelles présente l'avantage de pouvoir effectuer *in situ* la calibration du

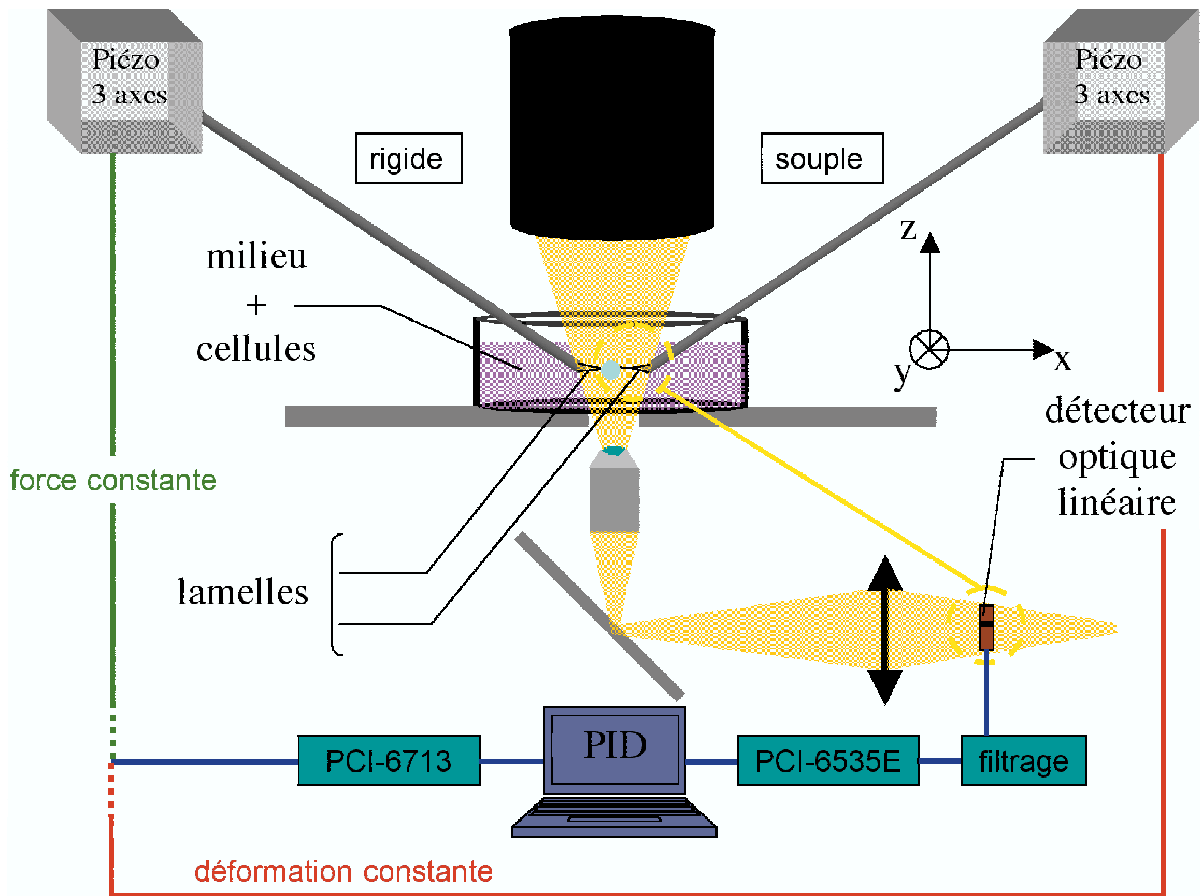


FIG. 2.8 – Schéma de principe de l'asservissement. On détecte l'ombre de la pointe de la lamelle souple sur un capteur optique linéaire et on corrige cette position *via* une boucle de rétroaction dont la sortie sert à déplacer soit la microplaque rigide (force constante), soit la microplaque souple (déformation constante).

détecteur.

2.2.2 Correcteur PID

Ce programme corrige l'écart entre la position de la pointe de la lamelle et la consigne imposée. Il compare la valeur lue en sortie du capteur à la valeur que l'on voudrait qu'elle ait. Cette consigne correspond à la position initiale de la pointe de la lamelle avant l'expérience. Puis ce correcteur corrige l'écart entre la valeur lue et la consigne au moyen d'un algorithme dont l'entrée est l'écart et dont la sortie est une valeur proportionnelle (P) à cet écart. Cet algorithme est chargé de minimiser constamment la valeur de l'écart. Comme la correction est dynamique, il est muni d'un module différentiel (D) chargé de tenir compte de l'évolution de l'écart. La correction n'est plus simplement proportionnelle mais aussi différentielle. Enfin, afin d'éviter tout écart résiduel à la consigne, on rajoute un module intégral (I) à l'algorithme de correction. Ce module est chargé de minimiser la somme des erreurs.

Le correcteur PID est tiré de la bibliothèque de solution NI-Daq de LabView. On a donc adapté nos entrées et nos sorties au "contrôleur PID temps réel" de cette bibliothèque. Le temps d'incrément de la boucle est inférieur à la milliseconde. De fait, le temps limitant pour la

rétroaction est le temps de réponse des cubes piézo-électriques dont la fréquence de coupure est à $50Hz$. Suivant que l'on fasse une expérience à force constante ou une expérience à déformation constante le temps d'établissement de l'action est différent. Pour les expériences à force constante, le temps d'établissement est le temps de déplacement du piézo ($4/100^{eme}s$). Par contre pour une expérience à déformation constante, le temps d'établissement de la déformation est limité par le fait que les cellules ne se déforment pas de manière instantannée. Il est de l'ordre de quelques secondes.

Un deuxième programme sert à inscrire dans un tableau à la fois l'entrée du PID, ç.à.d la position détectée de la pointe de la lamelle souple, la sortie du PID, le temps ainsi que la température. La mesure aussi bien de la déformation (fluage), que de la force (relaxation), est donnée par la valeur de la sortie du PID qui est proportionnelle au déplacement de la microplaque rigide (fluage) ou de la microplaque souple (relaxation). La sortie PID et le temps nous permettent donc de remonter aux courbes de fluage (contrainte constante) et de relaxation (déformation constante). La position nous renseigne sur la précision avec laquelle est maintenue notre consigne. Enfin, le relevé de la température permet de vérifier *a posteriori* la bonne thermalisation du dispositif sur toute la durée de l'expérience. En effet, toute variation de température est synonyme de dérive des bras porteurs.

Chapitre 3

Protocole et principe d'une expérience de fluage

3.1 Protocole

3.1.1 Préparation des cellules

Pour réaliser une expérience de fluage sur des cellules vivantes, il faut tout d'abord les cultiver. Les protocoles de culture cellulaire lignée-dépendants sont explicités en annexe (Annexe A.1). Les cultures sont ensuite décollées (annexe A.2) et les cellules sont reprises dans des tubes contenant du milieu sans serum placés à $37^{\circ}C$ sous atmosphère contrôlée dans un incubateur. Les cellules y attendent jusqu'à ce qu'elles soient déversées dans la chambre expérimentale. Si on les décolle en faisant agir de la trypsine, on ne les manipule que deux heures après leur décollement. Nous pensons que la trypsine internalise les protéines d'adhésion et qu'il faut un certain temps pour que ces protéines d'adhésion soient réexprimées à la surface de la membrane plasmique. Si par contre on effectue un décollement à froid, on peut manipuler les cellules dans les dix minutes qui suivent. Parallèlement à la préparation des cellules, on traite les lamelles (Annexe B). Les temps de traitement des lamelles varie entre 30 minutes pour un traitement fibronectine et environ 4 heures et demi pour un traitement cadhérine (3 heures pour un traitement glutaraldéhyde). Il faut ensuite compter 15 minutes pour mettre les lamelles en place.

3.1.2 Positionnement des lamelles

Les lamelles, une fois traitées²⁶ (fibronectine et glutaraldéhyde), sont enfichées au bout des bras porteurs. Puis on ajuste la distance entre la pointe des lamelles et le point de pivot de la rotation autour de l'axe Oy de manière à ce que la pointe des lamelles arrivent au voisinage du point de focalisation de l'objectif. On amène ensuite les lamelles dans le champ d'observation puis on place leur tranche parallèlement au plan Oxy grâce à la rotation précise autour de l'axe du bras (Partie II, Fig 1.5). On s'assure du parallélisme en vérifiant que les arêtes de la lamelle coïncident dans le plan Oxy lorsque l'on focalise sur les tranches supérieure et inférieure. Les lamelles sont ensuite placées face à face, *i.e.* leur largeur en regard l'une de l'autre, à une trentaine de microns puis elles sont descendues (translation) au contact de la lame de verre au fond de la chambre expérimentale. Ces étapes de prépositionnement, aussi bien les translations selon les trois axes que la rotation autour de l'axe du bras, s'effectuent à l'aide de micromanipulateurs manuels. Une

²⁶Quand on effectue un traitement cadhérine, on place les lamelles puis on les traite.

fois que les lamelles placées en face l'une de l'autre sont au contact de la lame de verre de la chambre expérimentale, on les bloque au moyen d'une visse de serrage afin d'éviter les dérives mécaniques. C'est à présent les cubes piézoélectriques qui servent à effectuer les translations des bras dans les trois directions de l'espace.

Avant de mettre les cellules dans la chambre expérimentale, on prend soin de remonter les pointes parallèlement à l'axe Oz puis de les éloigner en les translatant parallèlement à l'axe Ox . Cette opération permet d'éviter que les lamelles se frottent lorsque l'on déverse la solution contenant les cellules. La remontée permet d'éviter aux lamelles de racler le fond lorsqu'on déplace la chambre expérimentale pour chercher une cellule. Cette étape dure environ dix minutes. Une fois ces opérations effectuées on déverse dans la chambre expérimentale $3mL$ de DMEM, $5mL$ de DMEM contenant les cellules, à nouveau $3mL$ de DMEM puis on recouvre le tout de $10mL$ de parafine. On ne déverse pas les cellules directement sur les lamelles car avec les remous les cellules ont tendance à aller se coller aux lamelles de manière anarchique. A présent, on attend que les cellules sédimentent au fond de la chambre expérimentale pour en "capturer" une. On ne met pas tout le DMEM seul avant d'ajouter le DMEM avec les cellules car cela augmenterait trop le temps de sédimentation. Une fois que l'on a sélectionné une cellule, on la place au milieu du champ et on descend les lamelles pour les placer juste au dessus de la surface de la lame de verre de la chambre expérimentale. On les approche ensuite de chaque côté de la cellule à quelques microns de la membrane. Puis on amène simultanément les deux lamelles au contact de la cellule qui se retrouve ainsi prise en sandwich. Ces étapes se font avec les cubes piézoélectriques que l'on contrôle manuellement grâce à des potentiomètres. On attend que la cellule adhère aux lamelles. Quand l'angle entre la tangente à la membrane plasmique et lamelle commence à varier, on est sûr que la cellule adhère. A ce moment on la surélève à une quarantaine de microns au dessus du fond, parallèlement à Oz , en actionnant les cubes piézoélectriques simultanément grâce à un programme LabView de contrôle des voies (Partie II, §2.2.1). Le temps d'incubation, le temps que met la cellule à adhérer selon le critère précédent, est très variable d'une cellule à l'autre. En moyenne le temps d'incubation est de 4 minutes. Mais il peut varier d'une minute pour des cellules de lignés jusqu'à 7 minutes pour des cellules issues de cultures primaires. Nous ne savons pas expliquer de telles différences. On déplace enfin simultanément les deux lamelles dans le plan Oxy de manière à positionner l'image de la pointe de la lamelle souple au centre de la plage linéaire du capteur. Cette étape dure aussi environ dix minutes. On est alors prêt pour démarrer une expérience de fluage.

3.2 Principe

3.2.1 Application d'une force constante

La cellule est collée entre les deux plaques à une quarantaine de microns au dessus de fond de la chambre expérimentale et l'image de la pointe de la lamelle souple est placée au centre de la plage linéaire du capteur. En déplaçant le bras porteur de la lamelle souple parallèlement à Oy , on lui impose une déflexion. À l'endroit où la cellule est collée, cette déflexion génère une force de rappel proportionnelle à la déflexion et à la raideur de la lamelle souple $\vec{F} = k \cdot \delta \vec{e}_y$ (Fig 3.1). Cette force est ensuite transmise à travers toute la cellule.

Afin d'appliquer une force constante, il convient de maintenir une déflexion constante entre la pointe de la lamelle souple et la base de son bras porteur. Pour ce faire, à mesure que la cellule s'étire sous l'effet de la force, *i.e.* à mesure que la pointe de la lamelle souple relaxe vers sa position d'équilibre dans le sens des y croissants, la lamelle rigide se déplace dans le sens des y décroissants pour maintenir une déflexion constante entre la pointe de la lamelle souple et

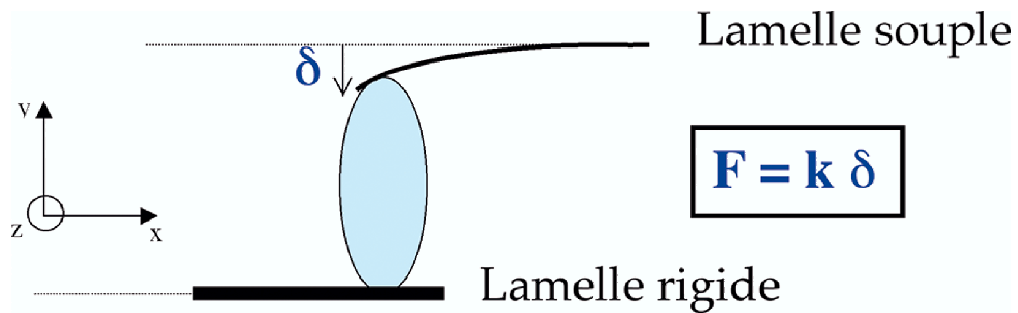


FIG. 3.1 – La déflexion de la lamelle souple exerce une force $\vec{F} = k \cdot \delta \vec{e}_y$ sur la cellule. k est la raideur de la lamelle et δ est le déplacement du bras porteur de la lamelle souple.

son bras porteur. Cette déflexion est maintenue constante au cours du temps par l'intermédiaire d'un programme PID qui régule la position de la lamelle rigide en fonction du déplacement de la pointe mesuré par le capteur (Partie II, §2.2.2). Ainsi on applique une force constante sur la cellule collée entre les deux lamelles. Sous l'action de cette force, la cellule s'étire parallèlement à l'axe Oy . La déformation que nous mesurons est directement proportionnelle au déplacement de la lamelle rigide $\Delta L(t)$ (Fig 3.2).

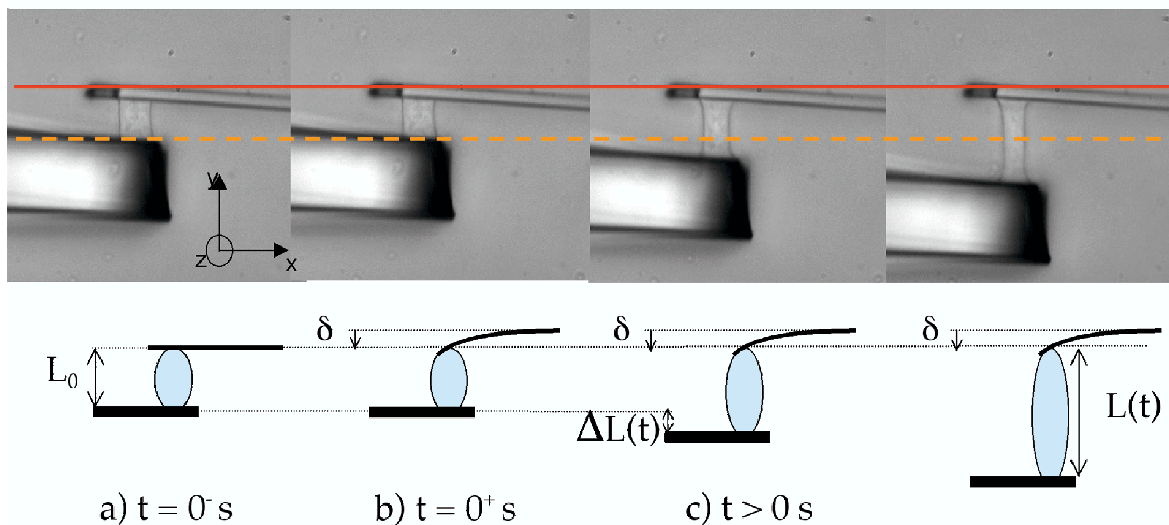


FIG. 3.2 – Principe du fluage en traction : a) la cellule est au repos à $t = 0^- s$; b) à $t = 0^+ s$, la cellule est indéformée et la contrainte est imposée ; c) pour $t > 0 s$, la cellule se déforme sous la force maintenue constante. Son allongement est donné directement par le déplacement de la lamelle rigide.

Le programme de rétrocontrôle de la lamelle rigide est lancé avant que l'on impose la force. Comme on choisit de déplacer le bras porteur de la lamelle souple, la consigne à entrer est la position initiale de la pointe de la lamelle souple. C'est à cette valeur de consigne que le PID va comparer la position réelle de la lamelle souple sur le capteur. Il va ensuite corriger l'écart entre position initiale et position réelle en déplaçant la lamelle rigide. En même temps que tourne ce programme, on acquiert dans un tableau, via un autre programme, les données du temps, de la position réelle sur le capteur, le déplacement de la lamelle rigide et la température. De même après avoir pris une image de la cellule entre les lamelles avant d'appliquer une force, on prend

des images toutes les 15 secondes par l'intermédiaire d'une caméra numérique. On peut détecter grâce à ces images les variations des surfaces de contact ainsi que la variation de la section de la cellule à mi-distance entre les deux plaques.

Pour ce type d'expériences nous pouvons imposer des forces comprises entre $300pN$ et $1\mu N$ (la limitation étant plutôt du côté des basses forces). Avec des surfaces de contacts comprises entre $60\mu m^2$ et $600\mu m^2$, nous pouvons donc appliquer des contraintes allant de quelques dixième de Pa à plusieurs milliers de Pa . Pour les expériences de fluages les contraintes que nous appliquons sont inférieures à $500Pa$. La valeur de la force dépend de la raideur de la lamelle et du déplacement du bras porteur. Quant à la surface de contact, nous ne la maîtrisons pas. En effet pendant les dix minutes de mise en place précédant l'application de la force, la cellule collée entre les deux lamelles a tendance à s'étaler. Cela va de la légère augmentation de surface de contact (Fig 3.3 a) à l'étalement parfois "total" de la cellule entre les deux lamelles (Fig 3.3 b). Il n'y a pas un comportement prédominant quand on les colle au glutaraldéhyde. En ce qui concerne la fibronectine, les cellules ont plutôt tendance à s'étaler, alors qu'il se présente plutôt le cas contraire dans le cas d'un traitement cadhérine.

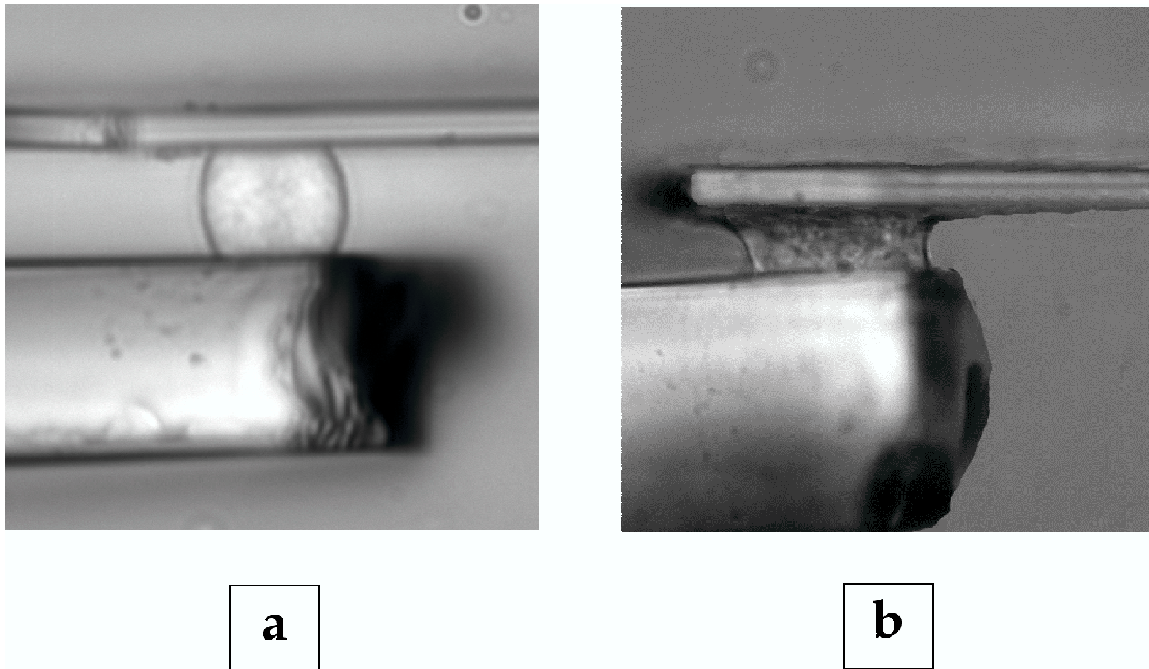


FIG. 3.3 – a) Cellule adhérente, b) Cellule étalée.

3.2.2 Évolution des surfaces de contact

Selon que la cellule s'étale ou pas, nos mesures rhéologiques sont plus ou moins perturbées. Un étalement cellulaire, lors d'une expérience de fluage, *i.e.* sous contrôle de la boucle de rétroaction, se traduit par un déplacement de la lamelle rigide vers la pointe de la lamelle souple. En d'autres termes, la déformation "apparente" diminue et l'effet de l'étalement sur le signal mesuré est identique à celui d'une contraction de la cellule. Nous allons décrire ici les différents cas de figure rencontrés.

1. **cas de non-étalement :** Dans le cas où la cellule ne s'étale pas (Fig 3.4 a), l'expérience de fluage conduit à une déformation qui augmente de manière monotone au cours du temps,

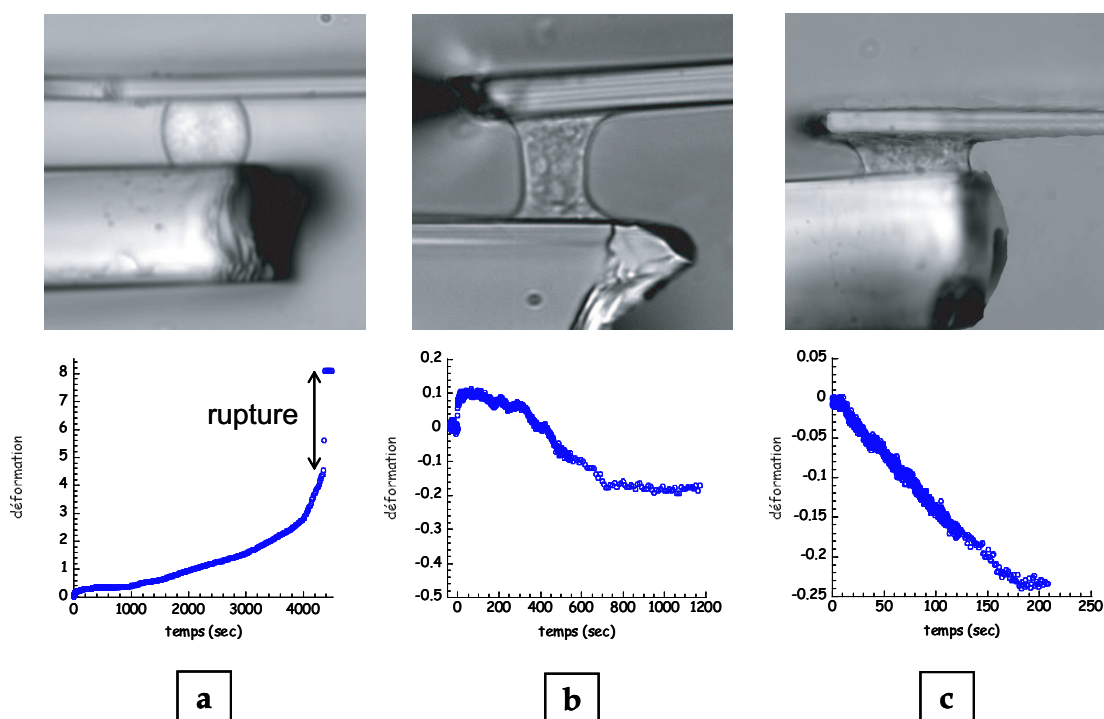


FIG. 3.4 – a) Cellule collée, b) et c) Cellules s'étalant (images prises à $t = 0^-$). La cellule b) voit sont étalement bloquée par la force qu'on lui impose, elle s'étire donc dans un premier temps, puis elle finit par se réétalement. Pour la cellule c), la force que l'on applique ne suffit pas à contrebalancer la force produite par la cellule pour s'étaler.

jusqu'à ce que la cellule se rompe en deux parties restant chacune collées à leur lamelle. Dans ce cas, la réponse de fluage n'est pas polluée par l'étalement.

2. **cas d'étalement "total"** : Dans le cas de figure opposé, la cellule s'étale rapidement entre les deux lamelles (Fig 3.4 c) et l'effet de la force que l'on applique est négligeable devant la contraction apparente due à l'étalement. Dans ce cas la déformation diminue au cours du temps de manière monotone puis atteint au bout d'une cinquantaine de minutes un plateau et on ne peut en aucun cas analyser les courbes. En revanche, il est possible dans ce cas d'attendre la fin de l'étalement pour débiter l'expérience de fluage (plateau d'étalement à 200 secondes, Fig 3.4 c). Dans ce cas, nous pouvons accéder à des expériences de fluage sous faible contrainte puisque la surface de contact est grande. Dans le cas des expériences sur cellules C2.7 (ensemble statistique le plus important) environ un tiers des expériences ont été menées après étalement et nous avons vérifié que les résultats (A et α) obtenus sur cellules non étalées et cellules étalées étaient identiques.
3. **cas intermédiaires** : Il existe aussi les cas intermédiaires (Fig 1.4 b). Soit la cellule s'étale avant application de la force, puis sous l'effet de la force cesse de s'étaler pour ensuite recommencer à s'étaler. Soit la cellule ne s'étalent pas initialement et malgré la contrainte à laquelle elle est assujétie, elle réussit quand même à s'étaler par la suite. Dans ces cas, la déformation croît puis décroît jusqu'à atteindre un plateau.
4. **décrochement** : Il arrive aussi que la cellule mal collée se détache de l'une des lamelles. Si le détachement survient après l'application de la force, nous n'analysons pas les données.

Dans tous les cas de figures, si on veut pouvoir analyser ces expériences en terme de fluage, *i.e.* à contrainte constante, il faut s'assurer que la surface sur laquelle notre force s'applique reste bien constante sur la plage de temps analysée. Toutes les données présentées par la suite satisferont à ce critère.

Troisième partie

Rhéologie à l'échelle d'une cellule
vivante isolée

Réaliser une expérience de fluage sur un matériau consiste à observer la manière dont ce matériau se déforme lorsqu'on le soumet à un échelon de contrainte. Afin d'appliquer un échelon de contrainte sur une cellule unique, nous avons mis au point un dispositif permettant d'étirer une cellule vivante entre deux lamelles de verre, l'une rigide et l'autre souple. L'échelon de contrainte est généré par une deflection imposée de la lamelle souple dont la raideur est calibrée. Nous avons ainsi pu analyser la réponse, *i.e* la déformation. La majorité des résultats, *i.e* le pool statistique le plus important, concerne des myoblastes de souris adhérant aux lamelles *via* des glutaraldéhydes. Quelque soit le type cellulaire ou le traitement des lamelles²⁷ (glutaraldéhydes, cadhérines, fibronectines), nous avons enregistré que la déformation évoluait selon une loi de puissance du temps.

²⁷Partie IV, §2.2

Chapitre 1

Mesure de la fonction de fluage

La fonction de fluage est définie par

$$J(t) \equiv \frac{\varepsilon(t)}{\sigma}, \quad \sigma = cte \quad (1.1)$$

La déformation ε est définie par

$$\varepsilon(t) = \frac{L(t) - L_0}{L_0}, \quad L_0 \text{ est la longueur initiale de la cellule perpendiculairement aux plaques} \quad (1.2)$$

La contrainte est définie par

$$\sigma \equiv \frac{F}{S} \quad (1.3)$$

où la force est telle que $F = k \cdot \delta$ avec k la raideur de la lamelle et δ le déplacement du bras porteur de la lamelle souple. S est la surface de contact.

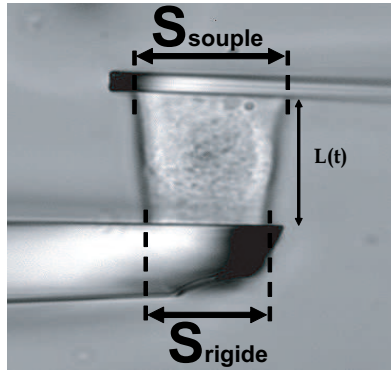


FIG. 1.1 – La contrainte que nous calculons est la moyenne des contraintes qui s'exerce au niveau des surfaces de contact entre la cellule et les lamelles (souple et rigide).

Nous n'avons pas directement accès à S . Supposant une symétrie cylindrique des contacts cellule-lamelle, nous posons $S = \pi \frac{D^2}{4}$, où D est le diamètre apparent du contact (Fig 1.1). Comme en général les surfaces de contacts sont légèrement différentes, on calcule pour les deux (souple et rigide) une contrainte associée σ_{souple} et σ_{rigide} pour ensuite prendre comme contrainte effective la moyenne des deux.

$$\sigma = \frac{\sigma_{rigide} + \sigma_{souple}}{2}$$

Au cours de ce chapitre, on s'intéressera exclusivement à un seul type cellulaire. Nous avons soumis, individuellement, des myoblastes de souris (lignée C2.7) à des expériences de fluage.

1.1 La fonction de fluage suit une loi de puissance

Comme les aires de contacts varient d'une cellule à l'autre, *i.e.* la surface sur laquelle s'applique la force, les contraintes que nous avons imposées varient d'une expérience à l'autre, dans une gamme de $3Pa$ à $180Pa$. Nous avons ainsi pu observer que pour 43 cellules, la déformation suivait, aux temps courts, une loi de puissance en fonction du temps (Fig 1.2).

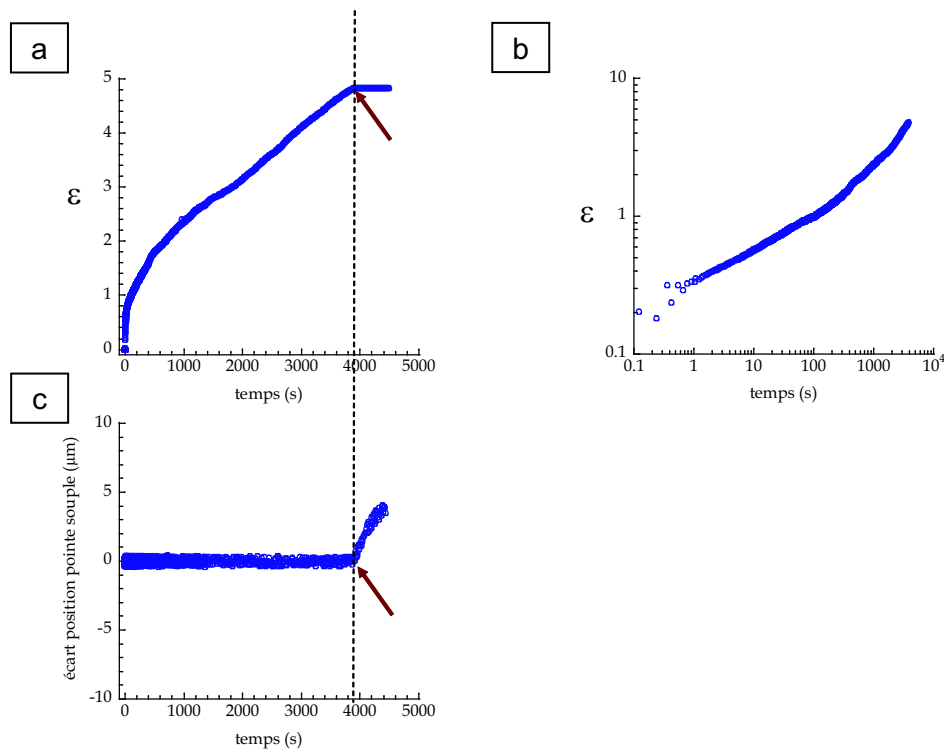


FIG. 1.2 – Déformation résultant d'un échelon de force : a) dans un diagramme linéaire, b) dans un diagramme log-log. La figure c) représente l'écart entre la position réelle de la pointe de la lamelle souple et sa position souhaitée. On voit que lorsque la lamelle rigide arrive en fin de course, la pointe de la lamelle souple n'est plus maintenue dans sa position.

La figure 1.2 présente une expérience typique. En général, sous l'effet de la force, la cellule s'étire continuellement jusqu'à se scinder en deux parties. Dans le cas précis de l'expérience présentée sur la figure 1.2, la course du piézoélectrique contrôlant le déplacement de la lamelle rigide ne suffit pas à entraîner une déformation induisant la rupture (Fig 1.2 a). On peut alors remarquer qu'au moment où la lamelle rigide arrive en butée, la rétroaction ne peut plus s'effectuer et la position de la pointe de la lamelle souple n'est plus constante (Fig 1.2 c). L'erreur maximale sur la position de la lamelle souple est de $\pm 0,4\mu m$ pour une déflexion de $10\mu m$, ce qui représente 4%. La déviation standard de l'écart entre la position réelle de la pointe de la lamelle souple et sa position souhaitée est de $0,2\mu m$, soit 2%. Cette erreur est représentative de l'erreur moyenne sur cette position d'une expérience à l'autre. Si l'on ajoute à cela les 5% d'erreur sur la calibration de la lamelle souple, alors la force que l'on applique est connue avec

une précision de 7%. Si l'on trace la déformation de la cellule en fonction du temps dans un diagramme log-log, on s'aperçoit qu'initialement, *i.e.* pour des temps inférieurs à la centaine de secondes, la déformation suit une loi de puissance (Fig 1.2 b). Si la cellule s'étale par la suite, elle montre initialement le même comportement en loi de puissance. Puis au lieu de se déformer jusqu'à se casser, elle va au contraire s'étaler et diminuer ainsi sa déformation.

Stricto sensu, nous n'appliquons pas une contrainte mais une force constante. Comme nous l'avons signalé auparavant, si on veut prétendre travailler à contrainte constante il faut s'assurer que la surface sur laquelle s'applique notre force est constante dans un intervalle de temps suffisant, *i.e.* au moins égal à la plage de temps sur laquelle on mesure la loi. Considérons à présent les premières minutes de la réponse. Si l'on examine de près les surfaces de contacts, on s'aperçoit qu'elles restent constantes jusqu'à environ 2 minutes (Fig 1.3). Elles montrent par la suite une légère tendance à décroître.

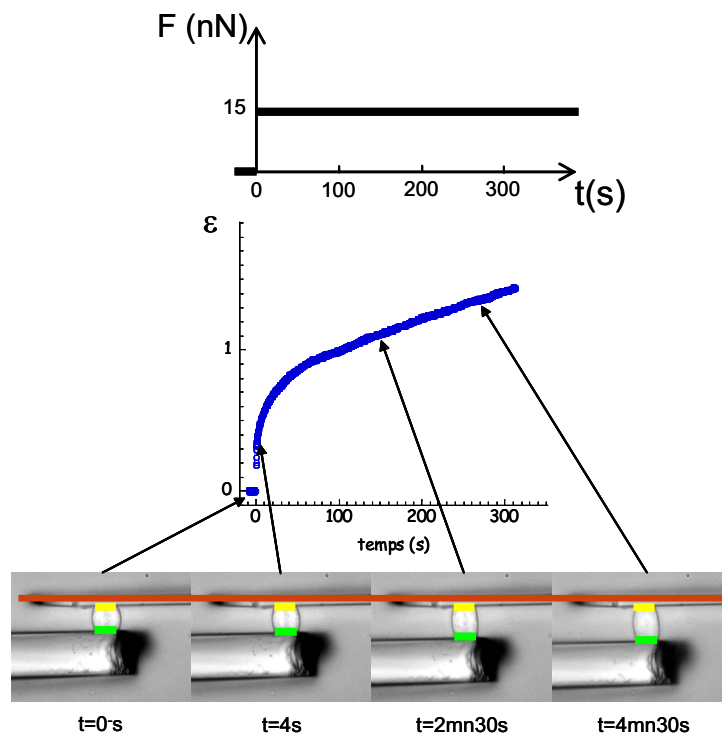


FIG. 1.3 – Contrôle des aires de contacts au niveau des lamelles. Les barres jaunes font toute la même longueur et permettent de voir les changements d'aires de contacts. Dans le cas de cette expérience, on mesure une variation dès $2\text{min}30\text{s}$.

À force constante, la décroissance des aires de contact a pour effet d'augmenter la contrainte qui s'applique effectivement à notre matériaux (Fig 1.4). Par conséquent le régime de fluage n'est valable que pour des temps inférieurs à deux minutes. Pour ce régime nous pouvons alors calculer la fonction de fluage d'après l'équation 1.1. La figure 1.5 montre une fonction de fluage parfaitement ajustée par une loi de puissance sur trois décades temporelles (Fig 1.5). En moyenne nous observons cette réponse sur deux décades et demi. Les premiers points sont toujours à 0, 1s et les derniers points sont en moyenne aux alentours de la trentaine de seconde (points à partir desquels la déformation dévie de la loi de puissance).

Si l'on cherche à ajuster nos données expérimentales par un modèle formé d'un amortisseur

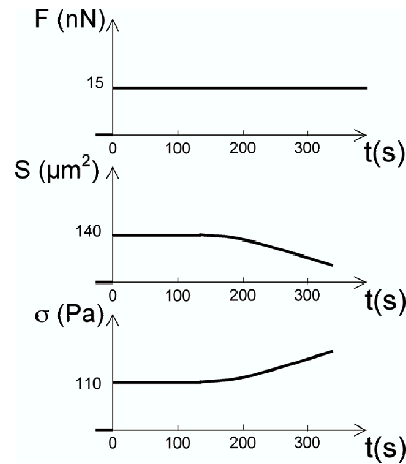


FIG. 1.4 – L'évolution des surfaces de contact et de la contrainte sont ici schématisées. À force constante, un changement de surface de contact entraîne un changement de la contrainte appliquée.

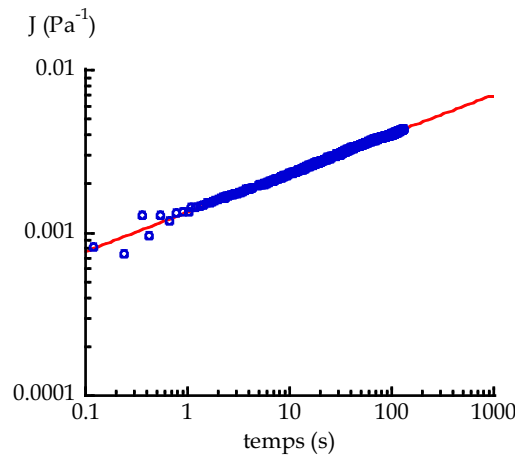


FIG. 1.5 – Fonction de fluage en fonction du temps. Cette fonction est ajustée par une fonction du type $A.t^\alpha$. $\alpha = 0.24116$, $A = 1.13391.10^{-3}$ et $R = 0.99879$

en série avec un solide standard²⁸ (Fig 2.6 Partie I, § 2.2.1), on s'aperçoit qu'en échelle linéaire l'ajustement est acceptable bien que nécessitant quatre paramètres contre deux pour la loi de puissance. Par contre, si nous les représentons avec une échelle logarithmique, au temps courts, on constate que le modèle standard s'écarte notablement de nos points expérimentaux (Fig 1.6).

Nous allons maintenant analyser les distributions des valeurs de l'exposant α et du préfacteur A obtenues pour un échantillon de 43 cellules.

$$J(t) = A.t^\alpha \tag{1.4}$$

²⁸Modèle, jusqu'à peu, le plus employé dans la littérature.

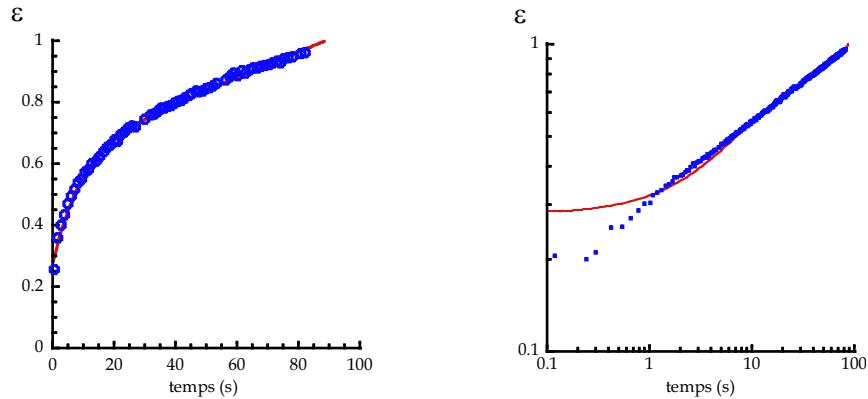


FIG. 1.6 – Ajustement de nos données expérimentales avec un modèle de solide standard en série avec un amortisseur (Fig 3.6, Partie I) en échelle linéaire (gauche) et en échelle logarithmique (droite).

1.1.1 Exposant

L’histogramme de α montre que l’exposant est distribué normalement autour de la valeur moyenne $0,24 \pm 0,01$ avec un écart de type de $0,08$ (Fig 1.7).

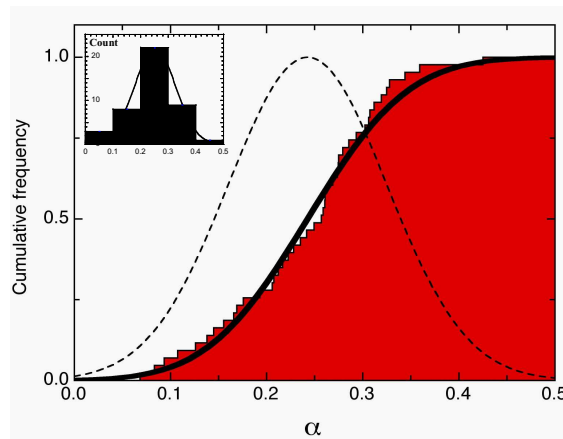


FIG. 1.7 – Distribution de l’exposant : En insert se trouve la représentation de la distribution de α sous forme usuel d’histogramme. L’aire rouge dans la fenêtre principale correspond à l’histogramme cumulé des valeurs de α . La courbe noire représente la fonction erf calculée avec α moyen et l’écart type observé. Par cet ajustement, on détermine les paramètres de la gaussienne que l’on représente sur le même diagramme en pointillés. α est distribué normalement autour de la valeur moyenne $0,24 \pm 0,01$ avec un écart type de $0,08$.

Afin d’éliminer les artefacts inhérents au binning, *i.e.* la manière dont on regroupe les données, on représente l’histogramme cumulé. Cet histogramme s’ajuste très bien par la fonction erf ²⁹ qui représente l’intégrale d’une fonction gaussienne.

$\alpha = 0$ correspond à un comportement de solide élastique parfait et $\alpha = 1$ correspond à un comportement de fluide visqueux newtonien. Le comportement que nous observons ici est

²⁹ $erf(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_{-\infty}^x e^{-\frac{y^2}{2}} dy$

intermédiaire.

1.1.2 Préfacteur

L'histogramme de $\ln A$ montre que le logarithme du préfacteur est distribué normalement autour de la valeur moyenne $-6,04 \pm 0,13$ avec un écart type de 0,82 (Fig 1.8). Encore une fois, afin d'éliminer les artefacts inhérents au binning, on représente l'histogramme cumulatif. Cet histogramme s'ajuste très bien par la fonction *erf*. Le préfacteur A est donc distribué de manière log-normale. La valeur moyenne est alors décalée vers les grandes valeurs de A . La valeur médiane de A , correspondant à la valeur moyenne du $\log A$, s'établit à $(2,4 \pm 0,3) \cdot 10^{-3} Pa^{-1} \cdot s^{-\alpha}$.

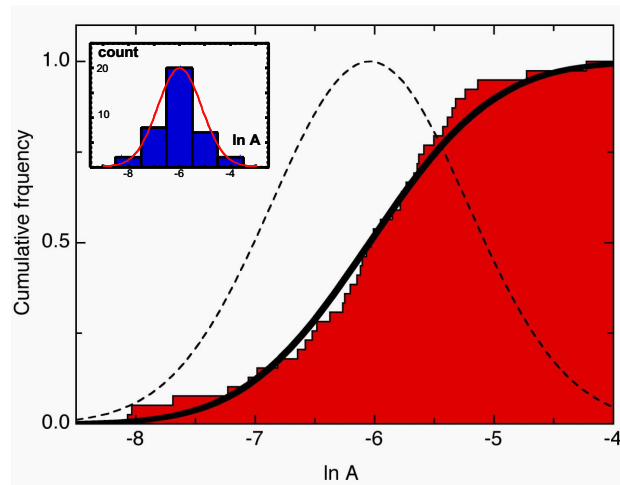


FIG. 1.8 – Distribution du préfacteur : En insert se trouve la représentation de la distribution de $\ln A$ sous forme usuel d'histogramme. L'aire rouge dans la fenêtre principale correspond à l'histogramme cumulé des valeurs de $\ln A$. La courbe noire représente la fonction *erf* calculée avec $\ln A$ moyen et l'écart type observé. Par cet ajustement, on détermine les paramètres de la gaussienne que l'on représente sur le même diagramme en pointillés. On en déduit que la valeur médiane de A est $(2,4 \pm 0,3) \cdot 10^{-3} Pa^{-1} \cdot s^{-\alpha}$.

Cette distribution log-normale du préfacteur se reflète indépendamment de tout ajustement sur la distribution de la déformation mesurée à 0,1s. La déformation finale, *i.e.* la déformation atteinte à la fin du régime de fluage, est comprise entre 0,3 et 0,9. Les distributions log-normale sont généralement associées à des phénomènes en cascade comme tel est le cas pour certains phénomènes de croissance (turbulence) et de fragmentation (fracture)[Kolmogorov, 1962]. Notons que la surface de contact que nous calculons n'est pas forcément la surface de contact effective. L'idée est que la contrainte pourrait se répartir sur un nombre de point d'application qui sont les sites d'adhésion plutôt que sur tout le disque de contact.

Remarque : Il est aussi possible d'effectuer des expériences pour lesquelles la force appliquée sert à compresser la cellule. Dans ce cas on observe encore un comportement en loi de puissance avec des paramètres tout à fait comparable (Fig 1.9). Cependant, au fur et à mesure que la cellule s'aplatit entre les deux lamelles on facilite son étalement et on sort relativement rapidement du régime de fluage pour lequel la surface de contact doit être constante. Nous n'avons donc pas fait d'étude statistique dans cette configuration.

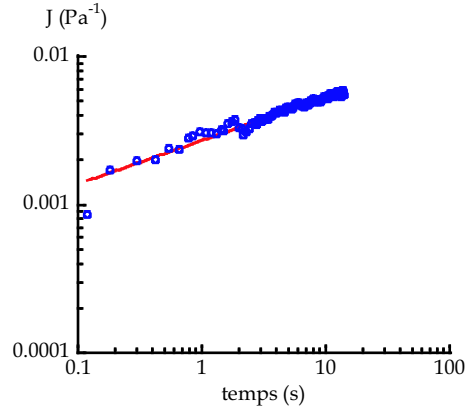


FIG. 1.9 – Fonction de fluage relative à une expérience lors de laquelle la force est appliquée dans le sens de la compression.

1.2 Étude du régime linéaire

La linéarité dont il est question dans cette section, concerne la relation entre contrainte et déformation lors d'une expérience de fluage. On s'intéresse donc au domaine de contrainte pour lequel :

$$\forall \lambda \text{ tel que } \lambda \sigma \in [0; \sigma_c], \epsilon_{\lambda \sigma}(t) = \lambda \epsilon_{\sigma}(t) \quad (1.5)$$

où σ_c est la contrainte à partir de laquelle, la relation contrainte déformation cesse d'être linéaire.

Afin de répondre à cette question, nous avons, dans un premier temps, étudié le comportement en fonction de la contrainte des paramètres ajustables de notre fonction de fluage. Puis dans un second temps, nous avons voulu vérifier l'étendue de la plage linéaire cellule par cellule. Nous avons pour cela réalisé des expériences au cours desquelles nous imposons des contraintes oscillantes d'amplitude variable.

1.2.1 Dépendance des paramètres ajustables en fonction de la contrainte

Le régime linéaire est définie par l'équation 1.5. Ce qui signifie que :

$$\forall \lambda \text{ tel que } \lambda \sigma \in [0; \sigma_c], J_{\lambda \sigma}(t) = \frac{\epsilon_{\lambda \sigma}(t)}{\lambda \sigma} = \frac{\lambda \epsilon_{\sigma}(t)}{\lambda \sigma} = \frac{\epsilon_{\sigma}(t)}{\sigma} = J_{\sigma}(t) \quad (1.6)$$

On s'attend donc à ce que dans ce domaine la fonction de fluage ne dépende pas de la contrainte appliquée. Autrement dit, les paramètres ajustables A et α de notre fonction de fluage doivent être indépendants de σ . La figure 1.10 représente A et α en fonction de la contrainte appliquée. Un couple de points (A, α) représente une expérience donc une cellule. On s'aperçoit que sur une gamme de contraintes allant jusqu'à un peu moins de $200 Pa$ ($\sigma_c \approx 200 Pa$), ces paramètres ne semblent pas dépendre de la contrainte appliquée. Fabry et al. [Fabry, 2003b] ont mesuré sur des cellules musculaires lisses des voies respiratoires que le module élastique $G'(0.75 Hz)$ comme le module de perte $G''(0.75 Hz)$ étaient indépendants de la contrainte sur une gamme de $1.8 Pa$ à $130 Pa$. Cette indépendance est aussi vérifiée pour une fréquence de $0.1 Hz$ ainsi que pour $10 Hz$. Nos résultats tendent donc à confirmer ce comportement.

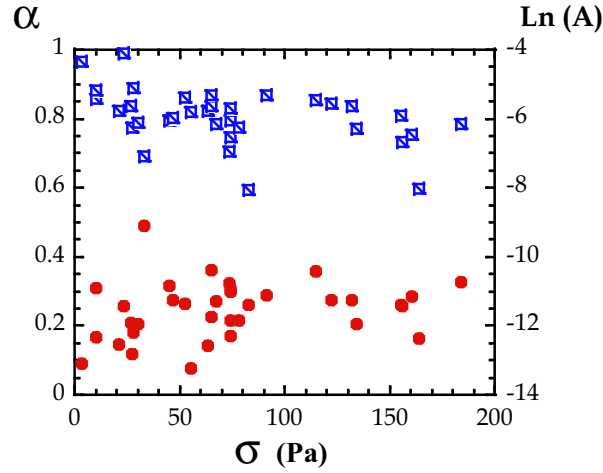


FIG. 1.10 – Comportement des paramètres ajustables, exposant α et préfacteur A , de la fonction de fluage en fonction de la contrainte imposée.

1.2.2 Expériences d'oscillations sur cellule unique

Qu'en est-il pour une cellule unique ? Pour répondre à cette question nous avons pratiqué des expériences dans lesquelles nous imposons des contraintes oscillantes d'amplitude variable et où nous mesurons l'amplitude des déformations résultantes.

Nous demandons au bras porteur de la lamelle souple de se déplacer sinusoïdalement, ce qui a pour effet d'imposer une déflexion δ (donc une contrainte σ) sinusoïdale. La déflexion est liée à la contrainte par la relation : $\sigma = \frac{(\delta-p) \cdot k}{S}$ où k est la raideur de la lamelle et S est la surface de contact (Fig 1.11). La contrainte est de la forme :

$$\sigma(t) = \sigma_0 \sin(\omega t) \quad (1.7)$$

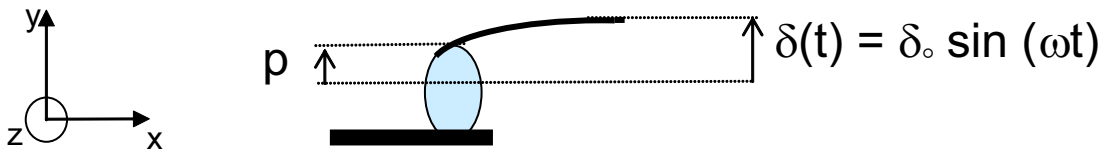


FIG. 1.11 – Principe d'application de la contrainte oscillante. On déplace la base de la lamelle souple δ et on relève le mouvement de la pointe sur le capteur.

On suit ensuite la déformation provoquée par la déflexion de la lamelle souple grâce au déplacement de la pointe p que l'on enregistre *via* le capteur. p est relié à la déformation par la relation : $\varepsilon = \frac{p}{L_0}$ où L_0 est la longueur initiale. Enfin on ajuste la déformation ($\varepsilon(t) = \varepsilon_0 \sin(\omega t + \varphi)$) afin de déterminer l'amplitude de la déformation résultante ε_0 (Fig 1.12).

Toutes les mesures sont effectuées à une fréquence de 10 Hz . L'amplitude des déplacements imposés au bras porteur de la lamelle souple varie entre $0.5 \mu\text{m}$ et $30 \mu\text{m}$. Pour chaque amplitude on acquiert sur un temps correspondant à 10 périodes ($= 10\text{s}$). Déterminer la plage du régime linéaire revient à déterminer la contrainte à partir de laquelle la relation entre ε_0 et σ_0 cesse d'être linéaire. Pour ce faire nous reportons ε_0 en fonction de σ_0 (Fig 1.13).

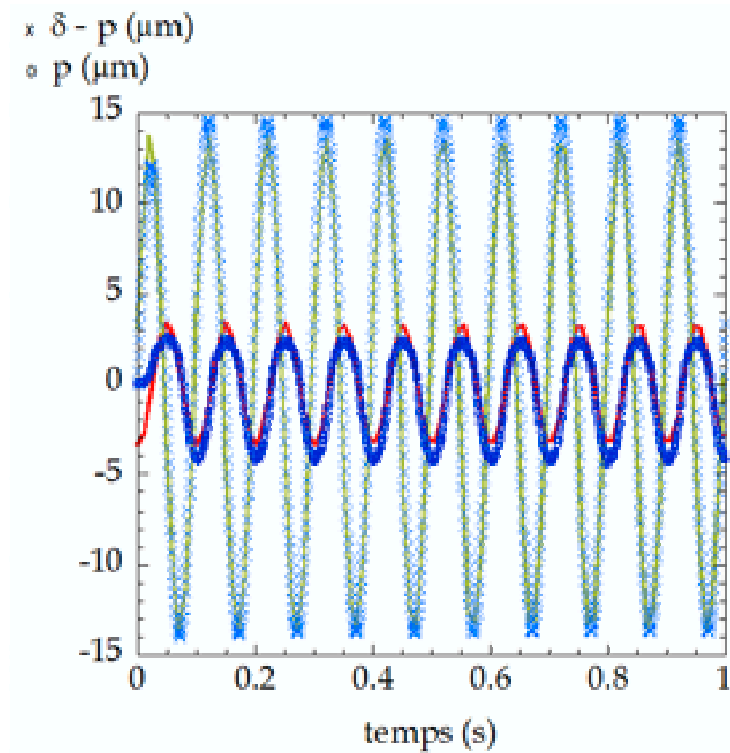


FIG. 1.12 – La déflexion $\delta - p$ (\times) de la lamelle souple est proportionnelle à la contrainte imposée. Le déplacement p (\circ) de la pointe est quant à lui proportionnel à la déformation. Ces deux grandeurs sont ajustées par une fonction sinusoidale.

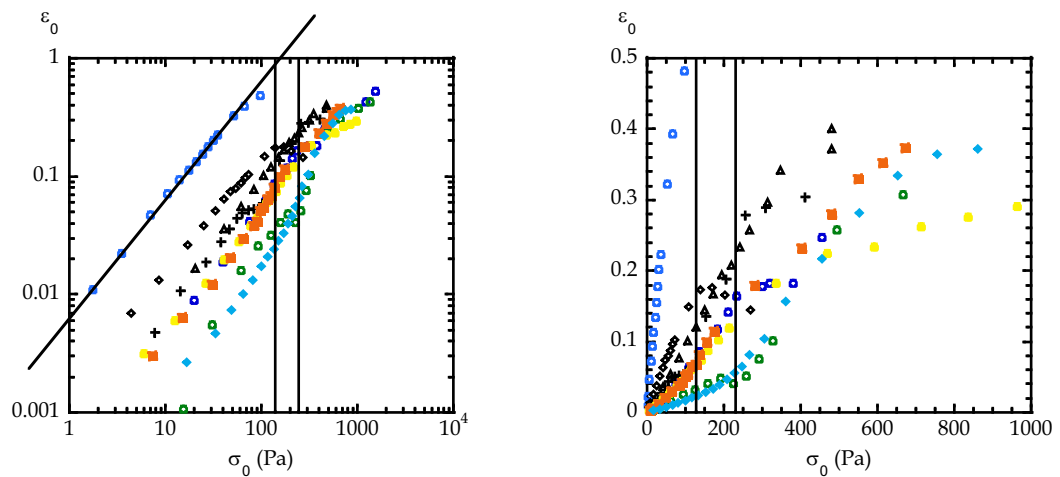


FIG. 1.13 – Amplitude de la déformation résultante en fonction de l'amplitude de la contrainte imposée ($N = 11$ C2.7) (à gauche en échelle log-log, à droite en échelle linéaire). La limite du régime linéaire se situe entre les barres verticales. La droite représentée sur la courbe en échelle log-log a une pente égale à l'unité.

La courbe de ε_0 en fonction de σ_0 présente une première partie linéaire correspondant au domaine de linéarité. Au delà d'une valeur σ_c , la courbe présente une brisure de pente (Fig 1.13).

Nous avons ainsi pu tester 11 cellules (C 2.7). Il en ressort que la valeur moyenne de σ_c est $184 \pm 30 Pa$ avec un écart type de $98 Pa$. De la même manière, on obtient une valeur moyenne de la déformation critique ε_c égale à 0.18 ± 0.05 avec un écart type de 0.15 .

Chapitre 2

Comparaison et confrontation de nos résultats aux données existantes

2.1 Comparaison avec les mesures de rhéologie dynamique

2.1.1 Comparaison avec les mesures sur cellule vivante

Comme nous avons pu le voir dans la première partie (§3.2.2), la plupart des expériences rhéologiques sur cellules vivantes sont des mesures en dynamique explicitant la forme du module élastique G' et du module de perte G'' en fonction de la fréquence de sollicitation. Pour pouvoir nous comparer à ces mesures, il faut d'abord déterminer la relation entre notre fonction de fluage J et les modules G' et G'' .

Pour cela, nous prenons un matériau ayant cette fonction de fluage J et on écrit la relation entre contrainte et déformation dans le cas où la contrainte varie en fonction du temps dans le régime linéaire :

$$\epsilon(t) = \sigma(0)J(t) + \int_0^t J(t-t')\dot{\sigma}(t')dt' \quad (2.1)$$

Effectuons une transformée de Laplace³⁰ de l'équation 2.1 :

$$\tilde{\epsilon}(s) = s\tilde{J}(s)\tilde{\sigma}(s) = J^*(s)\tilde{\sigma}(s) \quad \text{avec} \quad J^*(s) = s\tilde{J}(s) \quad (2.2)$$

La transformée de Laplace d'une fonction puissance donne :

$$\tilde{J}(s) = \frac{A\Gamma(1+\alpha)}{s^{1+\alpha}} \quad \text{avec} \quad \Gamma(1+\alpha) = \int_0^\infty e^{-x}x^\alpha dx \quad (2.3)$$

Faisons de même dans le cas où l'on impose une déformation variant en fonction du temps :

$$\sigma(t) = \epsilon(0)G(t) + \int_0^t G(t-t')\dot{\epsilon}(t')dt' \quad (2.4)$$

$$\tilde{\sigma}(s) = s\tilde{G}(s)\tilde{\epsilon}(s) = G^*(s)\tilde{\epsilon}(s) \quad \text{avec} \quad G^*(s) = s\tilde{G}(s) \quad (2.5)$$

Des équations 2.2. et 2.5, on tire que :

$$G^*(s) = \frac{1}{J^*(s)} \quad (2.6)$$

³⁰On définit la transformée de Laplace comme suit : $LT[f(t)] = \tilde{f}(s) = \int_0^\infty f(t')e^{-st'} dt'$

En injectant l'équation 2.3 dans l'équation 2.6, on obtient :

$$G^*(s) = \frac{s^\alpha}{A\Gamma(1+\alpha)} \quad (2.7)$$

Donc pour $s = i\omega$, on obtient :

$$G^*(\omega) = \frac{\omega^\alpha e^{i\alpha\frac{\pi}{2}}}{A\Gamma(1+\alpha)} \quad (2.8)$$

Comme par ailleurs, $G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega)$, alors :

$$\begin{cases} G'(\omega) = \frac{\omega^\alpha}{A\Gamma(1+\alpha)} \cos(\alpha\frac{\pi}{2}), \\ G''(\omega) = \frac{\omega^\alpha}{A\Gamma(1+\alpha)} \sin(\alpha\frac{\pi}{2}). \end{cases} \quad (2.9)$$

Donc si on mesure une fonction de fluage en loi de puissance, on s'attend théoriquement à ce que le module élastique et le module de perte suivent eux aussi une loi de puissance avec le même exposant. Ce qui est vérifié, puisque nous mesurons $\alpha = 0.24$ pour des myoblastes, alors que les expériences en dynamique révèlent un exposant compris entre 0.16 et 0.30 pour différents types cellulaires. Il est alors maintenant possible de comparer notre préfacteur A au préfacteur du module élastique G_0 (Eq 2.9) définit par $G'(\omega) = G_0(\frac{\omega}{2\pi})^\alpha$. Nous trouvons que :

$$G_0 = (2\pi)^\alpha \frac{\cos(\alpha\frac{\pi}{2})}{A\Gamma(1+\alpha)} \quad (2.10)$$

Si nous calculons $G'(f_0 = 1Hz) = G_0 f_0^\alpha$ avec les paramètres que nous avons obtenus sur les myoblastes, nous déterminons $G'(1Hz) = 663_{-90}^{+100} Pa$. Cette valeur se compare très bien au $G'(1Hz) = 710Pa$ trouvé par des mesures d'AFM sur des cellules épithéliales bronchiques (BEAS-2B) [Alcaraz, 2003]. Par ailleurs, les expériences de magnétocytométrie [Fabry, 2003b] donne un G_0 compris entre $300Pa$ et $3000Pa$ suivant le type cellulaire. Pour toutes ces expériences, les billes sont recouverte de RGD et s'attachent donc au cytosquelette d'actine.

2.1.2 Comparaison avec le comportement de "cytosquelettes synthétiques"

L'actine est souvent invoquée comme étant l'élément principal dans la réponse mécanique du cytosquelette. On peut alors se demander comment se compare la réponse que nous observons, *i.e* sur un véritable cytosquelette, à la réponse d'un cytosquelette synthétique constitué d'actine.

Un comportement analogue en loi de puissance est aussi observé pour des "solutions" de F-actine (filaments non réticulés entre eux). Ainsi suivant les techniques, on observe une dépendance en $\omega^{3/4}$ [Amblard, 1996] [Gittes, 1997] [Gittes, 1998] [Schmidt, 2000] ou en $\omega^{1/2}$ [Gardel, 2003] [Crocker, 2000] du module élastique G' et du module de perte G'' (Partie I, §3.1.1). Ces exposants sont supérieurs à celui que nous mesurons. Par conséquent la cellule est plus "solide" qu'une solution de F-actine. Toutefois, notre exposant 0.24 se compare très bien à celui obtenu pour un gel d'actine réticulé avec de l' α -actinine [Tseng, 2001]. En identifiant les deux comportements, on pourrait penser que les propriétés mécaniques du cytosquelette reposent principalement sur le réseau constitué de filaments d'actine reliés les uns aux autres par de l' α -actinine. Cependant, étant donné que les trois réseaux de filaments protéiques (F-actine, microtubules et filaments intermédiaires) sont reliés entre eux par les plakines [Wiche, 1998] [Yang, 1996], il est prématuré d'affirmer que l'on ne sonde que le réseau d'actine. D'autre part, des mesures sur des échantillons de filaments intermédiaires ainsi que sur des échantillons de microtubules semblent révéler un comportement du module élastique G' en loi de puissance [Janmey, 1991b].

C'est pour répondre à la question : "Quelle est la prédominance de l'actine dans la réponse mécanique ?", que nous avons entrepris deux types d'expériences : i) mesures sur cellules traitées à la cytochalasine D, ii) cellules knock-out sans l'un des trois filaments cytosquelettiques. Nous verrons, dans la Partie IV, que si les expériences avec la cyto D ne furent pas très concluantes, celles menées sur des cellules n'ayant pas de filaments intermédiaires montrent que leur contribution au comportement en loi de puissance est négligeable³¹.

2.2 Comparaison avec l'étirement uniaxial sans rétroaction : le problème de l'élasticité instantannée

En imposant une rampe de déformation, O. Thoumine et A. Ott [Thoumine, 1997] observent que contrainte et déformation évoluent de manière proportionnelle aux temps courts, reflétant ainsi un comportement élastique de la cellule. Or, la loi de puissance que nous mesurons nous apprend que processus dissipatifs et élastiques sont liés. Comment expliquer cette différence alors que la géométrie de la déformation est la même dans les deux expériences ? Nous allons montrer qu'en tenant compte i) de la relation géométrique entre contrainte et déformation et ii) en introduisant la fonction de fluage en loi de puissance comme nous l'observons, il est possible de reproduire une courbe contrainte-déformation ayant l'allure d'une droite avec une échelle de représentation linéaire mais qui révèle un comportement en loi de puissance sur une échelle log-log ($\sigma \approx \varepsilon^{1+\alpha}$).

2.2.1 Description de l'expérience

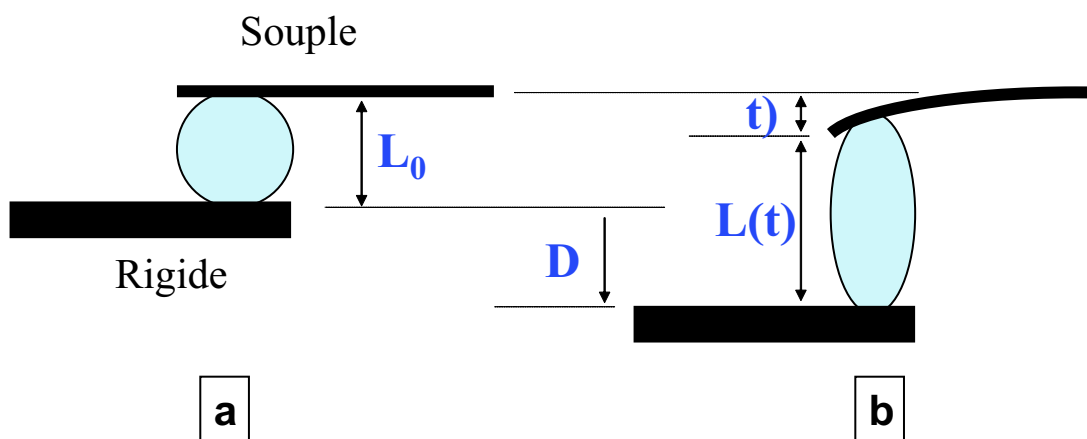


FIG. 2.1 – Schéma de principe de l'expérience d'O. Thoumine et A. Ott. a) Avant d'imposer le déplacement de la lamelle rigide, la cellule est non déformée et sa longueur perpendiculaire aux plaques est L_0 . b) Lorsqu'on l'on impose un déplacement de la lamelle rigide à vitesse constante la force $F = k.\delta$ et la déformation $\varepsilon = \frac{D-\delta}{L_0}$ évoluent simultanément. Une fois le déplacement final D atteint, la force relaxe et la déformation augmente.

Décrivons d'abord les conditions expérimentales. Au lieu d'imposer une contrainte constante, le principe était de déplacer la lamelle rigide avec une vitesse constante $v_0 = \frac{D_0}{\tau_0}$ d'une dizaine de microns ($D_0 = 12\mu m$ et $\tau_0 = 10s$) et d'observer comment évoluait la force F au cours du

³¹Ceci n'est valable que pour les petites déformations

temps (Fig 2.1). O. Thoumine et A. Ott observaient alors que la force augmentait pendant la phase de déplacement de la lamelle rigide à vitesse constante, puis que elle relaxait une fois le déplacement D atteint. Nous nous intéressons ici à la phase de déplacement de la lamelle rigide. En supposant que la fonction de fluage est en loi de puissance, nous allons calculer l'expression attendue pour la déformation dans l'expérience de O. Thoumine et A. Ott.

2.2.2 Expression de la relation liant contrainte et déformation

En observant la géométrie de l'expérience, nous nous rendons compte que :

$$L_0 + D(t) = L(t) + \delta(t) \quad (2.11)$$

La déformation s'écrit :

$$\varepsilon(t) = \frac{L(t) - L_0}{L_0} = \frac{D(t) - \delta(t)}{L_0} \quad (2.12)$$

Déplacer la lamelle rigide à vitesse constante $v_0 = \frac{D_0}{\tau_0}$ signifie que $D(t) = v_0 t$. Il est aussi possible d'exprimer δ en fonction de σ : $\delta(t) = \frac{S_0 \sigma(t)}{k}$. En posant :

$$\tau_* = \frac{L_0 \tau_0}{D_0} \quad (2.13)$$

$$\sigma_* = \frac{k L_0}{S_0} \quad (2.14)$$

l'équation 2.12 devient :

$$\varepsilon(t) = \frac{t}{\tau_*} - \frac{\sigma(t)}{\sigma_*} \quad (2.15)$$

En considérant que la contrainte qui s'exerce sur la cellule reste dans le régime linéaire au cours de l'expérience, on écrit :

$$\varepsilon(t) = \sigma(0)J(t) + \int_0^t J(t-t')\dot{\sigma}(t')dt' \quad (2.16)$$

En injectant cette dernière équation (2.16) dans la précédente (2.15), on obtient :

$$\frac{t}{\tau_*} - \frac{\sigma(t)}{\sigma_*} = \int_0^t J(t-t')\dot{\sigma}(t')dt' \quad (2.17)$$

Si nous appliquons à présent une transformée de Laplace à cette équation (2.17), nous pouvons écrire σ en fonction de la fonction de fluage J et des paramètres σ_* et τ_* :

$$\tilde{\sigma}(s) = \frac{\sigma_*}{\tau_* s^2 [1 + \sigma_* s \tilde{J}(s)]} \quad (2.18)$$

En développant en série entière, on obtient :

$$\tilde{\sigma}(s) = \frac{\sigma_*}{\tau_*} \left[\frac{1}{s^2} + \sum_{n=1}^{\infty} s^{n-2} (-\sigma_* \tilde{J}(s))^n \right] \quad (2.19)$$

2.2.3 Cas d'une fonction de fluage en loi de puissance

Injectons maintenant la forme en loi de puissance de la fonction de fluage avec les paramètres A et α que nous mesurons. En remarquant que pour une fonction puissance $J(t) = A.t^\alpha$, nous avons : $s^{n-1}(TL[J(t)])^n = \frac{\Gamma^n(1+\alpha)}{\Gamma(1+n\alpha)} TL[J^n(t)]$. Il suffit alors d'inverser la relation 2.19, afin d'obtenir la dépendance temporelle de la contrainte σ :

$$\sigma(t) = \frac{\sigma_*}{\tau_*} \left[t + \sum_{n=1}^{\infty} (-\sigma_*)^n \frac{\Gamma^n(1+\alpha)}{\Gamma(1+n\alpha)} \int_0^t J^n(u) du \right] \quad (2.20)$$

Enfin comme $(1+n\alpha)\Gamma(1+n\alpha) = \Gamma(2+n\alpha)$, on tire que :

$$\sigma(t) = \sigma_* \frac{t}{\tau_*} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{[-\Gamma(1+\alpha)\sigma_* A t^\alpha]^n}{\Gamma(2+n\alpha)} \quad (2.21)$$

L'évolution temporelle de la déformation est donnée par l'équation 2.15 :

$$\varepsilon(t) = \frac{t}{\tau_*} \left(1 - \sum_{n=0}^{\infty} \frac{[-\Gamma(1+\alpha)\sigma_* A t^\alpha]^n}{\Gamma(2+n\alpha)} \right) \quad (2.22)$$

À présent, à partir de nos valeurs caractéristiques de L_0 et S_0 et de la valeur de k mesurée par [Thoumine, 1997], on calcule les fonctions $\sigma(t)$ et $\varepsilon(t)$ à différents temps. Avec $\sigma_* = 90 Pa$ et $\tau_* = 11s$ et pour $n \leq 3$ on obtient des points qu'on l'on ajuste en apparence avec une droite (Fig 2.2).

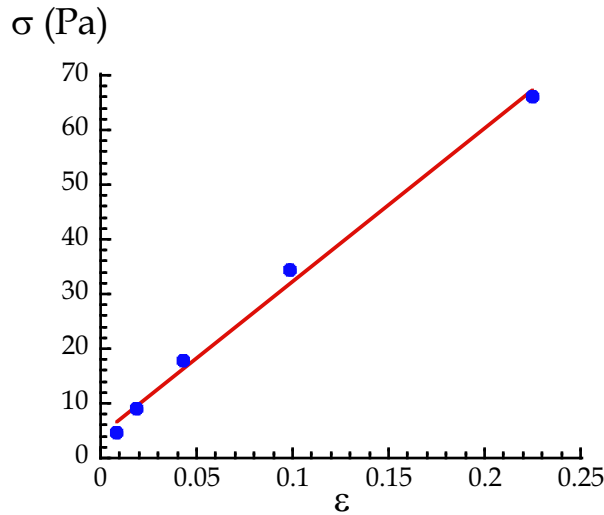


FIG. 2.2 – Les points bleus représentent des couples $(\varepsilon(t), \sigma(t))$ calculés d'après les équations A.11 et A.12 pour différentes valeurs de t . Ces points sont ajustés par une loi linéaire.

L'ajustement semble a priori acceptable. Cependant si nous passons à une représentation logarithmique, nous nous apercevons qu'il n'en est rien (Fig 2.3).

Il n'y a donc pas véritablement de désaccord entre le comportement en loi de puissance que nous observons en fluage et le comportement en apparence linéaire d'une expérience sans contrôle de la contrainte. Il aurait été nécessaire d'avoir des résolutions temporelle (temps courts) et spatiale (faibles déformations) afin d'obtenir une gamme de temps suffisante pour révéler le

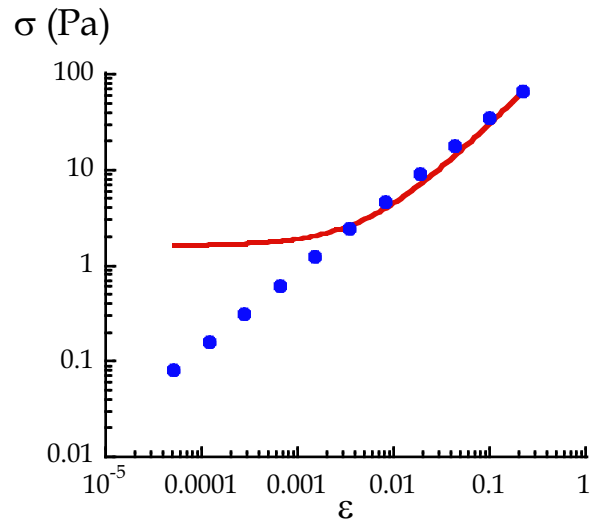


FIG. 2.3 – Représentation en échelle logarithmique de la figure 2.2.

comportement en loi de puissance. La géométrie des lamelles non coudées, couplé à une détection par analyse d'images, ne le permettait pas³².

³²Comme les lamelles n'arrivent pas tangentiellement au plan focal, elle sont défocalisées et la lecture de la taille cellulaire est floue (Partie II).

Chapitre 3

Discussion

3.1 Remarques générales

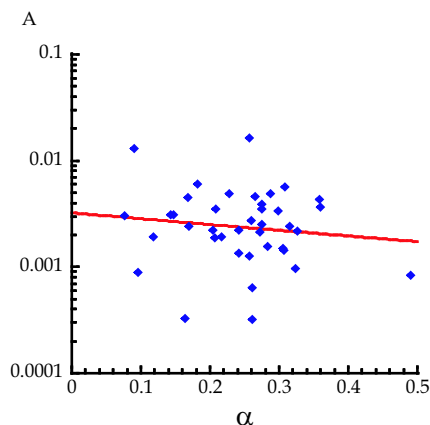
3.1.1 Indéformabilité à temps court et écoulement à temps long

Examinons tout d'abord les implications de cette loi de puissance sur le comportement de la déformation à temps court et à temps long. A $t = 0^+$, la loi de puissance prédit une déformation nulle. Comme nos premiers points de mesures sont acquis avec une fréquence de $10Hz$, on s'assure que la cellule est effectivement indéformable au temps très court à l'aide de la vidéomicroscopie avec fréquence d'échantillonnage de $25Hz$. $4.10^{-2}s$ après application de l'échelon de contrainte, on ne mesure aucune déformation notable, *i.e.* la longueur $L(4.10^{-2}s) = L_0 \pm O, 1\mu m$. La cellule est donc indéformable à temps court. Aux temps long, si la cellule ne s'étale pas, la déformation augmente continuellement jusqu'à la rupture de la cellule. Le matériau cellule a donc un comportement fluide au temps long. Par conséquent, sous contrainte, le matériau cellule se comporte globalement comme un fluide : indéformable à temps court et s'écoulant à temps long. D'autre part, le fait que nous mesurons une loi de puissance et non une somme finie d'exponentielles suggère qu'il existe un nombre infini de temps de relaxation associés aux processus dissipatifs de notre système. Ce comportement ne peut donc pas être modélisé par un modèle mécanique équivalent faisant intervenir un nombre fini de ressorts et d'amortisseurs.

Remarque : D'un point de vue évolutionniste, il n'est pas surprenant d'observer une infinité de temps de relaxation. En effet, on comprend bien qu'une cellule n'ayant pas de temps de relaxation caractéristique soit mieux adaptée aux échelles de temps des contraintes naturelle (*a priori* infinie aussi) qu'une cellule n'en possédant qu'un petit nombre.

3.1.2 Dimension du préfacteur A

Autant l'exposant de la loi de puissance est un paramètre adimensionné, le préfacteur quant à lui s'exprime en $Pa^{-1}.s^{-\alpha}$. Cela signifie qu'il renferme une contrainte caractéristique et un temps caractéristique. On aurait alors envie d'écrire A comme $A = \frac{A'}{\sigma_0.t_0}$, avec A' étant un paramètre sans dimension, σ_0 et t_0 étant la contrainte et le temps caractéristique. On trace alors A en fonction de α , puis on ajuste les données (Fig 1.13). On obtient $t_0 = 3,5s$ et le rapport $\frac{A'}{\sigma_0} = 3, 2.10^{-3}Pa^{-1}$. Notons cependant que le coefficient de régression est très faible et que l'on ne peut séparer les paramètres A' et σ_0 . Par conséquent, on ne s'intéressera par la suite qu'à A .

FIG. 3.1 – A vs α .

Remarque : Notons, enfin, qu'il paraît curieux de trouver un temps caractéristique t_0 pour un système qui *a priori* n'en a pas. Nous verrons plus tard que la théorie modélisant le comportement des matériaux vitreux mous prévoit l'existence d'un tel temps au travers de la fréquence d'essai Γ_0 (Annexe E).

3.2 Quels sont les modèles qui prédisent une loi de puissance ?

Plusieurs scénarios permettent d'expliquer cette large distribution de temps de relaxation. L'un, dessiné par P.Sollich [Sollich, 1997], considère une nouvelle classe de matériaux : les matériaux vitreux mous. L'autre, fruit du travail de H. Winter et F.Chambon [Winter, 1986], prédit aussi un tel comportement rhéologique pour un système à la transition sol-gel (entre l'état "sol" et l'état gel).

3.2.1 Les matériaux vitreux mous

Pour décrire théoriquement ces objets désordonnés et hors d'équilibre, on découpe le matériau en éléments de tailles mésoscopiques s'organisant de manière désordonnée à l'intérieur du matériau. Le désordre impose à chaque élément d'être contraint par les interactions avec ses voisins et plonge chacun des éléments dans des puits d'énergie E . E représente en quelque sorte une énergie d'activation au delà de laquelle l'élément se réarrange et de fait réarrange le matériau dans son ensemble. Les états d'énergie sont donc métastables. Les réarrangements sont activés par une température effective x qui reflète les interactions dans le système (un bruit, une agitation mécanique). Dans notre cas cette température effective pourrait être vue comme une quantification de l'activité protéique des réarrangements du cytosquelette.

Attention, il faut prendre bien soin de dissocier le comportement thermodynamique classique (T) et le comportement thermodynamique "effectif" (x). En effet, au sens de la thermodynamique classique ces matériaux sont constamment hors d'équilibre. Cependant, au sens de la thermodynamique "effective", ces matériaux rencontrent une transition de phase pour une température critique $x = x_g = 1$. Pour $x < 1$, le système est hors d'équilibre et relaxe lentement vers un état d'équilibre. Le système est alors vitreux. Pour $x > 1$, le système est à l'équilibre et se comporte comme un liquide en loi de puissance ($\sigma \sim \dot{\epsilon}^{x-1}$) dans le régime non-linéaire, *i.e.* lorsque les déformations qu'on lui applique sont assez importantes pour permettre le passage des seuils de réarrangement. En revanche, si l'on sonde un tel matériau avec des déformations assez petites

(régime linéaire) sans réarrangements induits, les modules G' et G'' suivent un comportement anormal en loi de puissance (Eq 3.1) (le calcul de G' et G'' est détaillé en annexe C) :

$$G'(\omega) \sim \begin{cases} \omega^2, & \text{si } x > 3 \\ \omega^{x-1}, & \text{si } 1 < x < 3. \end{cases} \quad G''(\omega) \sim \begin{cases} \omega, & \text{si } x > 2 \\ \omega^{x-1}, & \text{si } 1 < x < 2. \end{cases} \quad (3.1)$$

Ce modèle prédit donc pour $1 < x < 2$, un comportement en loi de puissance pour G' et G'' avec un rapport des deux grandeurs constant, comme observé dans les expériences de rhéologie dynamique et calculé à partir de nos mesures de fluage. On pourrait donc identifier l'exposant α à $x-1$. On retrouve le comportement newtonien pour $\alpha = 1$, *i.e.* $x = 2$. Ce modèle présente l'avantage de tenir compte du désordre lié à la structure *via* la distribution d'énergie et de l'activité protéique par l'intermédiaire de la température effective. Cependant il fait un fort pré-supposé sur la queue de la distribution des puits d'énergie, qu'il suppose exponentielle. Par ailleurs, il est difficile de définir proprement un élément mésoscopique bien qu'on puisse imaginer ses dimensions caractéristiques et surtout d'identifier un processus physique microscopique à l'origine des réarrangements. Dans le cas de cellules dont la taille caractéristique est d'une vingtaine de microns, ces éléments doivent avoir des tailles inférieures au micron. D'autre part la limite inférieure de la taille des éléments mésoscopiques est donnée par les éléments les plus petits constituant le cytosquelette, à savoir plusieurs dizaines de nanomètres³³. Les mêmes lois de puissances pour G' et G'' auxquelles nous nous comparons, sont valables dans le domaine linéaire, *i.e.* aux petites déformations. Or, on imagine difficilement qu'avec des déformations pouvant atteindre 100%, on soit encore dans le domaine linéaire au sens où l'entend P. Sollich.

3.2.2 Systèmes à la transition sol-gel

Cette théorie s'applique pour des transitions "sol"-gel induites par des agents réticulants dans des réseaux de polymères. La phase "sol" correspond à un fluide viscoélastique, *i.e.* qui sous l'effet d'une contrainte finie non nulle atteint une déformation infinie et la phase gel correspond à un solide viscoélastique, *i.e.* qui sous l'effet d'une contrainte finie atteint une déformation finie. Le comportement de G' et G'' en ω^α est observé quand le système est maintenu au point de transition, *i.e.* pour des gels partiellement réticulés. Elle ne s'applique pas pour une transition vitreuse. À la différence du modèle précédent qui supposait que la structure évoluait au fur et à mesure des réarrangements, ici la structure est figée et on ne redistribue pas les liens entre filaments quand on la déforme. La transition sol-gel intervient quand une région de taille macroscopique vient à être réticulée. On parle alors de gel critique. Pour ces gels au point critique, la fonction de relaxation s'écrit [Winter, 1986] [Chambon, 1987] :

$$G(t) = S_{pc} t^{-\Delta_{pc}} \quad (3.2)$$

Le facteur S_{pc} est appelé "force du réseau polymérique" et Δ_{pc} varie entre 0 et 1 en fonction de la stœchiométrie de l'agent réticulant. Si $\Delta_{pc} \rightarrow 0$, on retrouve un comportement de type solide élastique parfait et si $\Delta_{pc} \rightarrow 1$, on retrouve un comportement de type liquide Newtonien. Connaissant l'expression de $G(t)$, on peut déterminer la distribution H des temps de relaxation λ [Winter, 1991] :

$$G(t) = \int_0^\infty H(\lambda) e^{-\frac{t}{\lambda}} d \ln \lambda \quad (3.3)$$

En inversant cette relation, on obtient :

$$H(\lambda) = H_0 \left(\frac{\lambda}{\lambda_0} \right)^{-\Delta_{pc}} \quad (3.4)$$

³³Les filaments d'actine, les plus petits, ont un diamètre de 7nm.

Comme dans le scénario précédent, la loi de puissance associée à la fonction de relaxation reflète une distribution de temps de relaxation elle même en loi de puissance. Par transformée de Fourier de l'équation 1.32, on détermine l'expression en fonction de ω des modules élastiques et de pertes [Warlus, 2003] :

$$\begin{cases} G'(\omega) = \frac{\pi S_{pc} \omega^{\Delta_{pc}}}{2\Gamma(\Delta_{pc}) \sin(\Delta_{pc} \frac{\pi}{2})}, \\ G''(\omega) = \frac{\pi S_{pc} \omega^{\Delta_{pc}}}{2\Gamma(\Delta_{pc}) \cos(\Delta_{pc} \frac{\pi}{2})}. \end{cases} \quad (3.5)$$

Γ est la fonction d'Euler défini à l'équation 1.7. Dans ce cas aussi le rapport $\frac{G''}{G'}$ ne dépend pas de la fréquence :

$$\frac{G''(\omega)}{G'(\omega)} = \tan(\Delta_{pc} \frac{\pi}{2}) \quad (3.6)$$

Il a par ailleurs été prouvé que l'exposant Δ_{pc} pouvait être relié à la dimension fractale des agrégats macroscopiques : [Chambon, 1986] [Doi, 1992] [Hess, 1988] :

$$\Delta_{pc} = \frac{d_f}{d_f + 2} \quad (3.7)$$

Cette théorie est valable pour des polymères réticulés. Si l'on devait voir la cellule comme un gel critique, cela signifierait que les liens entre les différents éléments qui compose la structure sollicitée sont permanents. Or, nous savons que les liaisons entre les filaments du cytosquelette et leurs protéines associés ont une distribution de temps de vie allant de quelques millisecondes à plusieurs minutes. Par conséquence, si la cellule est à la transition sol gel, alors les liens de la structure que l'on sollicite ont des temps de vie supérieurs à la minute (ordre de grandeur de la plage de temps sur laquelle on observe notre loi de puissance). On peut ainsi imaginer avec ce scénario que la cellule soit capable de réguler le temps de vie de ces liens, *i.e.* le nombre de liens, afin qu'elle puisse rapidement passer dans l'état sol au moment de la migration.

Remarque : de manière générale, le calcul fractionnaire présente un cadre mathématique approprié à la description rhéologique des matériaux dont la fonction de relaxation suit une loi de puissance. L'opérateur dérivée fractionnaire $D^{(\alpha)}$ est linéaire. La dérivée fractionnaire α^{ieme} d'une fonction f est définie par :

$$D^{(\alpha)}(f) \equiv \frac{1}{\Gamma(1-\alpha)} \frac{d}{dt} \int_0^t \frac{f(t')}{(t-t')^\alpha} dt' \quad (3.8)$$

En écrivant $G(t)$ comme :

$$G(t) = \frac{E}{\Gamma(1-\alpha)} \left(\frac{t}{\tau}\right)^{-\alpha}, \quad (3.9)$$

en injectant l'équation 1.39 dans l'équation 1.8 (on prend la convention $\epsilon(-\infty) = 0$), il est alors possible de réécrire cette dernière :

$$\sigma(t) = E\tau^\alpha D^{(\alpha)}(\epsilon(t)) \quad (3.10)$$

3.3 Universalité et comportement multiéchelle

On peut se demander si ce comportement en loi de puissance (infinité de temps de relaxation) observé pour des myoblastes se retrouve pour les autres types cellulaires. Autrement dit si la loi que nous mesurons est spécifique des cellules musculaires. Nous allons voir que pour tout les types

cellulaires que nous avons pu tester par l'intermédiaire d'expériences de fluage, nous observons un comportement de la déformation en loi de puissance. Par ailleurs, il est remarquable que ce comportement que nous observons à l'échelle de la cellule entière persiste à échelle locale, d'où l'idée de structure mécanique auto-similaire.

3.3.1 Dépendance en fonction du type cellulaire

Afin de tester si la loi de puissance n'est pas inhérente aux myoblastes, nous avons pratiqué les mêmes expériences de fluage sur différents types cellulaires. Comme pour les C 2.7, nous avons traité les lamelles par du glutaraldéhyde. Ainsi nous avons pu réaliser des expériences de fluage sur des fibroblastes primaires (prélevés sur des oreilles de souris) et de lignée (L 929), des macrophages primaires (prélevés sur des poumons de rat), des cellules épithéliales animales de lignée (A 549, HeLa) ainsi que sur des myotubes (myoblastes différenciés). Pour tous les types cellulaires que nous avons testés, nous avons observé une fonction de fluage en loi de puissance avec exposant voisin de 0.25 (Fig 3.2). La grande variabilité des préfacteurs, *i.e.* variation des

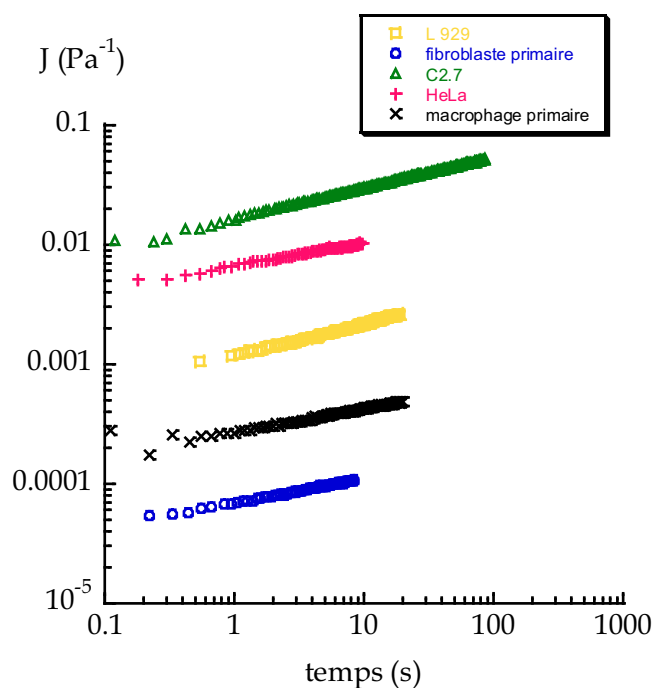


FIG. 3.2 – Pour l'ensemble des cellules que nous avons testées, la fonction de fluage $J(t)$ suit une loi de puissance.

valeurs de J pour un temps donné, reflète certainement une distribution log-normale du préfacteur comme observé dans le cas des C2.7. En toute rigueur, pour comparer les "rigidités" des différents types cellulaires, il faut comparer les valeurs médianes de A . Malheureusement le nombre d'expériences effectuées sur certains types cellulaires est bien souvent insuffisant pour déduire proprement la valeur médiane de A . Le tableau 1.1 récapitule nos résultats et ceux des autres groupes.

Par ailleurs, d'autres groupes ont pu mettre en évidence un tel comportement pour divers types cellulaires allant des cellules musculaires (HASM, $\alpha = 0.20$) [Fabry, 2003b], aux cellules épithéliales (A549 épithéliales alvéolaires $\alpha = 0.22$ et BEAS-2B épithéliale bronchique $\alpha = 0.20$) [Alcaraz, 2003] (cellules humaines épithéliales bronchiques $\alpha = 0.17$) [Fabry, 2003b], en passant

type cellulaire	$\langle \alpha \rangle$	$G'(1Hz)$ (Pa)	N	α_{dyn}	$G'_{dyn}(1Hz)$
C 2.7	0.24 ± 0.01	663^{+100}_{-90}	43	0.20	260 (Balland <i>et al</i>)
Macrophages	0.25 ± 0.04	2210^{+390}_{-330}	8	0.20	3060 (Fabry <i>et al</i>)
Fibroblastes	0.26 ± 0.02	740^{+380}_{-250}	13		
Myotubes	0.21 ± 0.05	870^{+420}_{-216}	4		
A 549	0.16		1	0.22	760 (Alcaraz <i>et al</i>)
HeLa	0.20		1		
L 929	0.27		1		
BEAS-2B				0.20	790 (Alcaraz <i>et al</i>)
HASM				0.20	830 (Maksym <i>et al</i>)
neutrophile				0.19	1170 (Fabry <i>et al</i>)

 TAB. 3.1 – Paramètres G'_0 et α pour différents types cellulaires.

par des cellules migrantes (J774A.1 macrophages de souris $\alpha = 0.20$, neutrophiles humains $\alpha = 0.19$) [Fabry, 2003b] et des cellules provenant du carcinome d'un embryon de souris (F9 $\alpha = 0.19$) [Fabry, 2003b]. Les exposants trouvés par les deux groupes sont tous proches de 0.20, alors que ceux que nous mesurons sont plutôt autour de 0.25. Leur exposant plus faible pourrait être révéler un comportement "actif" comme ce qui se produit quand une cellule s'étale entre nos lamelles. Le module élastique à $1Hz$ ne semble pas varier grandement d'un type cellulaire à l'autre excepté pour les macrophages qui sont plus "rigide" (confirmé par Fabry *et al* [Fabry, 2003b]). Il semble donc y avoir une universalité dans le comportement de la réponse mécanique des cellules eucaryotes. Aussi, il est remarquable que des cellules si différentes, comme les cellules musculaires, les fibroblastes, les cellules épithéliales ou encore les neutrophiles, répondent à une sollicitation mécanique avec des paramètres quasi-identiques.

3.3.2 Comportement multiéchelles

Un autre point important à noter est que les résultats consignés dans le tableau 3.1 sont le reflet de perturbations mécaniques menées sur des cellules à des échelles de longueurs caractéristiques très différentes. Cela va de la pointe d'AFM [Alcaraz, 2003] de quelques dizaines de nanomètre de diamètre à nos lamelles englobant toute la cellule, en passant par des billes de quelques microns de diamètre [Fabry, 2003b] [Balland, 2005]. Toutes ces mesures aboutissent au même comportement en loi de puissance et de surcroît avec des paramètres très comparables. Un tel accord entre nos mesures réalisées à échelle globale et les mesures réalisées à une échelle locale, suggère que le comportement mécanique d'une partie de la structure est identique au comportement mécanique de la structure entière. Ceci pourrait refléter un caractère autosimilaire des éléments composant la structure mécanique. Le cytosquelette n'est-il finalement pas fractal ? Un groupe a montré que la rhéologie d'arrangements hiérarchiques constitué d'amortisseurs et de ressorts [Schiessel, 1995a] aboutissait à des lois de puissances. Ces arrangements peuvent être de type fractal [Heymans, 1994], en échelle [Schiessel, 1993] ou bien en arbre [Schiessel, 1995b] [Schiessel, 1994].

Quatrième partie

Études préliminaires et Perspectives

Chapitre 1

Grandes déformations : Analyse des expériences à force constante

Lorsque la cellule se déforme de manière notable ($\varepsilon \approx 100\%$, cela a pour effet de créer une striction (Fig 1.1).

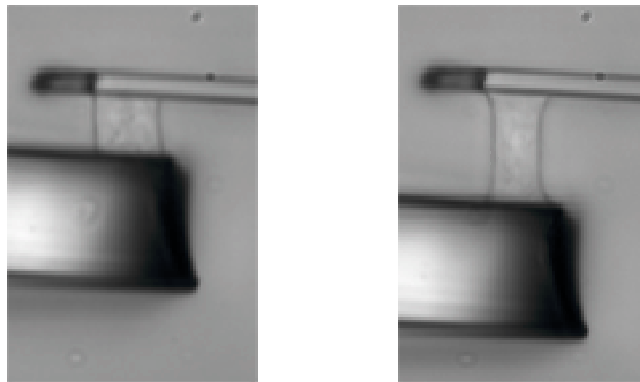


FIG. 1.1 – L'image de gauche est prise 5s après application de la contrainte. L'image de droite est prise 2min après. On remarque que la section moyenne de la cellule a notablement diminué.

Suite à l'apparition de cette striction (donc à une variation de la section), on ne peut plus prétendre travailler dans un régime de fluage ($\sigma = cte$). Si on fait l'hypothèse que le volume est constant [Thoumine, 1999]. On peut prendre en compte l'évolution de la surface effective sur laquelle s'applique la contrainte.

$$V(t) = S(t)L(t) = V(0) = S(0)L(0) \quad (1.1)$$

où V est le volume, S la section moyenne de la cellule et L la longueur de la cellule, *i.e.* la distance entre les deux lamelles. On obtient donc d'après l'équation 1.1 :

$$S(t) = \frac{S(0)L(0)}{L(t)} \quad (1.2)$$

En écrivant que :

$$\varepsilon(t) = \frac{L(t) - L(0)}{L(0)} \quad (1.3)$$

On peut exprimer S en fonction de ε :

$$S(t) = \frac{S(0)}{1 + \varepsilon(t)} \quad (1.4)$$

La contrainte moyenne σ est alors une fonction simple de la déformation ε :

$$\sigma(t) = \frac{kF}{S(t)} = \frac{kF}{S(0)}(\varepsilon(t) + 1) = \sigma(0)(\varepsilon(t) + 1) \quad (1.5)$$

Connaissant l'expression de $\sigma(t)$, il est possible de l'introduire dans l'équation rhéologique d'évolution de la déformation :

$$\varepsilon(t) = J(t)\sigma(0) + \int_0^t J(t-t')\dot{\sigma}(t')dt' \quad (1.6)$$

Ce qui donne :

$$\varepsilon(t) = J(t)\sigma(0) + \int_0^t J(t-t')\sigma(0)\dot{\varepsilon}(t')dt' \quad (1.7)$$

C'est à cette équation que nous allons à présent nous intéresser. Nous essayerons dans un premier temps de la résoudre afin de déterminer $\varepsilon(t)$ à partir de la forme attendue pour $J(t)$, *i.e.* $J(t) = At^\alpha$. Dans un second temps, nous la résoudrons en ayant cette fois J pour inconnue connaissant les valeurs mesurées des $\varepsilon(t_i)$.

1.1 Résolution analytique à l'aide de la fonction de Mittag-Leffler

On définit la transformée de Laplace d'une fonction f comme suit :

$$L[f(t)] = \int_0^\infty f(t') \exp(-st')dt' \quad (1.8)$$

En transformant l'équation 1.6 d'après la définition de la transformée de Laplace de l'équation 1.8, on obtient :

$$\widehat{\varepsilon}(s) = s\widehat{J}(s)\widehat{\sigma}(s) \quad (1.9)$$

De même en transformant l'équation 1.5 reliant déformation et contrainte, on obtient :

$$s\widehat{\sigma}(s) = \sigma(0)(s\widehat{\varepsilon}(s) + 1) \quad (1.10)$$

On injecte cette équation dans l'équation 1.9, on obtient $\widehat{\varepsilon}(s)$ en fonction de $\widehat{J}(s)$:

$$\widehat{\varepsilon}(s) = \frac{\sigma(0)\widehat{J}(s)}{(1 - s\sigma(0)\widehat{J}(s))} \quad (1.11)$$

Si l'on suppose à présent que la fonction de fluage est en loi de puissance comme nous l'avons mesuré dans le cadre strict du fluage, nous pouvons calculer la forme de $\varepsilon(t)$ par transformée de Laplace inverse en tenant compte de l'évolution de la contrainte due à l'apparition de la striction. Pour ce faire il nous faut connaître la transformée de Laplace d'une fonction puissance de la forme $J(t) = At^\alpha$:

$$\widehat{J}(s) = \frac{A\Gamma(1 + \alpha)}{s^{1+\alpha}} \quad (1.12)$$

En substituant l'équation 1.12 dans l'équation 1.11, on obtient :

$$\widehat{\varepsilon}(s) = \frac{\frac{A\sigma(0)\Gamma(1+\alpha)}{s^{1+\alpha}}}{1 - \frac{A\sigma(0)\Gamma(1+\alpha)}{s^\alpha}} \quad (1.13)$$

En écrivant que,

$$\frac{1}{1 - \frac{A\sigma(0)\Gamma(1+\alpha)}{s^\alpha}} = \sum_{n=0}^{\infty} \left(\frac{A\sigma(0)\Gamma(1+\alpha)}{s^\alpha} \right)^n \quad (1.14)$$

on développe $\widehat{\varepsilon}(s)$ en série :

$$\widehat{\varepsilon}(s) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{[A\sigma(0)\Gamma(1+\alpha)]^n}{s^{1+n\alpha}} \quad (1.15)$$

En effectuant la transformée de Laplace inverse, on se ramène à une expression de $\varepsilon(t)$:

$$\varepsilon(t) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{[A\sigma(0)\Gamma(1+\alpha)]^n t^{n\alpha}}{\Gamma(1+n\alpha)} \quad (1.16)$$

Pour faciliter cette écriture, on introduit la fonction de Mittag-Leffler définie par :

$$E_{\alpha,\beta}(z) = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{z^k}{\Gamma(\alpha k + \beta)} \quad (1.17)$$

Cette fonction est définie pour tout couple α et β strictement positifs. On note $E_{\alpha,1}(z) = E_\alpha(z)$. Il est alors possible de réécrire $\varepsilon(t)$ sous la forme d'une fonction de Mittag-Leffler :

$$\varepsilon(t) = E_\alpha[A\sigma(0)\Gamma(1+\alpha)t^\alpha] - 1 \quad (1.18)$$

On peut enfin ajuster cette fonction à nos données expérimentales toujours avec les seuls paramètres A et α (Fig 1.2)! On se rend alors compte que nos données s'ajustent, pour certaines

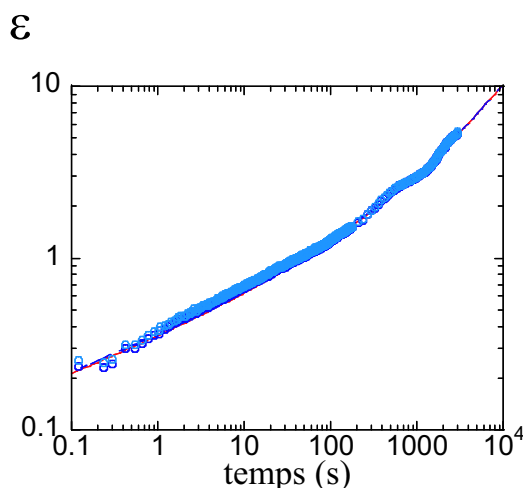


FIG. 1.2 – Ajustement des données expérimentales de ε par une fonction du type Mittag-Leffler. La fonction utilisée dans ce cas est tronquée au rang 10.

expériences, jusqu'à environ une heure après application de la contrainte. On arrive donc à rendre

compte de la réponse de la cellule jusqu'à sa rupture avec un modèle considérant que le volume est constant. Il nous reste à compléter l'analyse des 43 C2.7 pour finaliser cette étude. Mais avant cela, il nous faudra reprendre le traitement des équations en considérant une forme plus appropriée de la déformation, *i.e.* $\lambda = \ln(1 + \varepsilon)$. En effet, ε ne représente la déformation qu'aux faibles valeurs. Notons que le développement de $\varepsilon(t)$ (Eq 1.18) n'est valable que pour des cellules qui ne s'étalent pas sur la plage temporelle analysée.

1.2 Résolution numérique

Une autre manière de procéder est de déterminer la fonction J de manière numérique connaissant la donnée des $\varepsilon(t_i)$. On résout donc une équation de Volterra (Eq. 1.17),

$$J(t) = \frac{\varepsilon(t)}{\sigma(0)} - \int_0^t J(t-t')\dot{\varepsilon}(t')dt' \quad (1.19)$$

que l'on discrétise :

$$J_n = \frac{\varepsilon_n}{\sigma(0)} - \sum_{i=0}^n J_{n-i}\dot{\varepsilon}_i dt \quad (1.20)$$

avec $J(0) = 0$ et $\dot{\varepsilon}_i = \frac{\varepsilon_{i+1} + \varepsilon_{i-1}}{2dt}$

On obtient des $J(t_i)$ que l'on ajuste avec une fonction puissance (Fig 1.3). On s'aperçoit

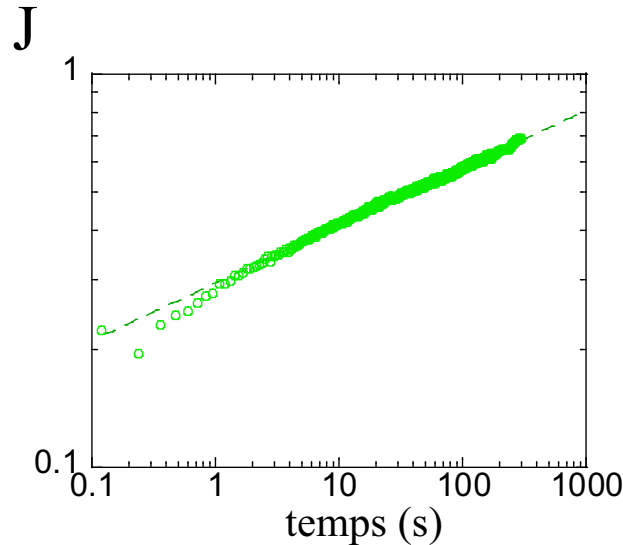


FIG. 1.3 – Détermination de J à partir de la résolution numérique de l'équation 4.7.

alors que J s'ajuste par une fonction de puissance jusqu'à 300s. Notons toutefois que le début est mal ajusté. Il est vrai que cette méthode est plus sensible aux erreurs initiales (à temps courts) sur les points expérimentaux que la précédente.

Nous espérons, notamment par la première méthode, montrer en ajustant les courbes expérimentales, avec les deux seuls paramètres A et α et sur de grandes plages de temps, que le comportement en loi de puissance est bien une signature robuste du comportement mécanique de la cellule.

Chapitre 2

Rôle des constituants du cytosquelette dans la réponse en fluage

Grossièrement, on peut voir la structure cellulaire comme un noyau, un cytosquelette et de la membrane. Par cytosquelette, nous désignons à la fois la portion corticale et la portion volumique des filaments polymériques ainsi que les protéines qui leurs sont associées. Lorsque nous soumettons une cellule à une contrainte *via* notre dispositif et qu'elle se déforme, nous pensons que nous sollicitons le cytosquelette. Nos arguments reposent sur l'observation que la cellule se déforme dans son ensemble, *i.e.* membrane et cytoplasme se déforment de manière concomittante. Le noyau semble quant à lui conserver sa taille. De plus la membrane phospholipidique [Vereb, 2003] et le cytosol sont essentiellement fluides et ne pourraient pas supporter les contraintes mécaniques. Afin d'identifier le rôle de certains éléments du cytosquelette (y compris les protéines associées) dans la réponse mécanique d'une cellule, nous avons pratiqué deux types d'expériences. i) Nous avons appliqué des contraintes *via* différentes protéines transmembranaires (cadhérine, fibronectine) afin de comparer les résultats obtenus avec le cas d'une adhésion non spécifique (glutaraldéhyde). ii) Nous avons travaillé avec des cellules dont l'un des sous-réseaux du cytosquelette avait été perturbé afin de tester son rôle dans la réponse de l'ensemble de l'édifice.

2.1 Sollicitation *via* des protéines d'adhésion spécifiques

2.1.1 *via* les cadhérines (C2.7)

Nous avons tapissé nos lamelles de cadhérines afin de mimer un contact cellulaire. L'idée sous-jacente est de voir si la réponse observée dans le cadre d'une expérience de fluage diffère de celle observée lorsque l'on accroche la cellule par toutes ses protéines transmembranaires (glutaraldéhyde). Les cadhérines utilisées ici sont une construction entre un fragment Fc γ IgG2b servant d'accroche sur la lamelle fusionné au domaine extracellulaire de la N-cadhérine de poulet [Lambert, 2000] (Annexe B). Ces cadhérines sont capables de former des jonctions adhérentes reliées aux filaments d'actines. Par ailleurs, il n'est pas clair que nous ne formions pas de desmosomes. Si tel était le cas on tirerait aussi sur les filaments intermédiaires enroulés autour de ces plaques de jonction [Yin, 2004]. Les cellules ayant servi à réaliser ce type d'expériences sont encore les C2.7. Il y a environ 10% des cellules qui s'étalent contre 50% avec le glutaraldéhyde.

Comme dans le cas du glutaraldéhyde, suite à l'application d'une contrainte, les cellules collées aux lamelles avec des N-cadhérines se déforment en suivant une loi de puissance au cours

du temps (Fig 2.1).

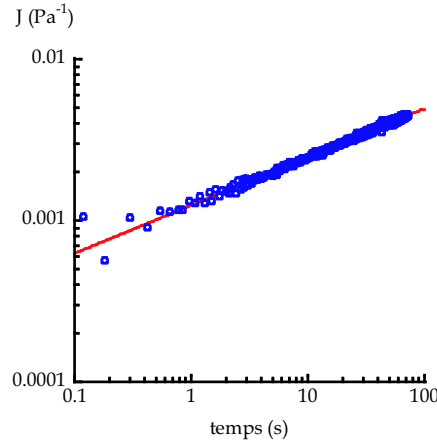


FIG. 2.1 – Ajustement de la fonction de fluage par une loi de puissance lorsque la cellule est attachée aux lamelles par des N-cadhérines.

On va maintenant pouvoir comparer les valeurs moyennes de paramètres ajustables. On trace la distribution de l'exposant (Fig 2.2 A) ainsi que la distribution du préfacteur (Fig 2.2 B).

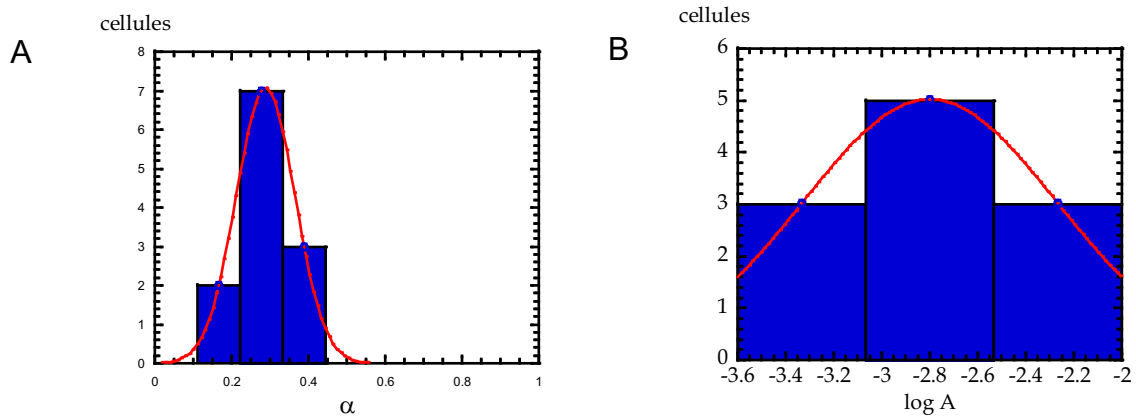


FIG. 2.2 – a) Distribution de l'exposant α selon les cellules. α varie autour de 0.29 avec une erreur standard de ± 0.02 pour $N = 12$. b) Distribution du log du préfacteur A selon les cellules. $\log A$ varie autour de -2.70 avec une erreur standard de ± 0.15 pour $N = 12$.

L'exposant que l'on trouve en s'attachant aux cadhérines $\alpha = 0.29 \pm 0.02$ est plus élevé que celui obtenu dans le cas d'une attache au glutaraldéhyde $\alpha = 0.24 \pm 0.01$. Rappelons qu'un exposant proche de 1 correspond à un matériau purement visqueux et qu'au contraire un exposant proche de 0 reflète plutôt un comportement purement élastique. Par conséquent, la cellule semble plus "fluide" lorsqu'on la tire *via* ses cadhérines. Ceci pourrait provenir du fait que le glutaraldéhyde forme des liaisons covalentes. Les protéines transmembranaires ainsi collées ne pourrait pas se désengager de leur interaction, alors que dans le cas d'une accroche cadhérine, les liaisons homophiles n'étant pas covalentes, on peut imaginer qu'une certaine proportion de ces liaisons puisse se désengager.

En ce qui concerne le préfacteur, si l'on s'attache aux cadhérines de la cellule, on observe que $\langle \log A \rangle = -2.70 \pm 0.15$, alors qu'on observait avec du glutaraldéhyde $\langle \log A \rangle = -2.62 \pm 0.06$.

Pour ces expériences, la contrainte moyenne est de $100Pa$. On est donc bien dans le domaine linéaire et nous pouvons donc calculer, à partir de A , le module élastique G' pour une fréquence de $1 Hz$ (Eq 2.9, Partie III). On trouve que $G'_{cad}(1Hz) = 850^{+250}_{-190} Pa$ lorsque la cellule est collée par l'intermédiaire des cadhérines contre $G'_{gluta}(1Hz) = 663^{+100}_{-90} Pa$ lorsqu'elle est collée avec du glutaraldéhyde. Les C2.7 collées avec des cadhérine semblent donc un peu plus "dures" ($G'(1Hz)$ plus élevé) que lorsqu'elles sont collées avec du glutaraldéhyde.

Nous sommes donc en présence de comportements *a priori* contradictoire : plus "fluide" ($\alpha_{cad} > \alpha_{gluta}$) et plus "dure" ($G'_{cad}(1Hz) > G'_{gluta}(1Hz)$). On peut néanmoins comprendre cette contradiction apparente en poussant le raisonnement concernant la dimension du préfacteur A (§3.1.2, Partie III). En effet, A s'exprime en $Pa^{-1}.s^{-\alpha}$. On a donc envie de le récrire en introduisant une contrainte caractéristique σ_0 et un temps caractéristique t_0 . Ce qui conduit à :

$$A = \frac{A_0}{\sigma_0.t_0^\alpha} \quad (2.1)$$

où A_0 est un paramètre sans dimension. Par ailleurs, A est relié à $G'(1Hz)$ par la relation :

$$G'(f_0 = 1Hz) = (2\pi)^\alpha \frac{\cos(\frac{\alpha\pi}{2})}{A\Gamma(1+\alpha)} f_0^\alpha \quad (2.2)$$

Comme $\frac{\cos(\frac{\alpha\pi}{2})}{\Gamma(1+\alpha)} \approx 1$, alors :

$$G'(1Hz) \simeq (2\pi)^\alpha \frac{1}{A} f_0^\alpha \quad (2.3)$$

En substituant dans l'équation 2.3 la forme supposée de A (Eq 2.1), nous obtenons :

$$G'(1Hz) \simeq (2\pi)^\alpha \frac{\sigma_0.t_0^\alpha}{A_0} f_0^\alpha \quad (2.4)$$

Si à présent, nous supposons que t_0 , σ_0 et A_0 sont des grandeurs caractéristiques communes à toutes les myoblastes³⁴, on peut exprimer le rapport $\frac{G'_{cad}(1Hz)}{G'_{gluta}(1Hz)}$ en fonction de t_0 et σ_0 :

$$\frac{G'_{cad}(1Hz)}{G'_{gluta}(1Hz)} = (2\pi)^{(\alpha_{cad}-\alpha_{gluta})} (t_0 f_0)^{(\alpha_{cad}-\alpha_{gluta})} \quad (2.5)$$

Étant donné que $(2\pi)^{(\alpha_{cad}-\alpha_{gluta})} \simeq 1$ (car $\alpha_{cad} - \alpha_{gluta} = 0.05$), alors l'équation 2.5 se réécrit :

$$\frac{G'_{cad}(1Hz)}{G'_{gluta}(1Hz)} = (t_0 f_0)^{(\alpha_{cad}-\alpha_{gluta})} \quad (2.6)$$

On voit bien avec cette dernière équation que si $\alpha_{cad} > \alpha_{gluta}$, alors $G'_{cad}(1Hz) > G'_{gluta}(1Hz)$.

2.1.2 via les fibronectines (macrophage)

Dans le cadre d'une étude menée en collaboration avec l'unité INSERM dirigée par le D. Isabey (Physiopathologie et Thérapeutiques Respiratoires, UMR 492), nous avons étudié la différence de comportement en fluage entre des macrophages³⁵ collés au glutaraldéhyde et des

³⁴Par ailleurs, les mesures dynamiques [Fabry, 2003b] semblent aussi faire apparaître une fréquence caractéristique.

³⁵Se reporter à l'Annexe A.

macrophages collés à de la fibronectine³⁶. Cette étude visait à identifier l'influence du substrat sur ces cellules. La fibronectine mime la matrice extracellulaire. La cellule s'attache à la fibronectine *via* ses intégrines qui sont ensuite reliées au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire d'un complexe protéique. Comme dans le cas des cadhérines nous ne sommes pas certains que seul le réseau d'actine soit sollicité. En effet, la fibronectine est aussi un site d'ancrage pour les hémidesmosomes qui sont reliés aux filaments intermédiaires [Koster, 2004]. Nous avons pu dégager que ces cellules répondaient aussi avec des lois de puissances (Fig 2.3) mais de manière différente selon la nature du substrat.

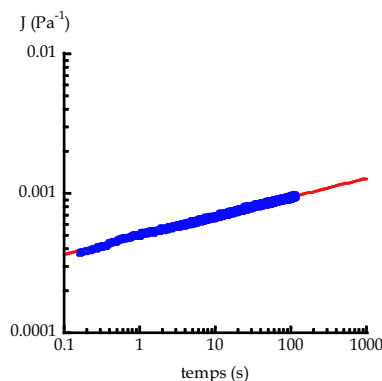


FIG. 2.3 – Fonction de fluage d'un macrophage collé à de la fibronectine.

Pour les macrophages collés à de la fibronectine, on obtient que : $\langle \alpha_{fibron} \rangle = 0.20 \pm 0.03$, $\langle \log A_{fibron} \rangle = -3.11 \pm 0.17$ et $G'_{fibron}(1Hz) = 1910^{+600}_{-460} Pa$ ($N = 7$). Pour les macrophages collés au glutaraldéhyde, on obtient que : $\langle \alpha_{gluta} \rangle = 0.25 \pm 0.04$, $\langle \log A_{gluta} \rangle = -3.14 \pm 0.12$ et $G'_{gluta}(1Hz) = 2210^{+390}_{-330} Pa$ ($N = 8$). On retrouve ici le comportement que l'on observe pour les C2.7 : une augmentation de α concomitante avec une augmentation de $G'(1Hz)$. Bien que les macrophages se distinguent des autres types cellulaires par leur préfacteur A nettement plus faible, il semble que leur rhéologie obéissent aux mêmes lois que les autres. Par contre, alors que les C2.7 sont plus "fluides" lorsqu'elles s'attachent à des cadhérines, les macrophages sont eux plus "solides" lorsqu'ils sont attachés à de la fibronectine ($\alpha_{gluta} > \alpha_{fibro}$ et $G'_{gluta}(1Hz) > G'_{fibro}(1Hz)$). L'argument que nous avançons dans le cadre de la comparaison cadhérine/glutaraldéhyde (dynamique des contacts qui se font et défont avec les cadhérines) ne peut alors pas être retenu dans ce cas. L'explication de ce phénomène doit alors trouver son origine en amont des contacts eux-mêmes.

2.2 Perturbation de l'un des sous-réseaux cytosquelettiques

2.2.1 Effet de drogues agissant sur le réseau d'actine : Cytochalasine-D et Jasplakinolide

Pour tester la contribution du réseau d'actine à la réponse mécanique en loi de puissance, nous avons effectué des expériences de fluages sur des cellules C2.7 traitées avec deux drogues aux effets antagonistes : d'une part, la cytochalasine-D pour dépolymériser le réseau d'actine et d'autre part, la jasplakinolide qui a tendance à "figer" le réseau d'actine..

³⁶Se reporter à l'Annexe B.

Cytochalasine-D

Nous avons exposé des C2.7 à la cytochalasine D avant de commencer les expériences de fluage. Les cellules sont collées par l'intermédiaire du glutaraldéhyde. La cytochalasine-D est un agent destructeur du réseau d'actine. Elle agit de plusieurs manières. Elle peut soit recouvrir l'extrémité (+) du filament d'actine, l'empêchant ainsi de polymériser, soit nucléer des petits filaments, soit encore de les raccourcir en interagissant latéralement [Maples, 1997] [Cooper, 1987]. Ces processus ont pour effet de morceler le réseau d'actine. La cyto D est ajoutée un quart d'heure avant le début de l'expérience à une concentration de $2\mu M$ [Gavard, 2003]. Malheureusement, la plupart des cellules soumises à ce traitement n'adhèrent pas sur les lamelles. Les rares qui s'y collent se détachent très rapidement suite à l'application de la contrainte (Fig 2.4). En effet, comme le réseau d'actine est morcelé, les protéines d'adhésion ne sont plus attachées au cytosquelette et la force qui leur est appliquée a tendance à les arracher de la membranes où elles sont enchassées. De plus, les molécules d'adhésion ne peuvent pas former de *cluster*. Car la cytochalasine D dépolymérise les filaments d'actines, il n'y a plus de "point fixe" permettant l'agglomération des protéines d'adhésion au sein d'un agrégat [Bongrand, 1999]. Donc les protéines d'adhésion restants attachées au cytosquelette ne sont pas capables individuellement de supporter les efforts.

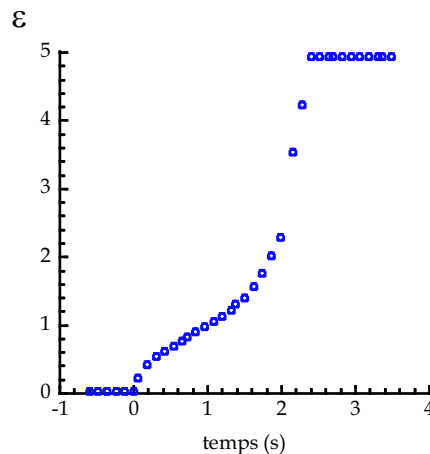


FIG. 2.4 – Déformation à contrainte constante d'une C2.7 sujète à de la cytochalasine D.

On peut remarquer qu'une seconde après le début de la sollicitation mécanique, la cellule commence à se détacher des lamelles. Néanmoins il est possible, à titre indicatif, d'ajuster le début de la réponse par une loi de puissance (Fig 2.5).

On obtient un exposant α voisin de 0.5 et $\log A$ voisin de -2.45 . Ces nombres n'ont pas valeur de résultats car ils ne représentent que deux expériences. Néanmoins nous pouvons examiner la tendance qu'ils indiquent. L'importante valeur de l'exposant indique que soumises à ce traitements les C2.7 sont plus fluides que dans le cas témoin. Ceci signifie qu'en perdant son réseau d'actine la cellule est devenue plus "fluide" et que donc le réseau d'actine est capable d'enmagasiner l'énergie de la contrainte. D'autre auteurs ont reporté un effet moindre, α voisin de 0.3, en ajoutant 10 minutes avant leur mesure de la cytochalasine D à $2\mu M$ [Fabry, 2003b].

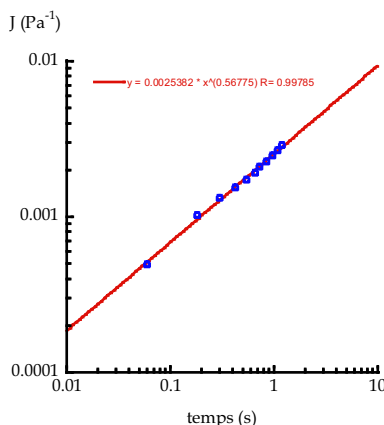


FIG. 2.5 – Fonction de fluage d’une C2.7 sujète à de la cytochalasine D.

Jasplakinolide

De manière analogue au traitement par la cytochalasine D, nous avons exposé des C2.7 à de la jasplakinolide avant de réaliser les expériences de fluage. Les cellules sont collées par l’intermédiaire du glutaraldéhyde. La jasplakinolide est connue pour induire la polymérisation et pour inhiber la dépolymérisation des filaments d’actine [Bubb, 1994]. Comme pour la cytochalasine D, on observe que la plupart des cellules n’adhèrent pas aux lamelles. Dans le cas de la cytochalasine D, il est facile d’imaginer que les protéines d’adhésion soient déconnectées du cytosquelette étant donné que le réseau d’actine médiant la quasi totalité des complexes d’adhérence est détérioré. Dans le cas de la jasplakinolide, on ne peut pas invoquer cet argument du fait que la tendance est à la polymérisation. Si par ailleurs la jasplakinolide stabilise les filaments, la configuration du réseau doit aboutir à un état d’équilibre avec de long filaments.

Nous avons ajouté la jasplakinolide à une concentration de $0.5\mu M$ 15 minutes avant application de la contrainte [Gavard, 2003]. Nous avons observé que, tout comme les cellules traitées à la cytochalasine D, les cellules traitées à la jasplakinolide se détachaient rapidement des lamelles (Fig 2.6). En effet, en "figeant" les filaments d’actines, la jasplakinolide empêche les molécules d’adhésion qui leur sont attachées d’explorer l’espace intermembranaire. L’immobilisation de ces molécules d’adhésion rend probablement impossible la formation de *cluster* assurant une adhésion robuste [Bongrand, 1999].

Comme on observe que les cellules se décrochent de la même manière en faisant agir soit de la cytochalasine D, soit de la jasplakinolide, il semble que ce soit surtout la formation de *cluster* qui assure la résistance des contacts.

Toutefois, on peut constater que la cellule se détache plus tard comparativement au cas de la cytochalasine D. La rupture de courbure nette à $19s$ (Fig 2.6) indique un détachement soudain. Bien que les ajustements du début de la réponse par des lois de puissance soient nettement moins satisfaisants³⁷ (Fig 2.7), on peut néanmoins tenter de dégager des tendances. Pour quatre cellules on trouve $\langle \alpha \rangle = 0.44 \pm 0.08$ et $\langle \log A \rangle = -2.65 \pm 0.23$. On trouve donc que $G'(1Hz) = 860_{-260}^{+390} Pa$. Cette valeur est cohérente avec l’idée que l’on se fait de la rigidité d’un réseau que l’on polymérise excessivement : son module élastique augmente. On retrouve encore le fait que si α augmente alors $G'(1Hz)$ augmente aussi.

³⁷ Il se pourrait que l’actine et ses protéines associées soient responsable pour une grande part de la distribution des temps de relaxation.

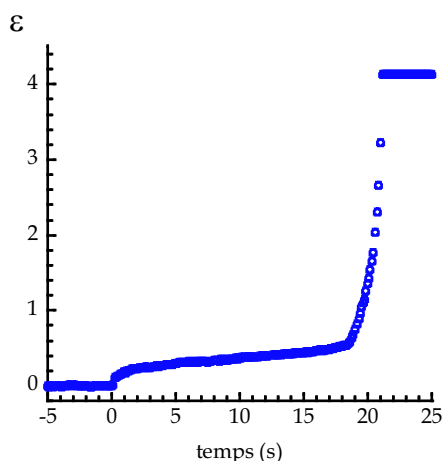


FIG. 2.6 – Déformation sous contrainte constante d'une C2.7 collée avec du glutaraldéhyde ayant subi un traitement à la jasplakinolide.

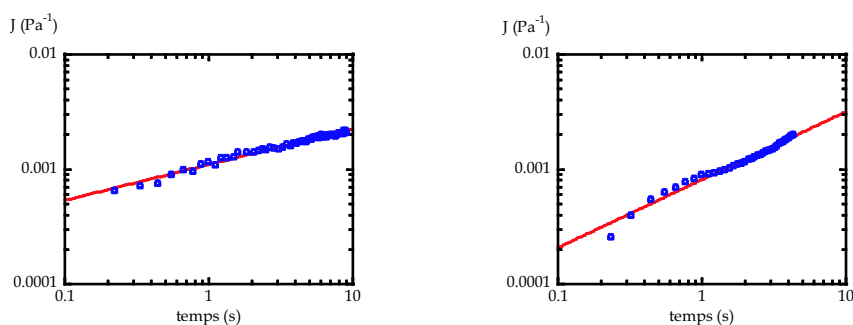


FIG. 2.7 – Fonctions de fluage d'une C2.7 collée au glutaraldéhyde et traitée à la jasplakinolide. Sur la courbe de gauche, la fonction de fluage suit fidèlement la loi de puissance. Alors que sur la courbe de droite, on note des écarts non négligeables à cette loi.

Au final, les expériences réussies après traitement sont peu nombreuses (2 pour la cytochalasine D et 4 pour la jasplakinolide) et on peut émettre des doutes sur la validité des valeurs trouvées. Il n'est pas non plus clair que dans le cas de la jasplakinolide, la fonction de fluage soit en loi de puissance. Les tests à la jasplakinolide mériteraient d'être complétés, notamment par une série d'expériences de fluage en compression. En effet, comme les cellules traitées ainsi ne s'étalent pas, on risque moins de voir varier la surface de contact et surtout on ne craint pas que les cellules se détachent des lamelles. On pourrait également tenter de faire varier la valeur de la concentration en Jasplakinolide.

2.2.2 Les filaments intermédiaires maintiennent l'intégrité mécanique à grande déformation

Les filaments intermédiaires sont réputés pour assurer la résistance mécanique des cellules eukaryotes [Fuchs, 1998] [Janmey, 1991b]. En effet, d'une part des images de microscopie électronique ont pu révéler des fractures dans les tissus musculaires de souris transgéniques dépourvues

de filaments intermédiaires (desmine) [Milner, 2004]. D'autre part des mesures à échelle locale par l'intermédiaire de billes magnétiques attachées aux intégrines ont pu mettre en évidence que les filaments intermédiaires servaient à médier le signal mécanique à travers la cellule [Wang, 2000]. Nous avons voulu comparer la réponse en fluage d'une cellule sauvage à celle d'une cellule n'exprimant pas un type de filaments intermédiaires, la vimentine. Grâce à l'équipe du Pr. Paulin (laboratoire de Biologie Moléculaire de la Différenciation, Paris 7), nous avons pu travailler avec des fibroblastes prélevés sur des souris sauvages (V +/+) et des souris *knock-out* (V -/-) n'exprimant pas la vimentine. Ces fibroblastes ont été cultivés³⁸ par Z. Xue.

Comparaison entre fibroblastes sauvages et fibroblastes *knock-out*

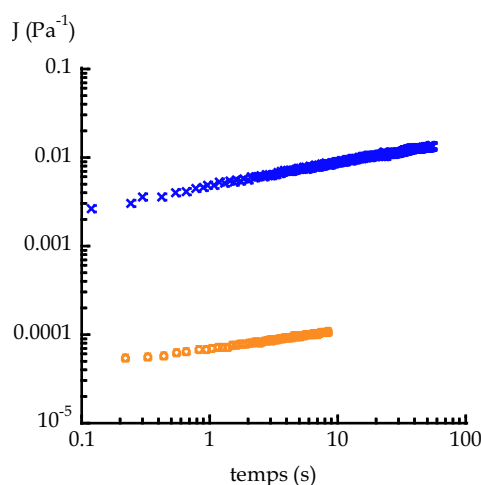


FIG. 2.8 – Fonction de fluage d'un fibroblaste V+/+ (o) et d'un fibroblaste V-/- (x) collées au glutaraldéhyde.

La vimentine est la protéine de la famille des filaments intermédiaires la plus représentée au sein des cellules d'origine mésenchymale³⁹ comme les fibroblastes [Franke, 1982] [Franke, 1987]. Bien que les souris dépourvues de vimentine semblent se développer et se reproduire normalement [Colucci-Guyon, 1994], il apparaît que le module d'Young apparent des cellules V -/- est réduit de 40% (mesures de magnétocytométrie) réduisant ainsi la stabilité mécanique de ces cellules [Eckes, 1998]. Suivant un protocole analogue aux expériences de fluage menées sur les C 2.7 collées au glutaraldéhyde, nous avons voulu comparer la différence de réponse à un échelon de contrainte entre des fibroblastes avec vimentine (V +/+) et des fibroblastes n'exprimant pas la vimentine (V -/-).

Si l'on trace les fonctions de fluage, obtenue pour des fibroblastes sauvages aussi bien que des fibroblastes V-/-, on s'aperçoit qu'elles suivent toutes une loi de puissance (Fig 2.8).

Avant de s'y intéresser, penchons nous sur le comportement de l'exposant. Pour $N_{V+/+} = 13$ et $N_{V-/-} = 19$, on trouve que pour les fibroblastes sauvages $\langle \alpha_{V+/+} \rangle = 0.26 \pm 0.02$ et que pour les fibroblastes n'exprimant pas la vimentine $\langle \alpha_{V-/-} \rangle = 0.25 \pm 0.01$ (Fig 2.9). On n'observe donc pas de différence significative entre les deux exposants. Cela signifie que la part de la vimentine dans la manière dont se déforme les fibroblastes primaires est négligeable.

³⁸Les détails de leur préparation sont décrits dans l'Annexe A.

³⁹forme immature du tissu conjonctif

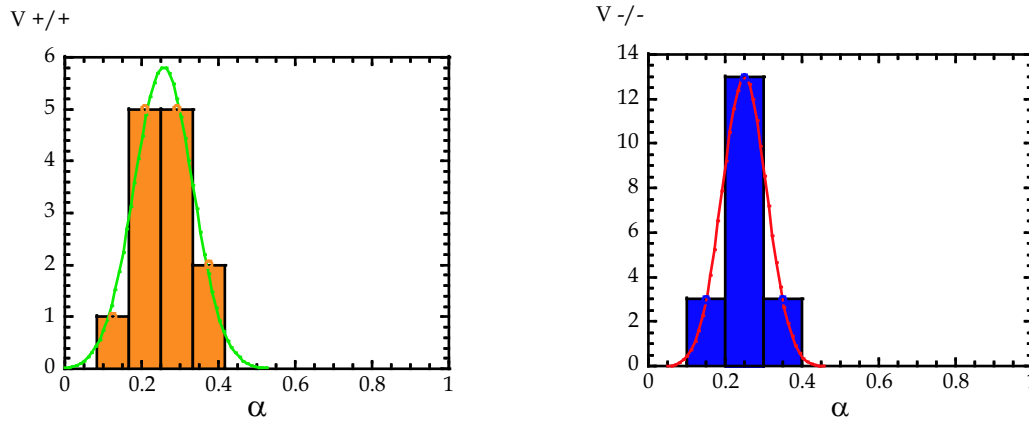


FIG. 2.9 – Distribution de l'exposant de la fonction de relaxation pour des fibroblastes sauvages (en vert, à gauche) et des fibroblastes sans vimentine (en bleu, à droite). $\langle \alpha_{V+/+} \rangle = 0.26 \pm 0.02$ et $\langle \alpha_{V-/-} \rangle = 0.25 \pm 0.01$. Les distributions sont ajustées par des gaussiennes.

En ce qui concerne le préfacteur, on trouve pour les fibroblastes sauvages $\langle \log A_{V+/+} \rangle = -2.66 \pm 0.22$ et $G'_{V+/+}(1Hz) = 745^{+380}_{-250} Pa$ et pour les fibroblastes sans vimentine $\langle \log A_{V-/-} \rangle = -2.54 \pm 0.10$ et $G'_{V-/-}(1Hz) = 560^{+95}_{-80} Pa$ (Fig 2.10). Bien que les distributions des préfacteurs se recouvrent partiellement, les valeurs moyennes sont relativement différentes. De plus on retrouve le fait que les fibroblastes primaires sauvages sont environ 30% plus rigides que les fibroblastes n'exprimant pas la vimentine.

Par conséquent, l'absence de vimentine n'altère pas la fluidité des fibroblastes mais leur rigidité. Ce qui signifie qu'à même α et pour un préfacteur A plus grand, les fibroblastes n'ayant pas de vimentine vont se déformer plus vite. On retrouve qualitativement ce comportement au temps long. En effet, étant donné que les fibroblastes se déforment plus vite, ils atteignent plus rapidement une déformation seuil entraînant la rupture de la cellule, *i.e.* sa brisure en deux morceaux collés à chacune des lamelles (Fig 2.11). Ceci n'est pas due à une sollicitation par une contrainte plus grande dans un cas que dans l'autre. En effet, la contrainte moyenne utilisée pour les fibroblastes sauvages est de $60 Pa$ et elle est de $67 Pa$ dans le cas des fibroblastes dépourvus de vimentine. La déformation seuil moyenne atteinte par ces fibroblastes avant rupture est de 380%, *i.e.* quand la cellule atteint à peu près cinq fois sa taille initiale.

type	glutaraldéhyde	cadhérine	fibronectine	$\langle \alpha \rangle$	$G'(1Hz)$	N
C 2.7	•	-	-	0.24 ± 0.01	663^{+100}_{-90}	43
C 2.7 (Japlakinolide)	•	-	-	0.44 ± 0.08	860^{+390}_{-260}	4
C 2.7	-	•	-	0.29 ± 0.02	850^{+250}_{-190}	12
Fibroblaste V+/+	•	-	-	0.26 ± 0.02	745^{+380}_{-250}	13
Fibroblaste V-/-	•	-	-	0.25 ± 0.01	560^{+95}_{-80}	19
Macrophages	•	-	-	0.25 ± 0.04	2210^{+390}_{-330}	8
Macrophages	-	-	•	0.20 ± 0.03	1910^{+600}_{-460}	7

TAB. 2.1 – Tableaux récapitulatif des résultats de fluage obtenus avec divers types cellulaires et différentes conditions d'adhérence aux lamelles de verre.

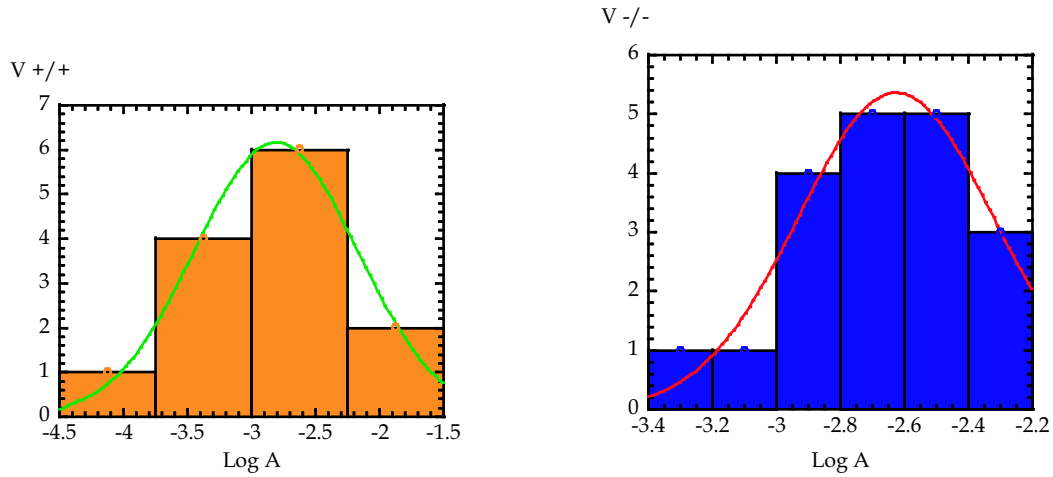


FIG. 2.10 – Distribution du préfacteur de la fonction de relaxation pour des fibroblastes sauvages (en vert, à gauche) et des fibroblastes sans vimentine (en bleu, à droite). $\langle \log A_{V+/+} \rangle = -2.66 \pm 0.22$ et $\langle \log A_{V-/-} \rangle = -2.54 \pm 0.10$. Les distributions sont ajustées par des gaussiennes.

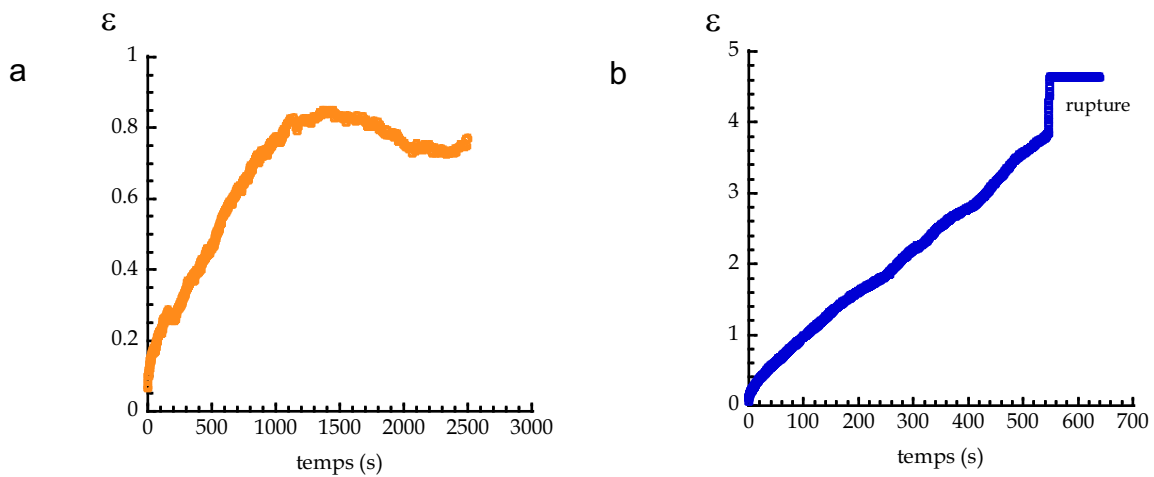


FIG. 2.11 – Déformation sous contrainte constante d'un fibroblaste sauvage (en orange, a) et d'un fibroblaste n'exprimant pas la vimentine (en bleu, b).

Chapitre 3

Adaptation de la force développée lors de l'étalement

Lorsqu'une cellule s'étale entre nos deux lamelles de verres, on observe que l'aire des deux faces en contact des lamelles augmente de manière assez symétrique, *i.e.* qu'elle croît avec la même cinétique des deux cotés. Au fur et à mesure que croissent les surfaces de contacts, on observe que la taille cellulaire perpendiculaire au plan des plaques diminue. La cellule défléchit donc la lamelle souple quand elle s'étale, ce qui signifie qu'elle exerce une force sur cette même lamelle. Les expériences que nous décrivons ici visent à mesurer les forces que peut développer de cette manière une cellule.

3.1 Protocole

Ces expériences consistent à disposer une cellule entre deux lamelles recouvertes de glutaraldéhyde et de mesurer la déflexion de la lamelle produite par l'étalement de la cellule. Les étapes de positionnement des lamelles et de collage sont identiques à celles employées pour les expériences de fluage. Après avoir mis les lamelles au contact de la cellule, on attend une trentaine de secondes que la cellule adhère aux lamelles puis on remonte la cellule accrochée aux deux lamelles. Ensuite, on dispose la pointe de la lamelle souple au centre du capteur afin de suivre la déflexion de la lamelle grâce au signal généré par le mouvement de l'image de la pointe sur le capteur. Dans ce cas la rétroaction est débrayée et la pointe de la lamelle souple est libre de se déplacer. On enregistre ensuite ce signal au cours du temps au fur et à mesure que la cellule s'étale (Fig 2.12).

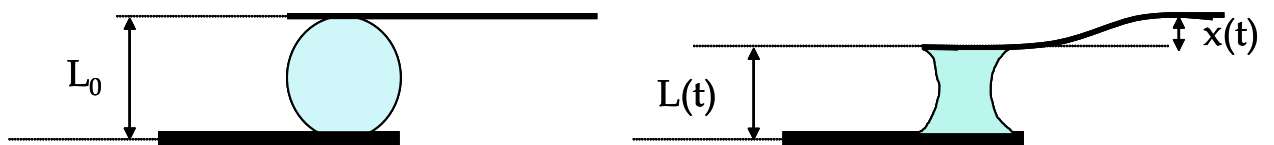


FIG. 3.1 – Illustration de la force développée lors de l'étalement d'une cellule.

3.2 Résultats

On trace l'évolution de la déflexion, *i.e.* de la force développée par un myoblaste, au cours du temps lorsque ce dernier s'étale entre nos deux lamelles de verres recouvertes de glutaraldéhyde ainsi que l'évolution de la surface de contact au niveau des lamelles (Fig 2.13).

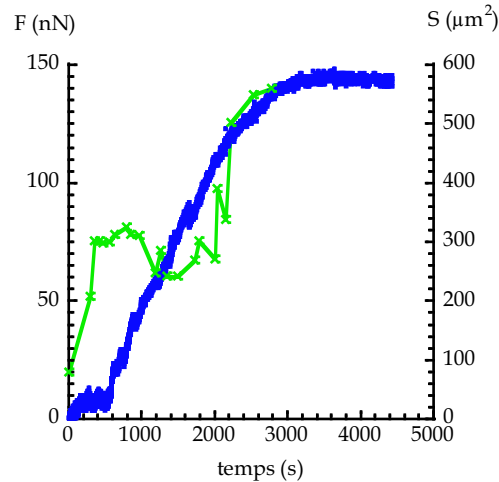


FIG. 3.2 – Évolution de la force développée (o bleus) par la cellule lorsqu'elle s'étale ainsi que de l'aire de contact cellule-lamelles (x vertes).

On s'aperçoit que la force développée croît de manière monotone jusqu'à atteindre une valeur limite F_{max} au bout d'un certain temps t_{max} défini comme le début du plateau. Les forces développées que nous observons sont bien plus importantes que celle rapportées pour des fibroblastes enchassés dans une matrice GAG (1nN) [Freyman, 2001].

Nous avons réitéré ce type d'expériences en faisant varier la raideur des lamelles souples afin de voir si la force maximale développée par le myoblaste lors de son étalement dépendait de la raideur des lamelles. On trace alors la courbe de cette force maximale en fonction de la raideur de la lamelle et on s'aperçoit que les points s'alignent selon une droite (Fig 2.14).

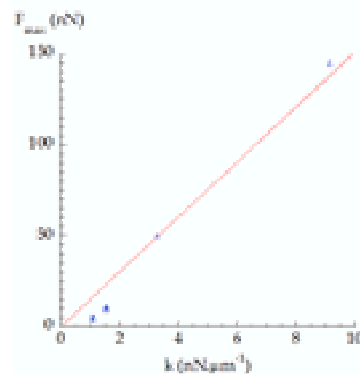


FIG. 3.3 – Force maximale F_{max} développée par la cellule à la fin de son étalement en fonction de la raideur k de la lamelle souple pour des myoblastes ($N = 6$). On ajuste la courbe par une loi de proportionnalité.

La compréhension de cette courbe est simple. En effet, on observe que $L(t) \rightarrow L_{min}$ pour

$t \rightarrow \infty$ avec $L_{min} \approx 5\mu m$ pour les myoblastes. Alors, étant donné que $F(t) = k.x(t)$ et que $x(t) = L_0 - L(t)$ (Fig 2.4) avec $L_0 \approx 15\mu m$, on s'attend à ce que $x(t) \rightarrow x_{max}$ donc à ce que $F(t) \rightarrow k.x_{max}$ avec x_{max} indépendant de la cellule testée. Cela revient à dire que la cellule s'étale jusqu'à L_{min} et ceci quelque soit la force qu'elle doit fournir⁴⁰.

De même, on observe que plus la lamelle est rigide, plus la cellule met de temps à atteindre sa déformation finale (Fig 2.15), *i.e.* pour achever de se contracter en s'étalant.

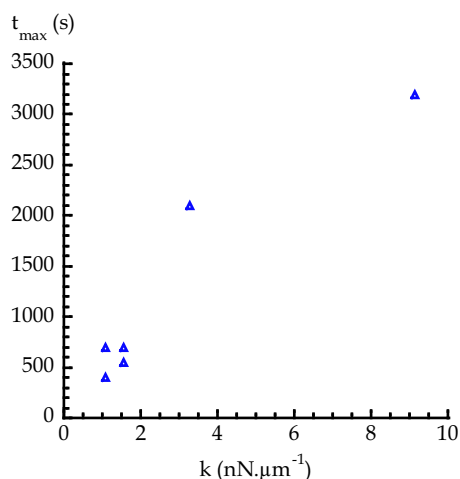


FIG. 3.4 – Temps que met la cellule à s'étaler en fonction de la raideur de la lamelle souple.

Il faudrait, maintenant, faire un enregistrement vidéo en continu afin de suivre la variation d'aire de contact et de la confronter à celle de la force. En effet, sur les expériences préliminaires, avec un faible nombre de relevés des surfaces de contact, il semble que l'augmentation de la force précède l'augmentation de surface, comme si la cellule devait dans un premier temps exercer des efforts perpendiculairement au plan des deux plaques avant de pouvoir développer des efforts tangentiels.

⁴⁰dans la limite de la gamme de raideur testée

Conclusion générale

Comment mesurer la réponse mécanique d'une cellule vivante ? Nous avons répondu à cette question en mettant au point un véritable rhéomètre à cellule unique s'inspirant du dispositif d'étirement uniaxial d'O. Thoumine et d'A. Ott. Une conception originale des microplaques a rendu possible la mise en place d'un système d'asservissement permettant de contrôler contrainte ou déformation. Combinée à une thermalisation de l'ensemble du dispositif, la nouvelle géométrie des microplaques a, de plus, le grand avantage d'éliminer les dérives.

Ainsi avons-nous pu montrer que, pour tous les types cellulaires sollicités, la fonction de fluage suivait une loi de puissance fonction du temps ($J(t) = At^\alpha$). L'exposant est distribué normalement autour de 0,25, alors que le préfacteur est distribué de manière log-normale. Ayant déterminé le régime linéaire, nous avons pu comparer nos résultats de fluage aux mesures de rhéologie dynamique (magnétocytométrie, AFM). Ainsi, pour la première fois à l'échelle de la cellule entière, avons-nous pu confirmer, qualitativement et quantitativement, les résultats obtenus par des techniques où la sollicitation est locale et oscillante. Par ailleurs, des expériences préliminaires ont montré que l'application de contraintes via différentes protéines transmembranaires (intégrines, cadhérines) influençait les paramètres (A et α) de la fonction de fluage.

En vue d'identifier la contribution des éléments du cytosquelette à la réponse mécanique d'une cellule, nous avons réalisé des mesures sur des fibroblastes n'exprimant pas la vimentine et sur des fibroblastes sauvages. Il a été mis en évidence que la vimentine n'avait pas d'incidence sur la forme de la fonction de fluage mais qu'elle était nécessaire au maintien de l'intégrité mécanique à grande déformation.

Enfin, le dispositif expérimental nous a permis de mesurer la force exercée par une cellule lorsqu'elle s'étale entre les deux lamelles de verres. Les premiers résultats semblent indiquer que les myoblastes sont capables d'adapter leur force à la raideur des lamelles.

Outre les perspectives proches développées dans la dernière partie, il devient nécessaire, afin de progresser dans l'interprétation des résultats obtenus, d'imager le comportement des différents éléments du cytosquelette ainsi que des complexes d'adhésion lorsque la cellule est sous contrainte.

- Pour imager, en volume, la réorganisation éventuelle des différents éléments du cytosquelette, on pourra effectuer des mesures mécaniques couplées à de la microscopie de fluorescence. Cependant, la simple microscopie de fluorescence sera insuffisante pour résoudre les structures d'intérêt. Il sera certainement nécessaire d'effectuer de la reconstruction 3D à partir d'images prises dans différents plans de mise au point (coupes pour déconvolution), et même d'adapter notre montage sur un microscope confocale ou à 2-photons.
- Afin d'étudier la distribution et la dynamique des complexes d'adhésions lorsque la cellule est soumise à une contrainte, on aimerait doter le rhéomètre d'un dispositif à ondes évanescentes. Ce montage permettrait de comprendre l'influence des différentes protéines d'adhérence sur les mesures rhéologiques. Il permettra certainement de savoir si la distribution log-normale du préfacteur est le reflet de la distribution spatiale des contacts cellule-substrat.

Annexe A

Culture et préparation des cellules

Nous présentons ici les détails concernant la culture et la préparation en vue de réaliser des expériences de fluage. La culture cellulaire nous sert à avoir en permanence un stock de cellules disponibles. Elle a été effectuée au laboratoire dans une salle destinée à cet effet. La préparation des cellules désigne la manière dont ces cellules sont détachées de leur substrat de culture en vue d'être utilisées pour les expériences.

A.1 Cultures cellulaires

La culture cellulaire comme celle des plantes consiste grossièrement à déposer des cellules sur un substrat et dans un milieu adéquats. Les cellules ainsi déposées se divisent et leur nombre se multiplie. On dit alors qu'elles poussent. La culture cellulaire a à peine cent ans. La première culture *in vitro* fut réalisée en 1903 avec des globules rouges de triton par le français Justin Jolly. Il existe deux types de cultures : les cultures primaires et les lignées cellulaires. Une culture primaire consiste à prélever directement sur un animal vivant des cellules au sein d'un tissu, puis de les mettre ensuite en culture. Ces cellules meurent après un nombre fini de divisions. Les lignées cellulaires sont elles le fruit d'années d'efforts consistant à immortaliser les cellules par modification génétique. Ces lignées, généralement, présentent l'avantage d'être stables, ce qui signifie que leur propriétés ne s'altèrent pas au cours des divisions successives. Les premières cultures stables ont été réalisées à partir 1912 par Alexis Carrel et concernaient des fibroblastes de cœur de poulet. Il montre ainsi qu'à condition d'être nourries régulièrement dans des conditions aseptiques, les cellules poussent en culture pendant plusieurs mois [Alberts, 1994].

Pour notre part, nous avons essentiellement travaillé avec trois types cellulaires bien distincts. Les C2.7 sont une lignée, les fibroblastes primaires et les macrophages sont quant à eux issus de cultures primaires. Nous allons maintenant détailler la manière dont ces types cellulaires sont cultivés.

A.1.1 Myoblastes C2.7

La lignée des C2.7 est un sous-clone de la lignée des C2 [Catala, 1995] dérivant du muscle squelettique issu de souris adulte C3H [Reznikoff, 1973]. Les C2.7 sont des myoblastes, ç.à.d des précurseurs des cellules du muscle squelettique. Ces cellules sont générées, lors du développement de l'embryon, à partir des somites formés dans le mésoderme [Alberts, 1994]. Elles migrent ensuite dans le mésenchyme, ç.à.d le tissu conjonctif embryonnaire. Après une période de prolifération, les myoblastes fusionnent pour donner naissance à des myotubes. Ces myotubes,

cellules polynucléées, sont les cellules du muscle squelettique chez l'adulte. Il subsiste néanmoins quelques cellules satellites chez l'adulte servant à d'éventuelles réparations du muscle.

Les *C2.7* sont cultivées dans des boîtes de cultures de 25cm^2 (Techno Plastic Products, Suisse) placées dans un incubateur dont la température est maintenue à 37°C avec une atmosphère régulée à un taux de CO_2 de 5%. Les cellules baignent dans 5mL de milieu complet constitué de 77% de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), de 20% de sérum de veau fœtal, de 1% de pénicilline, de 1% de glutamine et de 1% de streptomycine. Les cellules sont maintenues en culture jusqu'à ce que le tapis atteigne 70% de confluence. Les cellules sont alors décollées et remises en culture. On réensemence les boîtes avec $100\mu\text{L}$ récupéré à partir du culot issu de la centrifugation (§ 3.2.1). Les passages sont effectués en moyenne tous les trois jours, excepté après la décongélation d'une souche où la reprise de la culture est plus lente.

La souche des *C2.7* nous a été fournie par l'équipe de Denise Paulin (Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Différenciation, EA-300 Paris 7). Pour éviter que les cellules aient trop de passages, après une vingtaine de passages, on décongèle des cellules qui avaient été congelées lors de leur arrivée au laboratoire. Pour les décongeler, il suffit juste de verser le mL venant d'être décongelé dans une boîte de culture avec 5mL de milieu complet.

A.1.2 Fibroblastes Primaires

Les fibroblastes sont des cellules des tissus conjonctifs. Ces cellules sécrètent les macrolécules de la matrice extracellulaire, notamment le collagène. L'orientation de leur cytosquelette, oriente la matrice extracellulaire dans laquelle ils vivent [Alberts, 1994]. Les fibroblastes sont aussi connus pour leurs grandes capacités à migrer. Par exemple les fibroblastes des tissus conjonctifs de la peau migrent vers les régions endommagées par une blessure afin de réparer le tissu.

Les fibroblastes primaires, comme leur nom l'indique, sont issus de cultures primaires. Ce sont en réalité des cultures secondaires, c.à.d qu'après leur prélèvement on les a cultivées dans des boîtes de cultures. Ces cellules sont prélevées sur des oreilles de souris. On notera toutefois qu'il n'est pas certain que les fibroblastes provenant d'une même région soient équivalents [Alberts, 1994]. Ils possèdent en effet une grande aptitude à se différencier. Nous avons travaillé avec deux types de fibroblastes primaires : des fibroblastes primaires vimentine -/- et des fibroblastes primaires vimentine +/+, la vimentine étant un type de filaments intermédiaires. Les -/- n'expriment pas la protéine tandis que les +/+ l'expriment. Il y a cependant une différence dans la manière dont ces cellules sont cultivées. Les +/+ sont de pures cultures secondaires, alors que les -/- sont issus de culture primaire au sein de laquelle a été cloné un îlot sélectionné. Tout ce travail a été réalisé par les biologistes du Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Différenciation, EA-300 Paris 7 [Colucci-Guyon, 1994].

A.1.3 Macrophages

Les macrophages sont des leucocytes spécialisés dans l'ingestion de débris cellulaires et de bactéries par phagocytose. Ces cellules circulent dans les voies sanguines avant de migrer hors des capillaires dans les tissus conjonctifs vers les lieux d'infection. Contrairement aux neutrophiles ces cellules peuvent survivre plusieurs mois, voir plusieurs années [Alberts, 1994].

Les macrophages avec lesquels nous travaillons sont prélevés sur un rat le matin de l'expérience. En ce sens ce sont de véritables cultures primaires. Les rats utilisés pour les prélèvements sont des Sprague-Dawleys mâles immunisés contre les maladies. Lorsque le rat atteint environ 350g , on opère sur ce dernier un lavage de poumon afin de prélever les macrophages qui se trouvent sur les parois internes des poumons. Tout d'abord on rince les poumons avec un mélange pré-

paré à partir de 100mL d'eau à 18MΩ, de poudre de Hanks, de bicarbonate de sodium et de 10mg d'EGTA. Le rinçage s'effectue avec 10mL de ce mélange. On pratique ensuite deux lavages utilisant chacun 12mL du mélange précédent. On récupère ainsi 24mL du mélange contenant à présent les macrophages ainsi que quelques globules rouges. Ces 24mL sont ensuite centrifugés, ce qui permet de rincer le milieu. Puis on reprend le culot dans 3mL de RPMI 16/40 contenant 0.1% de BSA. Enfin, on prélève 63μL du dernier mélange, pour les diluer dans 5mL de DMEM. On prépare ainsi des tubes de 5mL directement utilisable pour nos manipulations.

Les prélèvements des macrophages et la préparation des échantillons ont été réalisés au laboratoire de Physiopathologie de la nutrition (Paris 7) par Sophie Féréol, étudiante en thèse à l'INSERM de Créteil (UMR 492, Physiopathologie et Thérapeutiques Respiratoires).

A.2 Décollement des cultures et préparation

Excepté pour les macrophages, les cultures de cellules décrites ci-dessus permettent de disposer en permanence d'un stock de cellules. Pour pouvoir manipuler ces cellules il convient de les détacher de leur boîte de culture pour les mettre dans des tubes. En effet, en culture, les cellules adhèrent au fond de la boîte. Pour les détacher, il faut donc couper les liens qui les relient à leur substrat tout en conservant l'intégrité de la cellule. Pour cela il y a plusieurs méthodes. Nous en verrons deux, puis nous décrirons comment ces cellules sont conditionnées *in situ*.

A.2.1 Trypsination

La méthode la plus couramment rencontrée pour décoller des cellules est la trypsination. La trypsine est une enzyme protéolytique, ç.à.d une enzyme qui dégrade les liaisons peptidiques des protéines sur lesquelles elle agit en hydrolysant une ou plusieurs de ces liaisons. En plus de la trypsine, on ajoute un agent chélatant, ç.à.d qui fixe les ions Ca^{2+} , l'EDTA (acide éthylène diaminetétracétique). Le protocole est le suivant :

On enlève les 5mL de milieu complet contenus dans la boîte de culture. Puis on rince le tapis cellulaire avec 1mL de trypsine-EDTA. Cette étape sert à enlever les ions divalents contenus dans le milieu complet et dont il subsiste toujours un résidu. Après avoir retiré ce mL, on rajoute à nouveau 2mL de trypsine-EDTA qu'on laisse agir cette fois pendant 2min. Au bout de ce temps, la quasi totalité du tapis est décollé. On ajoute alors 500μL de sérum de veau fœtal. Ceci a pour effet de bloquer l'action de la trypsine-EDTA. On place ensuite ces 2.5mL dans un tube Falcon de 15mL. A l'aide d'une pointe de 1mL, on sépare mécaniquement par flux et reflux les amas de cellules. Cette étape doit se faire très doucement pour ne pas abîmer la membrane des cellules qui a été fragilisée par l'action de la trypsine. On rajoute ensuite 10mL de DMEM sans sérum. On centrifuge le tout à 1000 tours pendant 4min. Cette étape sert à rincer la trypsine-EDTA. Pour être sûr de bien rincer, on centrifuge une deuxième fois. On récupère le culot que l'on resuspend à nouveau dans 1mL de DMEM. Comme précédemment, par flux et reflux, doucement on casse les amas cellulaires. On prélève enfin 100μL de cette suspension que l'on resuspend encore dans des tubes stériles contenant 5mL de DMEM. Ce sont ces tubes qui serviront pour les expériences.

A.2.2 Décollement à froid

Une autre manière de décoller les cellules est le décollement à froid. On aspire tout d'abord le milieu cellulaire de la boîte de culture dans laquelle sont contenues les cellules. Puis, on rince le tapis avec 3mL de tampon constitué de PBS (Phosphate Buffer Salin), de 3.5mM d'EDTA et de 2% de BSA (fraction v). On remet ensuite 5mL de tampon dans la boîte que l'on place

environ $2min$ sur de la glace. Par flux et reflux successifs, on détache mécaniquement les cellules de leur substrat. Encore une fois cette opération doit se faire doucement si on ne veut pas abîmer les cellules. On place ensuite les $5mL$ de tampon contenant les cellules dans un tube Falcon de $15mL$ dans lequel on rajoute $10mL$ de DMEM. On centrifuge le tout pendant $5min$ à 1000 tours. On récupère ensuite le culot que l'on resuspend dans $1mL$ de DMEM. On prélève enfin $100\mu L$ que l'on resuspend dans un tube stérile contenant $5mL$ de DMEM. Comme précédemment, ce sont ces tubes qui serviront aux expériences.

A.2.3 Conditionnement *in situ*

Une fois décollées les cellules sont conditionnées dans des tubes puis placées à agiter dans un incubateur à $37^{\circ}C$. Elles y restent deux heures. Cette étape est cruciale. En effet, il semblerait que la trypsine dégrade les protéines d'adhésion. Cette hypothèse demande toutefois à être vérifiée. Les deux heures servent donc à ce que les cellules puissent resynthétiser leurs protéines d'adhésion.

Après les deux heures, les cellules sont à nouveau capable d'adhérer, notamment à nos lamelles. On verse donc les $5mL$ du tube contenant cellules et milieu dans une chambre expérimentale cylindrique de $6cm$ de diamètre et de $5cm$ de hauteur. Des encoches sont percées de chaque côté afin de faire passer les bras portant les microplaques (Fig 1.5 et Fig 2.5). À ces $5mL$ sont ajoutés $6mL$ de DMEM, puis enfin $10mL$ de parafine GPR (BDH Laboratory Supplies Pool, Angleterre).

Pour que le pH du milieu reste constant pendant la durée des expériences, on tamponne le milieu avec de l'HEPES (GIBCO) à $15mM$. De plus l'huile permet d'éviter les échanges d' O_2 source de changement de pH. Par ailleurs, la sonde de la thermalisation est plongée dans le milieu cellulaire, ce qui assure que la température du milieu est bien à $37^{\circ}C$.

Annexe B

Traitement de la surface des microplaques

Pour pouvoir étirer les cellules, il faut les attacher à nos microplaques. Il est donc nécessaire de traiter chimiquement la surface des lamelles afin d'assurer une adhérence suffisante. Or l'adhésion naturelle au verre n'est pas suffisante pour supporter les contraintes appliquées. Historiquement [Thoumine, 1997], à cause du très faible taux de réussite de collage d'une cellule aux lamelles (20%), l'agent chimique choisi fut le glutaraldéhyde pour sa capacité à former des liaisons covalentes avec les fonctions amines de toutes les protéines transmembranaires. Ainsi en s'attachant à un maximum de protéines transmembranaires, les chances de réussite étaient plus grandes que si l'on avait opté pour une molécule spécifique de l'adhérence cellulaire qui aurait ponté un nombre moins important de protéines. Par la suite, ayant observé que les difficultés d'adhésion semblaient plutôt liées à la trypsination des cellules, nous avons pu traiter nos microplaques avec des protéines spécifiques de l'adhérence cellulaire telle que la fibronectine et la cahérine. La partie des microplaques à traiter, la partie en contact avec la cellule, est la pointe des lamelles. Pour des raisons de commodités, on traite les microplaques dans leur ensemble.

B.1 Nettoyage

Avant chaque traitement les microplaques sont nettoyées. On les trempe pendant $10min$ dans une solution de piranha [Ladoux, 2001] composée à 67% de peroxyde d'oxygène à 30% stabilisé (PROLABO) et à 33% d'acide sulfurique NORMAPUR à 95% (PROLABO). Grâce à ce nettoyage, il est possible de réutiliser des microplaques ayant déjà servies lors d'expériences précédentes. Si après plusieurs utilisations, on n'arrive plus à nettoyer les lamelles, on les plonge dans un bain de soude concentrée ($5M$) pendant quelques heures. Puis on les rince dans un bain de piranha pendant $10min$ afin d'être sûr que les traitements seront équivalents.

B.2 Glutaraldéhyde

Les biologistes utilisent le glutaraldéhyde en solution pour fixer les cellules en vue d'effectuer des marquages fluorescents permettant notamment de faire des analyses de structure. Dans notre cas, le glutaraldéhyde n'est présent qu'à la surface des lamelles et fixe uniquement la zone de contact entre la cellule et la lamelle. Le traitement se déroule en deux étapes. La première consiste à déposer des silanes sur les lamelles de verre et la seconde consiste à déposer des molécules de glutaraldéhyde sur la surface couverte d'amines.

On trempe pendant deux heures les microplaques dans un bain de silanes aminés. Ce bain est composé à 90% d'éthanol absolu RECTAPUR (PROLABO), à 7% d'eau à 18MΩ (Millipore) et à 3% de 3-aminopropyltriéthoxysilane (Sigma-Aldrich, France). Pendant les deux heures les molécules de silane réagissent avec la silice du verre et s'y fixent. Les groupements méthyl réagissent avec les molécules d'eau et les molécules d'éthanol afin de former des liaison entre la silice du silane et la silice du verre (Fig B.1).

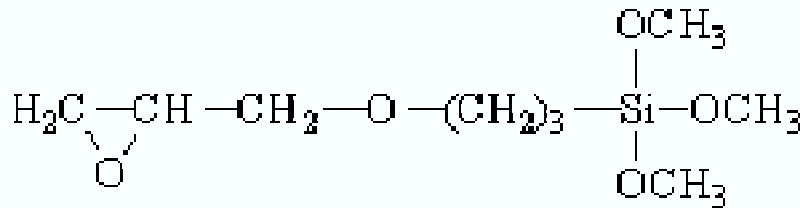


FIG. B.1 – 3-aminopropyltriéthoxysilane

Après avoir sorti les microplaques du bain de silanes aminés, on les rince avec de d'éthanol. On attend que le microplaques sèchent, puis on les trempe dans un second bain. Le deuxième bain est composé de glutaraldéhyde G-7776 (Sigma-Aldrich, France) dilué à 2% dans de l'eau à 18MΩ. On les y laisse une heure. Un des aldéhydes en bout de chaîne (Fig B.2) réagit avec la partie N-terminale de la molécule de silane.

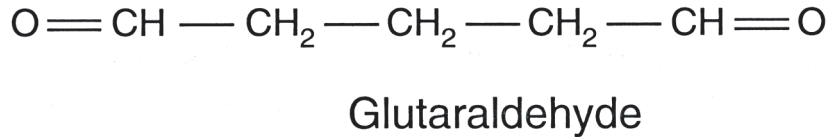


FIG. B.2 – glutaraldéhyde

Au final, nous avons donc un tapis de groupements aldéhydes sur la surface de la lamelle. Ces groupements aldéhydes réagiront donc avec les parties N-terminales des protéines transmembranaires. Ainsi, on s'attache à toutes les protéines transmembranaires ayant leur extrémité N-terminale à l'extérieur de la cellule. Ce type d'attache est de fait non spécifique.

B.3 Cadhérine

Les cadhérines sont membres d'une famille de protéines d'adhésion intercellulaire dans les tissus animaux. Ces protéines sont Ca^{2+} dépendante et s'apparient par des mécanismes homophiles, ç.à.d que l'adhésion résulte de l'interaction entre les cadhérines présentent à la surface de deux cellules voisines. Il existe plusieurs type de jonction cellule-cellule structurellement et fonctionnellement différentes. Pour une cellule épithéliale, les jonctions sont organisées comme indiquée sur la figure B.3.

Le traitement cadhérine est plus compliqué à mettre en place. En effet, comme les lamelles ne doivent jamais sécher au cours du traitement, le traitement se fait donc *in situ*. Tout d'abord on recouvre les microplaques d'organopolysiloxane (Sigmacote, Sigma) [Gavard, 2003]. On posi-

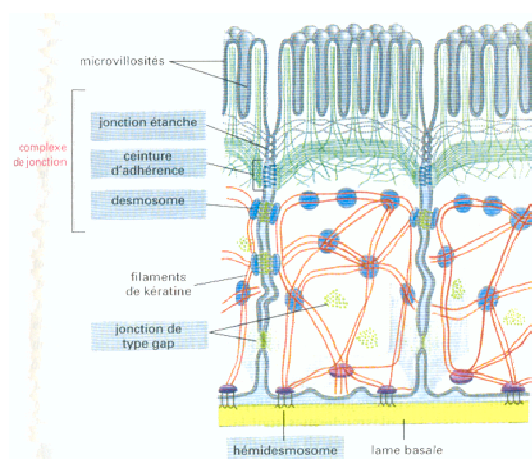


FIG. B.3 – Types de jonctions cellule-cellule pour une cellule épithéliale de l'intestin grêle. Les jonctions étanches (occluding junctions) assurent la cohésion du feuillet dans le cas d'un épithélium. Leur fonction principale est d'empêcher les échanges de molécules entre le liquide au contact de la face apicale et celui au contact de la lame basale. Le deuxième type de jonction regroupe les jonctions d'ancrages (anchoring junctions). Ces jonctions ont un rôle purement mécanique. Elles sont subdivisées en deux sous classes : les jonctions adhérentes qui offrent des sites d'attachement pour les filaments d'actine et les desmosomes qui offrent des sites d'attachement pour les filaments intermédiaires. Le dernier type de jonction concerne les jonctions communicantes (gap junctions) qui permettent le passage de signaux chimiques ou électriques entre cellules.

tionne ensuite les microplaques sous le microscope et on recouvre leur pointe d'une goutte contenant $150\mu L$ de tampon borate et $2\mu L$ de fragments d'anticorps $Fc\gamma$ (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) à $2\mu g.\mu L^{-1}$ [Lambert, 2000]. On laisse cette goutte pendant deux heures. On rince ensuite avec le tampon borate en déposant puis aspirant cinq fois une goutte de ce tampon. L'étape suivante consiste à déposer une goutte contenant $200\mu L$ de tampon borate et $25\mu L$ de la protéine chimérique NCad-Fc [Lambert, 2000]. À nouveau, on laisse cette goutte pendant deux heures. On rince ensuite cinq fois avec du tampon borate comme précédemment. Enfin, afin de saturer les sites d'adhésion non spécifiques, on dépose $2mL$ de tampon borate dans lequel on a dilué de la BSA, *bovine serum albumine*, (Sigma-Aldrich, France) à $10^{-2}g.mL^{-1}$. On laisse les lamelles incuber $10min$ dans cette solution et on déverse ensuite les cellules. La construction de la cadhérine chimérique est réalisée à l'unité INSERM du Fer à Moulin par Mireille Lambert.

B.4 Fibronectine

La fibronectine est une grande glycoprotéine contenue dans la matrice extracellulaire. Elle favorise l'attachement des cellules à la matrice. Cette protéine est un dimère contenant des séquences RGD, sites de fixation aux intégrines.

Ce traitement est le plus simple et le plus rapide. Après avoir nettoyé les microplaques, on les trempe dans un bain constitué de $5mL$ de DMEM contenant $25\mu L$ de fibronectine F-1141 (Sigma). Deux stratégies sont possibles. Soit on place les bords à $37^{\circ}C$ et on y laisse pendant une demie heure les microplaques. Soit les bords sont à température ambiante et on y plonge les microplaques pendant deux heures. L'inconvénient de ce traitement est d'induire un étalement trop rapide et quasi systématique des cellules sur les microplaques.

Annexe C

La détection optique

C.1 Principe de fonctionnement du capteur de position

Le capteur est caractérisé par une résistance linéique ρ . Dans son principe, ce détecteur est comparable à un potentiomètre.

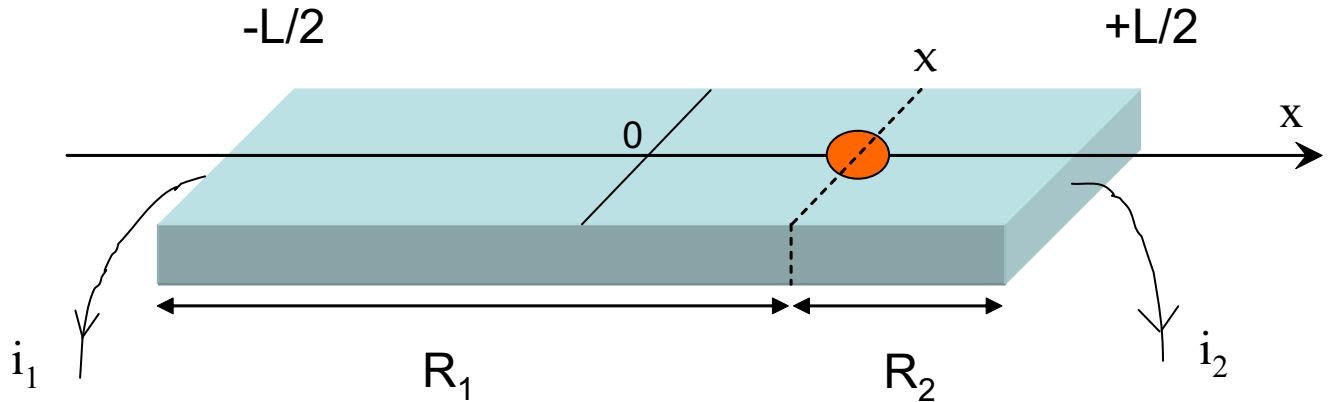


FIG. C.1 – Le détecteur, comparable à un potentiomètre, permet de détecter la position d'un point lumineux. Cette position détermine les valeurs des résistances R_1 et R_2 à travers lesquelles s'écoulent les courants i_1 et i_2 .

Une tâche lumineuse d'intensité I_0 , incidente à une distance x du centre du capteur, a pour effet de créer une paire électron-trou chargée électrique q et donc un courant i_0 proportionnel à l'intensité incidente (Fig C.1). Le capteur se comporte alors comme un générateur de courant (Fig C.2) :

$$\begin{cases} i_1 = \frac{R_2}{R_1+R_2} i_0 \\ i_2 = \frac{R_1}{R_1+R_2} i_0 \end{cases} \quad (\text{C.1})$$

Puis les résistances s'expriment :

$$\begin{cases} R_1 = \rho(\frac{L}{2} + x) \\ R_2 = \rho(\frac{L}{2} - x) \end{cases} \quad (\text{C.2})$$

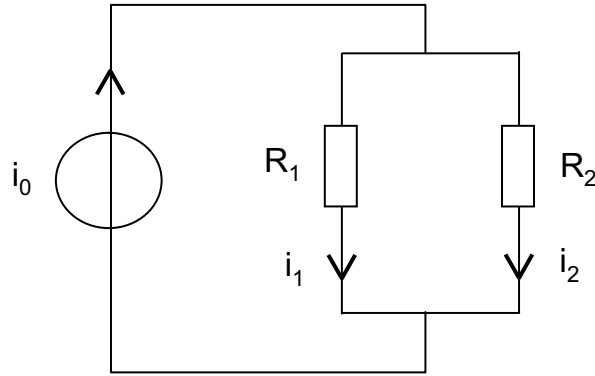


FIG. C.2 – Circuit équivalent du capteur éclairé par une tâche lumineuse ponctuelle située à l'abscisse x . La tâche crée un potentiel électrique U . les charges s'écoulent ensuite de part et d'autre du capteur, créant ainsi deux courant i_1 et i_2 .

d'où :

$$\begin{cases} i_1 = \frac{i_0}{2} \left(1 - \frac{x}{L/2}\right) \\ i_2 = \frac{i_0}{2} \left(1 + \frac{x}{L/2}\right) \end{cases} \quad (\text{C.3})$$

Par ailleurs i_0 est proportionnel à l'intensité I_0 du faisceau incident, c'est à dire à la surface de la tâche élémentaire et à l'éclairage. On écrit donc $i_0 = ke_0 dxdy$ où α est une constante caractéristique du matériaux dont est constitué le détecteur. Alors :

$$\begin{cases} i_1 = \frac{ke_0 dxdy}{2} \left(1 - \frac{x}{L/2}\right) \\ i_2 = \frac{ke_0 dxdy}{2} \left(1 + \frac{x}{L/2}\right) \end{cases} \quad (\text{C.4})$$

On déduit donc que :

$$x = \frac{L}{2ke_0 dxdy} (i_2 - i_1) \quad (\text{C.5})$$

et l'on constate que la position x du faisceau incident sur le capteur est donnée par la différence ($i_2 - i_1$) des courants récoltés à ses bornes.

Cependant, à ce stade, la valeur de x reste dépendante de la valeur I_0 de l'intensité du faisceau lumineux. Elle peut donc être modifiée par des variations d'intensité. Pour s'affranchir de cet artefact, il suffit alors de diviser la différence des courants i_1 et i_2 par leur somme. La mesure m de la position x est alors donnée par :

$$m = \frac{i_2 - i_1}{i_2 + i_1} = \frac{x}{L/2} \quad (\text{C.6})$$

m varie alors de -1 à 1 lorsque le faisceau parcourt le capteur ($-\frac{L}{2} < x < \frac{L}{2}$).

C.2 Détection de nos lamelles (contraste inversé)

Nous venons de décrire le principe de fonctionnement du détecteur tel qu'il est prévu par le fabricant. Pour notre application (détection de la pointe d'une lamelle de verre transparente), nous avons du travailler non pas avec un point lumineux sur fond noir, mais plutôt avec un trait sombre (correspondant au minimum d'intensité de la tâche de diffraction due aux bords de la lamelles) sur un fond uniformément éclairé. Nous allons décrire ici, le fonctionnement du capteur dans ces conditions.

C.2.1 Éclairage uniforme

Supposons que le détecteur soit éclairé uniformément (typiquement l'éclairage du microscope inversé) et reçoit une quantité d'énergie lumineuse par unité de surface e_0 . Alors le courant total reçu est $i_0 = ke_0Ll$, où L est la longueur du capteur, l sa largeur et k est une constante caractéristique du détecteur. Le détecteur étant uniformément éclairé, le courant i_0 se divise en deux courants égaux i_1 et i_2 à ses bornes. Donc d'après l'équation C.7, $m = 0$.

C.2.2 Tâche lumineuse d'extension finie

Supposons maintenant qu'on applique un cache de sorte que seul un carré de surface infinitésimale $dS = dxdy$ situé à une distance x du centre soit uniformément éclairé (Fig C.3).

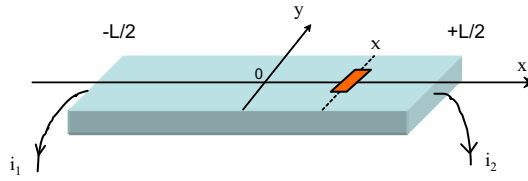


FIG. C.3 – Cas d'une tâche lumineuse rectangulaire sur un fond noir.

Alors, nous sommes ramenés au fonctionnement décrit en C.1 avec $i_0 = ke_0dxdy = i_1 + i_2$ (i_1 et i_2 sont donnés par l'équation C.5) et avec x toujours donné par C.7.

Si l'on étend la surface éclairée à une bande de longueur égale à la largeur du capteur et de largeur Δx (Fig C.4). Alors, chaque carré de surface $dS = dxdy$ offre une contribution au courant total : $d^2i_0 = ke_0dxdy$. Le courant total est égal la somme de chaque contribution :

$$i_0(\Delta x) = ke_0 \int_{-\frac{l}{2}}^{\frac{l}{2}} \int_{x-\frac{\Delta x}{2}}^{x+\frac{\Delta x}{2}} dxdy = ke_0l\Delta x \quad (C.7)$$

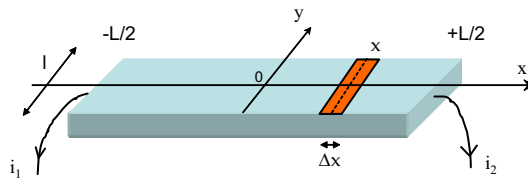


FIG. C.4 – Cas d'une bande uniformément éclairée sur fond noir.

D'après l'équation C.5 :

$$\begin{cases} d^2i_1 = \frac{d^2i_0}{2} \left(1 - \frac{x}{L/2}\right) \\ d^2i_2 = \frac{d^2i_0}{2} \left(1 + \frac{x}{L/2}\right) \end{cases} \quad (C.8)$$

Soit :

$$(i_2 - i_1)(\Delta x) = \int \int \frac{x}{L/2} d^2i_0 = \frac{ke_0}{L/2} \int_{-\frac{l}{2}}^{\frac{l}{2}} \int_{x-\frac{\Delta x}{2}}^{x+\frac{\Delta x}{2}} x dxdy = ke_0l\Delta x \frac{x}{L/2} \quad (C.9)$$

Puis, $m(\Delta x) = \frac{x}{L/2}$. On retrouve le même résultat qu'avec une tâche lumineuse ponctuelle (Eq C.7), x représenté ici le centre géométrique de la tâche étendue ("barycentre lumineux").

C.2.3 Ombre sur un éclairage uniforme

Intéressons nous maintenant à la sortie du capteur lorsqu'il est uniformément éclairé et qu'une bande sombre de longueur l et de largeur Δx en occulte une partie (Fig C.5). Cette situation correspond en quelque sorte au négatif de la situation précédente et représente schématiquement la configuration dans laquelle nous avons travaillé, i.e image de la pointe de la lamelle souple sur le capteur uniformément éclairé. Dans cette configuration, on désigne les grandeurs i_0 et m avec un indice moins, i.e. i_0^- et m^- .

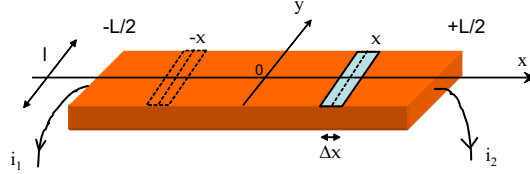


FIG. C.5 – Cas d'une bande noire sur fond uniformément éclairé. La bande en pointillés à gauche représente le symétrique par rapport à Oy de la bande noire de droite.

Dans ce cas :

$$i_0^-(\Delta x) = ke_0 \int_{-\frac{l}{2}}^{\frac{l}{2}} dy \left(\int_{-\frac{L}{2}}^{\frac{L}{2}} dx - \int_{x-\frac{\Delta x}{2}}^{x+\frac{\Delta x}{2}} dx \right) \quad (C.10)$$

Donc,

$$i_0^-(\Delta x) = ke_0 l (L - \Delta x) = i_0 - i_0(\Delta x) \quad (C.11)$$

Le courant total est donc simplement égal au courant (i_0) que délivrerait le capteur si il était uniformément éclairé auquel on retranche le courant ($i_0(\Delta x)$) que délivrerait une bande lumineuse de même largeur que la bande sombre.

$$(i_2^- - i_1^-)(\Delta x) = ke_0 \frac{l}{2} \left[\int_{-\frac{L}{2}}^{\frac{L}{2}} x dx - \int_{x-\frac{\Delta x}{2}}^{x+\frac{\Delta x}{2}} x dx \right] = -ke_0 \frac{l}{2} \int_{x-\frac{\Delta x}{2}}^{x+\frac{\Delta x}{2}} x dx = -\frac{i_0(\Delta x)x}{\frac{L}{2}} \quad (C.12)$$

Finalement, on obtient que la mesure de la position m^- est donnée par :

$$m^-(\Delta x) = -\frac{x}{\frac{L}{2}} \frac{\Delta x}{L - \Delta x} = -m(\Delta x) \frac{\Delta x}{L - \Delta x} \quad (C.13)$$

On constate que travailler en contraste inversé a deux conséquences : une inversion du signe et une sensibilité diminuée d'un facteur $\frac{\Delta x}{L - \Delta x}$.

Dans cette configuration, de toute la surface éclairée du capteur, seule la partie symétrique de la zone sombre par rapport à Oy (Fig C.5) donne une contribution non nulle à $i_2 - i_1$. Les contributions des autres parties s'annulent deux à deux, i.e. à chaque élément de surface éclairé situé à $x > 0$ correspond un élément symétrique ($x < 0$). Ceci explique le signe (-) qui apparaît dans la formule (C.14).

Le facteur $\frac{\Delta x}{L - \Delta x}$ rend compte du fait que si $i_2 - i_1$ est proportionnel à la surface $l\Delta x$ de la zone éclairée symétrique de la zone sombre par rapport à Oy ; la somme $i_2 + i_1$ est proportionnelle à toute la surface éclairée du capteur $l(L - \Delta x)$.

Ainsi, ne retrouve-t-on les performances du contraste direct que pour une tâche large $\Delta x = \frac{L}{2}$.

Annexe D

Expérience de relaxation

Une expérience de relaxation consiste à mesurer la force $F(t)$ nécessaire pour appliquer et maintenir une déformation constante sur un corps donné. On utilise pour ce faire notre dispositif d'étirement uniaxial (Partie II). Ce chapitre concerne exclusivement les myoblastes C 2.7 collées aux lamelles de verre par du glutaraldéhyde.

D.1 Protocole et principe

Protocole Le protocole de positionnement des lamelles pour ces expériences est identique à celui utilisé dans le cas d'expériences de fluages. On traite tout d'abord les lamelles de sorte à couvrir la surface du verre de molécules de glutaraldéhyde (Annexe B). En parallèle nous décolons les cellules par action de la trypsine (Annexe A). On débute l'expérience deux heures plus tard, après avoir préalablement positionné les lamelles de manière à ce que l'image de la lamelle souple soit au centre de la plage linéaire du capteur (Partie II, §3).

Principe Nous imposons une déformation donnée en déplaçant la lamelle rigide parallèlement à Oy et nous la maintenons en rétroagissant sur le bras porteur de la lamelle souple. Après le déplacement initial, les positions de la pointe de la lamelle souple et de la lamelle rigide sont maintenues fixes (Fig D.1). Initialement, la cellule est indéformable. La pointe de la lamelle souple se déplace donc avec la lamelle rigide. Ensuite, en plus de la relaxation naturelle de la lamelle souple ainsi défléchie (p , compté positivement dans le sens des y décroissants), le programme de contrôle déplace (δ , compté positivement dans le sens des y croissants) le bras porteur de la lamelle souple en vue de réguler sa déflexion ($p + \delta$), *i.e.* la force, afin de ramener la pointe de la lamelle souple à sa position initiale ($p = 0$) (Fig D.2). La force qui s'exerce sur le cellule est donnée par :

$$F(t) = k.(p + \delta) \quad (\text{D.1})$$

où k est la raideur de la lamelle souple.

La fonction de relaxation est définie par :

$$G(t) \equiv \frac{\sigma(t)}{\epsilon}, \quad \epsilon = cte \quad (\text{D.2})$$

La contrainte σ est cette fois ci variable et s'exprime comme suit :

$$\sigma(t) \equiv \frac{F(t)}{S} = \frac{k.(p(t) + \delta(t))}{S} \quad (\text{D.3})$$

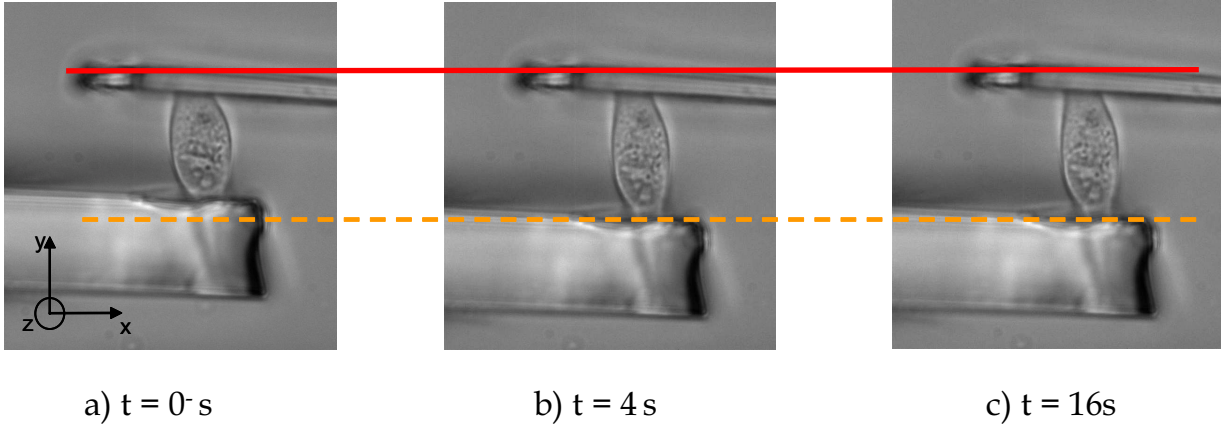


FIG. D.1 – Pour imposer une déformation constante, à l’instant initial, on déplace parallèlement à Oy la lamelle rigide vers une position "cible" et on maintient la position de la pointe de la lamelle souple grâce à la boucle d’asservissement.

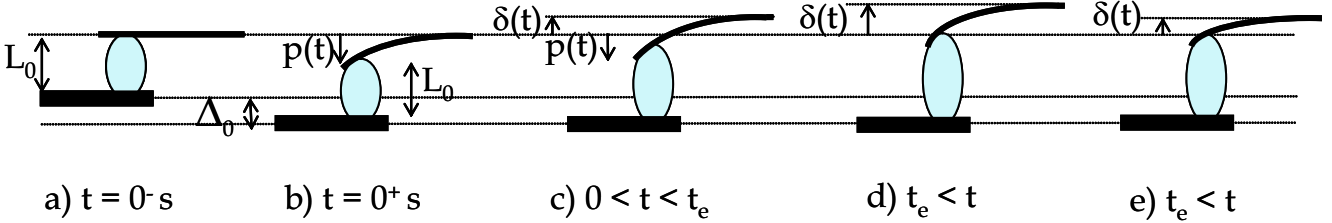


FIG. D.2 – Principe d’une expérience de relaxation : a) À $t = 0$; b) On impose à la lamelle rigide un déplacement Δ_0 . Instantanément, la pointe de la lamelle souple se déflechie d’une quantité $p \simeq \Delta_0$; c) En même temps que p diminue, le programme de contrôle déplace le bras porteur de la lamelle souple d’une quantité δ ; d) t_e représente le temps d’établissement de la déformation ($p(t_e) = 0$).

La surface sur laquelle s’applique la contrainte est calculée de la même manière que pour une expérience de fluage.

$$\sigma = \frac{\sigma_{rigide} + \sigma_{souple}}{2}$$

La fonction de relaxation est donc proportionnelle à la somme du déplacement de la pointe de la lamelle souple (signal délivré par le capteur) et du déplacement du bras porteur de cette même lamelle (sortie de la boucle d’asservissement).

D.2 Comparaison avec les expériences de fluage

À la différence des expériences de fluage pour lesquelles la contrainte s’établit presque instantanément ($1/100^{ème}s$), il est ici impossible de déformer la cellule quasi-instantanément. Si l’on s’intéresse à la position de la pointe de la lamelle souple, on constate qu’initialement elle se déplace effectivement d’une quantité p pratiquement égale au déplacement Δ_0 imposé de la lamelle rigide (Fig D.5). La cellule se déforme ensuite, permettant à la pointe de la lamelle souple de revenir à sa position souhaitée (zone 1, Fig D.3). Le temps d’établissement de la déformation t_e est variable. Il dépend de la raideur de la lamelle et du matériau. En moyenne ce temps

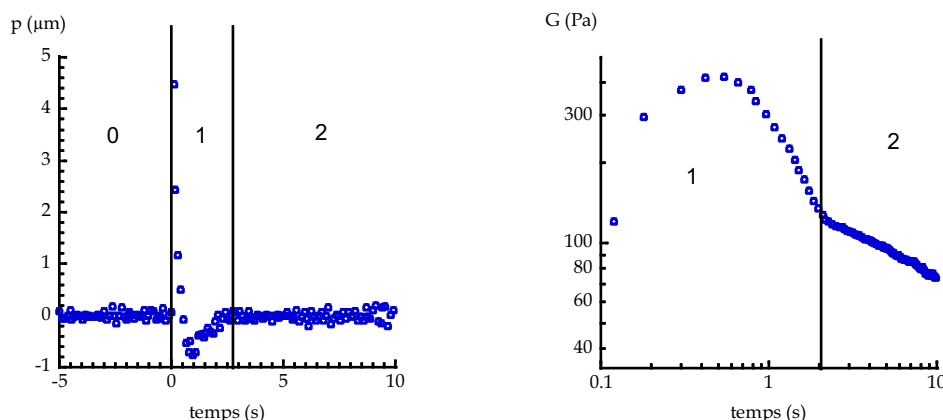


FIG. D.3 – p est la position de la pointe de la lamelle souple sur le capteur, G est la fonction de relaxation d'une C2.7. Avant d'appliquer la déformation (zone 0), la position de la lamelle souple est fixe. On applique un déplacement de la lamelle rigide à l'instant initial ($t = 0$). La déformation ne s'applique pas immédiatement, la pointe de la lamelle souple suit la lamelle rigide (zone 1). Une fois la déformation établie (zone 2), la fonction de relaxation suit une loi de puissance avant de s'étaler (Fig D.3).

d'établissement est de l'ordre de $2s$.

Étant donné que l'on a observé une fonction de fluage en loi de puissance, on s'attend normalement à observer une fonction de relaxation aussi en loi de puissance.

$$G(t) = Bt^{-\alpha} \quad (\text{D.4})$$

Si l'on trace alors la fonction de relaxation en échelle logarithmique (Fig D.3), on constate effectivement qu'une fois l'établissement de la déformation passé (zone 2, Fig D.3), la fonction de relaxation suit une loi de puissance.

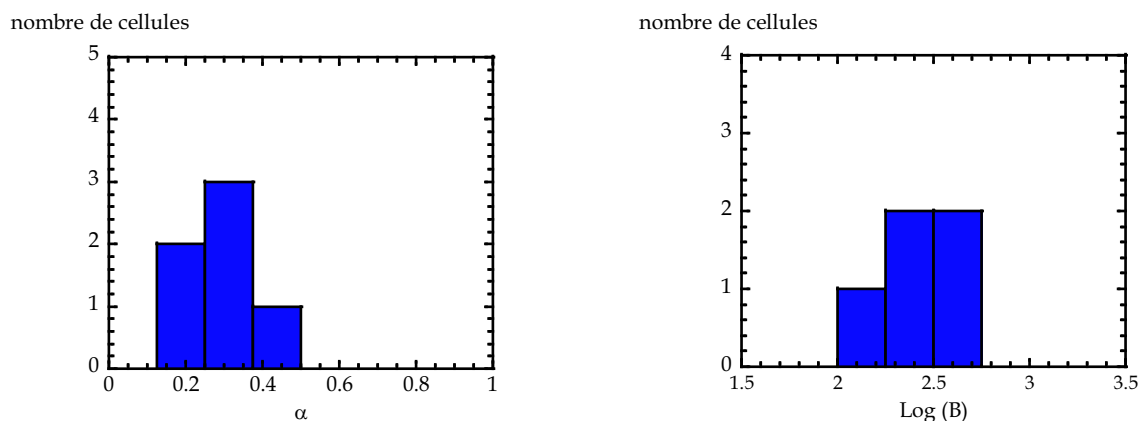


FIG. D.4 – Paramètre d'ajustement de la fonction de relaxation : $\alpha = 0.28 \pm 0.10$ et $\log B = 2.47 \pm 0.19$. Les erreurs données correspondent aux déviations standards. Il y a un point en moins pour le préfacteur B du fait qu'une lamelle n'a pu être calibrée.

Pour un nombre de cellules $N = 7$ (Fig D.4), on trouve que $\alpha = 0.28$ avec une erreur standard de ± 0.04 (la déviation standard est de ± 0.10) et que $\log B = 2.47 \pm 0.07$ (la déviation standard est

de ± 0.19). En supposant que les préfacteurs B sont distribués de manière log-normale comme pour A , alors la valeur médiane de B correspond à $\log^{-1}(\langle \log B \rangle_N)$. On trouve donc que $B = 295 \text{ Pa} \pm 50$ (la déviation standard est de ± 160).

L'exposant que l'on trouve pour la relaxation est comparable à celui obtenu pour avec les expériences de fluage. Par contre le préfacteur que l'on trouve est sensiblement inférieur à ce qui est obtenu avec le fluage. Cependant, il paraît difficile de comparer quantitativement les résultats de relaxation à ceux de fluage. En effet, dans le cas de la relaxation, la plage de temps analysable couvre moins d'une décade (entre 2s et 10s) contre deux décades et demi pour le fluage. Aux temps courts, on est limité par le temps d'établissement de la déformation et aux temps long, la cellule s'étale (Fig D.5). Le temps d'établissement de la contrainte est de l'ordre de la plage de temps sur laquelle la fonction de relaxation se comporte en loi de puissance, la valeur de B est probablement liée à ce temps. Pour améliorer la situation à l'avenir, on pourrait imaginer deux stratégies. Tout d'abord, pour analyser les mesures aux temps courts, il faudrait tenir compte de l'évolution de la déformation et résoudre l'équation :

$$\sigma(t) = G(t)\varepsilon(0) + \int_0^t G(t-t')\dot{\varepsilon}(t')dt' \quad (\text{D.5})$$

où G est la fonction inconnue à déterminer et $\varepsilon(0) = 0$ (cellule indéformable). Cependant pour $t = 0$, comme $\sigma(0) = 0$ et $\varepsilon(0) = 0$, $G(0)$ est indéterminée. De plus on s'attend à ce que la fonction de relaxation G soit singulière en $t = 0$. Ensuite aux temps longs, il faudrait pouvoir circonscrire l'étalement par traitement chimique des lamelles.

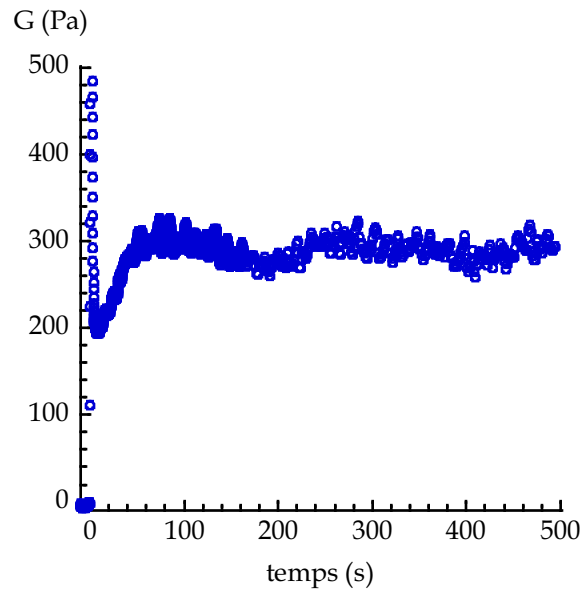


FIG. D.5 – Courbe de relaxation d'une cellule. La remontée de G est due à un étalement.

Aux temps longs, on constate la plupart du temps que la cellule s'étale (Fig D.5). Ceci se traduit par un changement du sens de variation de G , *i.e.* la force augmente afin de compenser la force développée par la cellule lorsqu'elle s'étale. Dit autrement, la cellule en s'étalant diminue sa taille entre les lamelles et la force appliquée par la lamelle souple augmente pour maintenir une taille constante entre les lamelles⁴¹

⁴¹Cela nous rappelle le comportement identifié par O. Thoumine [Thoumine, 1997] comme une contraction

cellulaire. Le début de l'étalement se fait, chez nous, après une vingtaine de seconde alors que le début de la contraction qu'il observe s'effectue bien plus tard ($\approx 10min$). Cette différence provient du fait qu'avec son dispositif, la lamelle rigide n'est pas déplacée instantanément (environ 10s) et que surtout la force relaxe mais la déformation augmente en même temps. Donc si on imagine que la contraction est une signature de l'étalement, la cellule doit dans un premier temps se déformer pour atteindre une taille d'équilibre lui permettant de commencer son étalement.

Annexe E

Matériaux vitreux mous « SGM »

E.1 Description

Pour décrire théoriquement ces objets, on découpe le matériau en éléments de tailles mésoscopiques. Ces éléments mésoscopiques s'organisent de manière désordonnée à l'intérieur du matériau. Le désordre impose à chaque élément d'être contraint par les interactions avec ses voisins et plonge chacun des éléments dans des puits d'énergie E . E représente en quelque sorte une énergie d'activation au delà de laquelle l'élément se réarrange et de fait réarrange le matériau dans son ensemble. Ceci a pour effet de rendre les configurations d'énergie métastables. Les réarrangements sont activés par une température effective x qui reflète les interactions dans le système. Avec ces ingrédients, J.P. Bouchaud écrit l'évolution de la probabilité $P(E, t)$ de trouver un élément dans un puit d'énergie E au temps t [Bouchaud, 1992] [Monthus, 1996] :

$$\frac{\partial P(E, t)}{\partial t} = -\Gamma_0 \exp\left(-\frac{E}{x}\right)P(E, t) + \Gamma(t)\rho(E) \quad (\text{E.1})$$

$\Gamma_0 \exp\left(-\frac{E}{x}\right)P(E, t)$ représente le nombre d'éléments qui sortent du puit E pendant dt . Γ_0 est la fréquence d'essais à laquelle les éléments essaient de sortir des puits (Γ_0 est indépendant de E), $\exp\left(-\frac{E}{x}\right)$ est la probabilité pour qu'un élément franchisse la barrière d'énergie E . Dans le même temps dt , il y a $\Gamma(t)\rho(E)$ éléments qui arrivent dans le puit E . $\Gamma(t)$ est donné par :

$$\Gamma(t) = \Gamma_0 \int \exp\left(-\frac{E}{x}\right)P(E, t)dE \quad (\text{E.2})$$

Si l'on suppose que la densité d'états d'énergie décroît exponentiellement ($\rho(E) \propto \exp\left(-\frac{E}{x_g}\right)$), alors pour $x < x_g$, on se rend compte que l'on ne peut plus définir⁴² de distribution d'équilibre $P(E)$, *i.e* telle que $\frac{\partial P(E, t)}{\partial t} = 0$. Donc x_g définit une température de transition vitreuse.

Si à présent, on déforme le matériau, alors pour chaque élément mésoscopique il faut introduire une déformation l . L'énergie d'activation (pour sortir hors du puit) est alors l'énergie E_y à fournir pour atteindre une déformation seuil l_y induisant un réarrangement de l'élément ($E_y = \frac{1}{2}kl_y$). Dans le cas d'une mousse, les éléments mésoscopiques s'étendent sur plusieurs bulles. Un réarrangement correspondrait alors à deux bulles ou plus qui coalescent. L'évolution de la distribution des états d'énergie $P(E, l, t)$ est alors donnée par :

$$\frac{\partial P(E_y, l, t)}{\partial t} = -\Gamma_0 \exp\left(-\frac{E_y - \frac{1}{2}kl^2}{x}\right)P(E_y, l, t) + \Gamma(t)\rho(E_y)\rho(l) - \dot{\gamma} \frac{\partial P(E_y, l, t)}{\partial l} \quad (\text{E.3})$$

⁴²Pour $x < x_g$, $P(E)$ n'est pas normalisable.

Dans ce cas, $\Gamma(t)$ s'écrit :

$$\Gamma(t) = \Gamma_0 \int \exp\left(-\frac{E_y - \frac{1}{2}kl^2}{x}\right) P(E_y, l, t) dE_y dl \quad (\text{E.4})$$

En résumé, un matériau est vitreux mou car il existe une température critique en dessous de laquelle le système devient vitreux (hors d'équilibre) et parce qu'il est déformable. C'est le cas des mousses, des émulsions, des pâtes et des boues.

Interressons nous à présent à la rhéologie de ces matériaux, *i.e* à leur aptitude à s'écouler. À chaque éléments est associé une contrainte locale $\sigma_l = kl$. La contrainte globale est alors la moyenne de ces contraintes locales :

$$\sigma(t) = k \int l P(E_y, l, t) dE_y dl \quad (\text{E.5})$$

On pose $x_g = \Gamma_0 = k = 1$ et on écrit $l = \Delta l + \epsilon(t)$. Si maintenant on suppose que le système est initialement pas déformé et qu'il n'y a pas de frustration alors $l = 0$. En intégrant sur E_y , il est alors possible de déterminer, quelque soit la température x , l'équation rhéologique reliant contrainte macroscopique σ et déformation macroscopique ϵ :

$$\sigma(t) = \epsilon(t) - \int_0^t \Gamma(t') \epsilon(t') G_\rho(Z(t, t')) dt' \quad (\text{E.6})$$

avec

$$G_\rho(z) = \int \rho(E_y) \exp\left(-ze^{-\frac{E_y}{x}}\right) dE_y$$

$$Z(t, t') = \int_{t'}^t \exp\left(\frac{[\epsilon(t'') - \epsilon(t')]^2}{2x}\right) dt''$$

$Z(t, t')$ représente un intervalle de temps effectif. Pour de petites déformations, les réarrangements sont induits par la température effective, alors $Z(t, t') = t - t'$. Pour les grandes déformations, les réarrangement sont induits par la déformation des éléments mésoscopiques qui atteint la valeur seuil l_y et $Z(t, t') > t - t'$. Dans ce cas, la fonction $Z(t, t')$ introduit des effets non-linéaires.

E.2 $x > 1$:

Au dessus de la transition vitreuse, le système est à l'équilibre. La distribution d'énergie est stationnaire et $\Gamma(t) = \Gamma_{eq}$:

$$P_{eq}(E_y) = \Gamma_{eq} \exp\left(\frac{E_y}{x}\right) \rho(E_y) \quad (\text{E.7})$$

$$\Gamma_{eq}^{-1} = \int \rho(E_y) \exp\left(\frac{E_y}{x}\right) dE_y \quad (\text{E.8})$$

Si l'on s'intéresse au régime linéaire, *i.e* aux petites déformations ($\epsilon < l_y$) autour de l'état d'équilibre, alors les réarrangements sont induits par la température effective et $\sigma(t)$ s'écrit :

$$\sigma(t) = \int_0^t \epsilon(t') G_{eq}(t - t') dt' \quad (\text{E.9})$$

où $G_{eq}(t)$ est la fonction de relaxation du matériau, *i.e* la réponse à un échelon de déformation. G_{eq} s'explique en fonction des paramètres précédents comme :

$$G'_{eq}(t - t') = -\Gamma_{eq} G_\rho(t - t') \quad (\text{E.10})$$

De cette fonction de relaxation, on déduit le module complexe $G^*(\omega)$:

$$G^*(\omega) = i\omega \int_0^\infty e^{-i\omega t} G_{eq}(t) dt = \left\langle \frac{i\omega\tau}{i\omega\tau + 1} \right\rangle_{eq} \quad (\text{E.11})$$

Donc $G^*(\omega)$ est la moyenne de modes de Maxwell ayant des temps de relaxation τ . Ces temps correspondent aux temps moyens entre deux réarrangements :

$$\tau = \exp\left(\frac{E_y}{x}\right) \quad (\text{E.12})$$

En écrivant que $P_{eq}(E_y)dE_y = P_{eq}(\tau)d\tau$ et en supposant que $\rho(E_y)$ a une queue exponentielle, on obtient d'après l'équation 1.10 que pour $\tau \gg 1$:

$$P_{eq}(\tau) \propto \tau^{-x} \quad (\text{E.13})$$

En injectant l'équation E.11 dans l'équation E.13, on détermine pour les basses fréquences le module élastique et le module de perte :

$$G'(\omega) \sim \begin{cases} \omega^2, & \text{si } x > 3 \\ \omega^{x-1}, & \text{si } 1 < x < 3. \end{cases} \quad G''(\omega) \sim \begin{cases} \omega, & \text{si } x > 2 \\ \omega^{x-1}, & \text{si } 1 < x < 2. \end{cases} \quad (\text{E.14})$$

Pour notre propos cette équation E.14, valable dans le régime linéaire, constitue le résultat central de la théorie des matériaux vitreux mous. Donc pour $x > 3$, le matériau est un liquide de Maxwell. Pour $2 < x < 3$, le module élastique G' suit un comportement anormal en loi de puissance. Pour $1 < x < 2$, G' et G'' suivent tout deux une loi de puissance avec le même exposant. Le rapport $\frac{G''(\omega)}{G'(\omega)} \propto \tan((x-1)\frac{\pi}{2})$ est constant et à mesure que l'on s'approche de la transition vitreuse, *i.e* $x \rightarrow 1$, alors $\frac{G''(\omega)}{G'(\omega)} \sim (x-1) \rightarrow 0$. On sent alors que plus on se rapproche de la phase verre, plus les effets élastiques vont prédominer.

Intéressons nous à présent au régime non linéaire de la phase à l'équilibre, *i.e* aux grandes déformations pour $x > x_g$. Un moyen de tester le comportement non linéaire est de pratiquer une expérience à taux de cisaillement constant $\dot{\epsilon} = cte$. Prenons le cas où l'on déforme le matériau lentement ($\dot{\epsilon} \rightarrow 0$). Pour $x > 2$, le système est Newtonien :

$$\sigma = \eta\dot{\epsilon} \quad \text{avec} \quad \eta = \langle \tau \rangle_{eq}. \quad (\text{E.15})$$

Pour $x \in]1; 2[$, le matériau a un comportement de fluide en loi de puissance :

$$\sigma \sim \dot{\epsilon}^{x-1}. \quad (\text{E.16})$$

E.3 $x < 1$:

Examinons maintenant le cas $x < x_g$ pour lequel le matériau est hors d'équilibre et vieillit. Dans ce cas on ne peut théoriquement pas définir de probabilité stationnaire $P_{eq}(E_y)$ (Eq E.7) pour qu'un élément soit dans un puit d'énergie E (on suppose que le système est initialement non déformé et qu'il n'y a pas de frustration, *i.e* $l = 0$ pour tous les éléments). On peut néanmoins introduire une énergie de coupure E_{max} de sorte que $P_{eq}(E_y)$ soit normalisable. On trouve alors que dans le régime linéaire :

$$\begin{cases} G'(\omega) \sim cte, \\ G''(\omega) \sim \omega^{x-1}. \end{cases} \quad (\text{E.17})$$

Pour une expérience à taux de déformation constant (régime non-linéaire), contrainte et taux de déformation sont reliés par l'équation de Herschel-Bulkeley :

$$\sigma = \sigma_0 + B\dot{\epsilon}^{1-x}. \quad (\text{E.18})$$

σ_0 représente une contrainte seuil ($\sigma_0 > 0$). Cela signifie que si l'on veut faire en sorte que le matériau s'écoule, il faut nécessairement appliquer une contrainte telle que $\sigma > \sigma_0$.

Bibliographie

- [Adams, 1989] Adams, R. (1989). Binding of myosin I to membrane lipids. *Nature*, 340 :565–568.
- [Alberts, 1994] Alberts, B. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc.
- [Albrecht-Buehler, 1987] Albrecht-Buehler, G. (1987). Role of cortical tension in fibroblast shape and movement. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 7 :54–67.
- [Albrecht-Buelher, 1980] Albrecht-Buelher, G. (1980). Autonomous movements of cytoplasmic fragments. *Proceedings of National Academy of Science USA*, 77 :6639–6643.
- [Alcaraz, 2003] Alcaraz, J. (2003). Microrheology of human lung epithelial cells measured by atomic force microscopy. *Biophysical Journal*, 84 :2071–2079.
- [Amblard, 1996] Amblard, F. (1996). Subdiffusion and anomalous local viscoelasticity in actin networks. *Physical Review E*, 77 :4470–4473.
- [Balland, 2005] Balland, M. (2005). The dissipative contribution of myosin II in the cytoskeleton dynamics of myoblasts. *European Biophysics Journal*, page à paraître.
- [Bamburg, 1999a] Bamburg, J. (1999a). Proteins of the ADF/cofilin family : essential regulators of actin dynamics. *Annual Review of Cell Developmental Biology*, 15 :185–230.
- [Bamburg, 1999b] Bamburg, J. (1999b). Putting a new twist on actin : ADF/cofilins modulate actin dynamics. *Trends in Cell Biology*, 9 :364–370.
- [Bausch, 1998] Bausch, A. (1998). Local measurements of viscoelastic parameters of adherent cell surfaces by magnetic bead microrheometry. *Biophysical Journal*, 75 :2038–2049.
- [Bausch, 1999] Bausch, A. (1999). Measurements of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers. *Biophysical Journal*, 76 :573–579.
- [Beil, 2003] Beil, M. (2003). Sphingosylphosphorylcholine regulates keratin network architecture and visco-elastic properties of human cancer cells. *Nature Cell Biology*, 5 :803–811.
- [Belmont, 1996] Belmont, L. (1996). Catastrophic revelations about Op18/stathmin. *Trends in Biology Science*, 21 :197–198.
- [Bershadsky, 2003] Bershadsky, A. (2003). Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19 :677–695.
- [Blanchard, 1989] Blanchard, A. (1989). The structure and function of alpha-actinin. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 10 :280–289.
- [Block, 1995] Block, S. (1995). Nanometers and piconewtons : the macromolecules and mechanics of kinesin. *Trends in Cell Biology*, 5 :169–175.
- [Bongrand, 1999] Bongrand, P. (1999). Ligand-receptor interactions. *Reports on Progress in Physics*, 62 :921–968.
- [Bouchaud, 1992] Bouchaud, J. (1992). Weak ergodicity breaking and aging in disordered systems. *Journal de Physique I*, 2 :1705–1713.

- [Bray, 2001] Bray, D. (2001). *Cell Movements*. Garland Publishing Inc.
- [Bubb, 1994] Bubb, M. (1994). Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to f-actin. *The Journal of Biological Chemistry.*, 269 :14869–14871.
- [Canalli, 2004] Canalli, A. (2004). Increased adhesive properties of eosinophils in sickle cell disease. *Exp. Hematol.*, 32 :728–734.
- [Catala, 1995] Catala, F. (1995). A skeletal muscle-specific enhancer regulated by factors binding to E and CArG boxes is present in the promoter of the mouse myosin light-chain 1A gene. *Molecular and Cellular Biology*, 15 :4585–4596.
- [Chambon, 1986] Chambon, F. (1986). Rheology of model polyurethanes at the gel point. *Macromolecules.*, 19 :2146–2149.
- [Chambon, 1987] Chambon, F. (1987). Linear viscoelasticity at the gel point of a crosslinking PDMS with imbalanced stoichiometry. *Journal of Rheology.*, 31 :683–697.
- [Chen, 2003] Chen, C. (2003). Cell shape provides global control of adhesion assembly. *Biochemical and Biophysical research Communications.*, 307 :355–361.
- [Chen, 2004] Chen, C. (2004). Mechanotransduction at cell-matrix and cell-cell contacts. *Annual Review of Biomedical Engineering.*, 6 :275–302.
- [Choquet, 1997] Choquet, D. (1997). Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell.*, 88 :39–48.
- [Coles, 1932] Coles, K. (1932). *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1 :1–9.
- [Colucci-Guyon, 1994] Colucci-Guyon, E. (1994). Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell*, 79 :679–694.
- [Cooke, 1986] Cooke, R. (1986). The mechanism of muscle contraction. *CRC Critical Review of Biochemistry*, 21 :53–118.
- [Cooper, 1987] Cooper, J. (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *Journal of Cell Biology.*, 105 :1473–1478.
- [Couarraze, 2000] Couarraze, G. (2000). *Initiation à la Rhéologie*. Lavoisier Tech. et Doc.
- [Coughlin, 2003] Coughlin, M. (2003). A prestressed cable network model of the adherent cell cytoskeleton. *Biophysical Journal.*, 84 :1328–1336.
- [Crandall, 1970] Crandall, S. (1970). The role of damping in vibration theory. *J. Sound Vib.*, 11 :3–18.
- [Crocker, 2000] Crocker, J. (2000). Two-point microrheology of inhomogeneous soft materials. *Physical Review Letters.*, 85 :888–891.
- [Danowski, 1992] Danowski, B. (1992). Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes. *Journal of Cell Biology*, 118 :1411–1420.
- [de Morales, 2001] de Morales, M. P. (2001). Measurement of cell microrheology by magnetic twisting cytometry with frequency domain demodulation. *Journal of Applied Physiology.*, 91 :1152–1159.
- [Delanoé-Ayari, 2004] Delanoé-Ayari, H. (2004). Membrane and acto-myosin tension promote clustering of adhesion proteins. *Proceedings of the national Academy of Science USA.*, 101 :2229–2234.
- [Doi, 1992] Doi, M. (1992). *The theory of polymer dynamics*. Oxford Science Publications.

-
- [Dong, 1988] Dong, C. (1988). Passive deformation analysis of human leukocytes. *Journal of Biomechanical Engineering.*, 110 :27–36.
- [Dong, 1991] Dong, C. (1991). Cytoplasmic rheology of passive neutrophils. *Biorheology.*, 28 :557–567.
- [Dong, 2003] Dong, C. (2003). Leukocyte deformability : finite element modeling of large viscoelastic deformation. *Journal of Theoretical Biology.*, 158 :173–193.
- [Drechsel, 1992] Drechsel, D. (1992). Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Molecular Biology of the Cell*, 3 :1141–1154.
- [Eckes, 1998] Eckes, B. (1998). Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *Journal of Cell Science.*, 111 :1897–1907.
- [Evans, 1976a] Evans, E. (1976a). Membrane viscoelasticity. *Biophysical Journal*, 16 :1–11.
- [Evans, 1976b] Evans, E. (1976b). Membrane viscoplastic flow. *Biophysical Journal*, 16 :13–26.
- [Evans, 1984] Evans, E. (1984). Static and dynamic rigidities of normal and sickle erythrocytes. *Journal of Clinical Investigations*, 73 :477–488.
- [Evans, 1989] Evans, E. (1989). Apparent viscosity and cortical tension of blood granulocytes determined by micropipet aspiration. *Biophysical Journal*, 56 :151–160.
- [Evans, 2004] Evans, K. (2004). The nuclear envelope lamina network has elasticity and a compressibility limit suggestive of a molecular shock absorber. *Journal of Cell Science*, 117 :4779–4786.
- [Fabry, 2001a] Fabry, B. (2001a). Scaling the microrheology of living cells. *Physical Review Letters.*, 87 :148102 1–4.
- [Fabry, 2001b] Fabry, B. (2001b). Selected contribution : time course and heterogeneity of contractile responses in cultured human airway smooth muscle cells. *Journal of Applied Physiology.*, 91 :964–994.
- [Fabry, 2003a] Fabry, B. (2003a). Remodeling of airway smooth muscle cell : are we built of glass?. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 137 :109–124.
- [Fabry, 2003b] Fabry, B. (2003b). Time scale and other invariants of integrative mechanical behavior in living cells. *Physical Review E.*, 68 :041914 1–17.
- [Farge, 2003] Farge, E. (2003). Mechanical induction of twist in the drosophila foregut/stomodaeal primordium. *Current Biology*, 13 :1365–1377.
- [Felder, 1990] Felder, S. (1990). Mechanics of fibroblast locomotion : quantitative analysis of forces and motions at the leading lamellas of fibroblasts. *Journal of Cell Science.*, 111 :2513–2536.
- [Felsenfeld, 1996] Felsenfeld, D. (1996). Ligand binding regulates the directed movement of $\beta 1$ integrins on fibroblasts. *Nature*, 383 :438–440.
- [Franke, 1982] Franke, W. (1982). Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. III. primary mesenchymal cells and the first appearance of vimentin filaments. *Differentiation.*, 23 :43–59.
- [Franke, 1987] Franke, W. (1987). Rearrangement of vimentin cytoskeleton during adipose conversion : formation of an intermediate filament cage around lipid globules. *Cell.*, 49 :131–141.
- [Freyman, 2001] Freyman, T. (2001). Fibroblast contraction of a collagen-gag matrix. *Biomaterials.*, 22 :2883–2891.

- [Fuchs, 1992] Fuchs, E. (1992). Of mice and men : genetic skin diseases of keratin. *Cell*, 69 :899–902.
- [Fuchs, 1994] Fuchs, E. (1994). Intermediate filaments : structure, dynamics, function and disease. *Annual review of Biochemistry*, 63 :145–182.
- [Fuchs, 1998] Fuchs, E. (1998). A structure scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science*, 279 :514–519.
- [Fung, 1984] Fung, Y. (1984). *Biomechanics : mechanical properties of living tissues*. Springer-Verlag.
- [Furukawa, 1997] Furukawa, R. (1997). The structure, function, and assembly of actin filament bundles. *Int. Review of Cytol.*, 175 :29–90.
- [Galbraith, 2002] Galbraith, C. (2002). The relationship between force and focal complex development. *Journal of Cell Biology.*, 159 :695–705.
- [Gardel, 2003] Gardel, M. (2003). Microrheology of entangled f-actin solutions. *Physical Review Letters.*, 91 :158302 1–4.
- [Gavard, 2003] Gavard, J. (2003). Lamellipodium extension and cadherin adhesion : two cell responses to cadherin activation relying on distinct signalling pathways. *Journal of Cell Science*, 117 :257–270.
- [Giancotti, 1999] Giancotti, F. (1999). Integrin signaling. *Science*, 285 :1028–1032.
- [Giannone, 2004] Giannone, G. (2004). Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves. *Cell.*, 16 :431–443.
- [Gittes, 1993] Gittes, F. (1993). Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *Journal of Cell Biology*, 120 :923–934.
- [Gittes, 1997] Gittes, F. (1997). Microscopic viscoelasticity : shear moduli of soft materials determined from thermal fluctuations. *Physical Review Letters.*, 79 :3286–3289.
- [Gittes, 1998] Gittes, F. (1998). Dynamic shear modulus of a semiflexible polymer networks. *Physical Review E.*, 58 :1241–1244.
- [Glogauer, 1997] Glogauer, M. (1997). Calcium ions and tyrosine phosphorylation interact coordinately with actin to regulate cytoprotective response to stretching. *Journal of Cell Science.*, 110 :11–21.
- [Guck, 2001] Guck, J. (2001). The optical stretcher : a novel laser tool to micromanipulate cells. *Biophysical Journal*, 81 :767–784.
- [Hantos, 1987] Hantos, Z. (1987). Constant-phase modelling of pulmonary tissue impedance. *Eur. Physiopathol. Resp.*, 23 :326–?
- [Hess, 1988] Hess, W. (1988). Dynamical critical behavior during chemical gelation and vulcanization. *Macromolecules.*, 21 :2536–2542.
- [Heymans, 1994] Heymans, N. (1994). Fractal rheological models and fractional differential equations for viscoelastic behavior. *Rheol. Acta.*, 32 :210–219.
- [Hildebrandt, 1970] Hildebrandt, J. (1970). Pressure-volume data of cat lung interpreted by a plastoelastic, linear viscoelastic model. *Journal of Applied Physiology*, 28 :365–372.
- [Hirokawa, 1998] Hirokawa, N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*, 279 :519–526.
- [Hoh, 1994] Hoh, J. (1994). Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy. *Journal of Cell Science.*, 107 :1105–1114.

-
- [Holleran, 1998] Holleran, E. (1998). The role of dynactin complex in intracellular motility. *Int. Rev. Cytol.*, 182 :69–109.
- [Hudspeth, 1997] Hudspeth, A. J. (1997). Mechanical amplification of stimuli by hair cells. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 7 :480–486.
- [Ingber, 2003a] Ingber, D. (2003a). Mechanobiology and diseases of mechanotransduction. *Annals of Medicine.*, 35 :564–577.
- [Ingber, 2003b] Ingber, D. (2003b). Mechanosensation through integrins : cells act locally but think globally. *Proceedings of the National Academy of Science, USA.*, 100 :1472–1474.
- [Ingber, 2003c] Ingber, D. (2003c). Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *Journal of Cell Science.*, 116 :1157–1173.
- [Ingber, 2003d] Ingber, D. (2003d). Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *Journal of Cell Science.*, 116 :1397–1408.
- [Isambert, 1996] Isambert, H. (1996). Dynamics and rheology of actin solutions. *Macromolecules*, 29 :1036–1040.
- [Janmey, 1991a] Janmey, P. (1991a). Mechanical properties of cytoskeletal polymers. *Current Opinion in Cell Biology.*, 2 :4–11.
- [Janmey, 1991b] Janmey, P. (1991b). Viscoelastic properties of vimentin compared with other biopolymer networks. *Journal of Cell Biology*, 113 :155–160.
- [Janmey, 1998] Janmey, P. (1998). The cytoskeleton and cell signaling : component localization and mechanical coupling. *Physiological Reviews*, 78 :763–781.
- [Jay, 1995] Jay, P. (1995). A mechanical function of myosin II in cell motility. *Journal of Cell Science*, 108 :387–393.
- [Kabsch, 1990] Kabsch, W. (1990). Atomic structure of the actin : DNase i complex. *Nature*, 347 :44–53.
- [Kaibuchi, 1999] Kaibuchi, K. (1999). Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annual Review of Biochemistry*, 68 :459–486.
- [Kan, 1999] Kan, H. (1999). Effects of nucleus on leukocyte recovery. *Annals of Biomedical Engineering.*, 27 :648–655.
- [Katz, 2000] Katz, B. (2000). Physical states of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Molecular Biology of the Cell.*, 11 :1047–1060.
- [Kennedy, 2003] Kennedy, H. (2003). Fast adaptation of mechano-electrical transducer channels in mammalian cochlear hair cells. *Nature Neuroscience.*, 6 :832–836.
- [Kerts, 1990] Kerts, A. (1990). Liquid crystal and thixotropy of filamentous actin solutions. *Proceedings of the national Academy of Science USA.*, 87 :4241–4245.
- [Kolmogorov, 1962] Kolmogorov, A. (1962). A refinement of previous hypotheses concerning the local structure of turbulence in a viscous incompressible fluid at high reynolds number. *Journal of Fluid Mechanics.*, 13 :82–85.
- [Koster, 2004] Koster, J. (2004). Role of binding of plectin to the integrin $\beta 4$ subunit in the assembly of hemidesmosomes. *Molecular Biology of the Cell.*, 15 :1211–1223.
- [Ladoux, 2001] Ladoux, B. (2001). Direct imaging of single-molecules : from dynamics of a single DNA chain to study the complex DNA-protein interactions. *Science programm*, 84 :267–290.

- [Lambert, 2000] Lambert, M. (2000). Immobilized dimers of N-cadherin-Fc chimera mimic cadherin-mediated cell contact formation : Contribution of both inside-out and outside in signals. *Journal of Cell Science*, 113 :2207–2219.
- [Lappalainen, 1997] Lappalainen, P. (1997). Cofilin promotes rapid actin filament turnover *in vivo*. *Nature*, 388 :78–82.
- [Lau, 2003] Lau, A. (2003). Microrheology, stress fluctuations, and active behavior of living cells. *Physical Review Letters*, 91 :198101 1–4.
- [Lawler, 1998] Lawler, S. (1998). Microtubule dynamics : if you need a shrink try stathmin/Op18. *Current Biology*, 8 :212–214.
- [LeGoff, 2002] LeGoff, L. (2002). Motor-driven dynamics in actin-myosin networks. *Physical Review Letters*, 88 :018101 1–4.
- [Lincoln, 2004] Lincoln, B. (2004). deformability-based flow cytometry. *Cytometry Part A*, 59 :203–209.
- [Lo, 1998a] Lo, C. (1998a). Electrically measuring viscoelastic parameters of adherent cell layers under controlled magnetic forces. *European Biophysical Journal*, 28 :112–118.
- [Lo, 1998b] Lo, C. (1998b). Impedance analysis of fibroblastic cell layers measured by electric cell-substrate impedance sensing. *Physical review Letters*, 57 :6982–6987.
- [Lo, 2000] Lo, C. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical Journal*, 79 :144–152.
- [Lodish, 2000] Lodish, H. (2000). *Molecular Cell Biology, 4th Ed.* W.H. Freeman and Company, NY.
- [Machesky, 1996] Machesky, L. (1996). Rho : a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton. *Trends in Cell Biology*, 6 :304–310.
- [Maggs, 1998] Maggs, A. (1998). Micro-bead mechanics with actin filaments. *Physical Review E*, 57 :2091–2094.
- [Mahaffy, 2004a] Mahaffy, R. (2004a). Quantitative analysis of the viscoelastic properties of thin regions of fibroblasts using atomic force microscopy. *Biophysical Journal*, 86 :1777–1793.
- [Mahaffy, 2004b] Mahaffy, R. (2004b). Scanning probe-based frequency-dependent microrheology of polymer gels and biological cells. *Physical Review Letter*, 85 :880–883.
- [Maksym, 2000] Maksym, B. (2000). Mechanical properties of cultured human airway smooth muscle cells from 0.05 to 0.4 hz. *Journal of Applied Physiology*, 89 :1619–1632.
- [Maniotis, 1997] Maniotis, A. (1997). Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 94 :849–854.
- [Maples, 1997] Maples, C. (1997). Both microtubules and actin filaments are required for efficient postendocytotic traffic of the polymeric immunoglobulin receptor in polarized madin-darby canine kidney cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 :6741–6751.
- [Matsudaira, 1991] Matsudaira, P. (1991). Modular organization of actin crosslinking proteins. *Trends in Biochemical Science*, 16 :87–92.
- [Milligan, 1990] Milligan, R. (1990). Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites. *Nature*, 348 :217–221.
- [Milner, 2004] Milner, D. (2004). Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *The Journal of Cell Biology*, 134 :1255–1270.

-
- [Mitchison, 1984] Mitchison, T. (1984). Microtubule assembly nucleated by isolated centrosome. *Nature*, 312 :232–237.
- [Mitchison, 1992] Mitchison, T. (1992). Compare and contrast actin filaments and microtubules. *Molecular Biology of the Cell*, 3 :1309–1315.
- [Mogensen, 1998] Mogensen, M. (1998). Keratin filament deployment and cytoskeletal networking in a sensory epithelium that vibrates during hearing. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 41 :138–153.
- [Moir, 2000] Moir, R. (2000). Disruption of nuclear lamin organization blocks the elongation phase of DNA replication. *Journal of Cell Biology*, 149 :1179–1192.
- [Monthus, 1996] Monthus, C. (1996). Models of traps and glass phenomenology. *Journal of Physics A.*, 29 :3847–3869.
- [Morse, 1998a] Morse, D. (1998a). Viscoelasticity of concentrated isotropic solutions of semi-flexible polymers. 1.model and stress tensor. *Macromolecules.*, 31 :7030–7043.
- [Morse, 1998b] Morse, D. (1998b). Viscoelasticity of concentrated isotropic solutions of semi-flexible polymers. 2.linear response. *Macromolecules.*, 31 :7044–7067.
- [Needham, 1992] Needham, D. (1992). A sensitive measure of surface stress in resting neutrophils. *Biophysical Journal.*, 61 :1664–1670.
- [Nicolas, 2004] Nicolas, A. (2004). Cell mechanosensitivity controls the anisotropy of focal adhesions. *Proceedings of the National Academy of Science USA.*, 101 :12520–12525.
- [Olive-Plana, 2003] Olive-Plana, M. (2003). Myofibrillar myopathies. *Revista de Neurologica*, 37 :770–772.
- [Ott, 1993] Ott, A. (1993). Measurements of the persistence length of polymerized actin using fluorescence microscopy. *Physical Review E.*, 48 :1642–1643.
- [Peslin, 1990] Peslin, R. (1990). Stress adaptation and low-frequency impedance of rat lungs. *Journal of Applied Physiology.*, 69 :1080–1086.
- [Petersen, 1982] Petersen, N. (1982). Dependence of locally measured cellular deformability on position on the cell temperature, and cytochalasin b. *Proceedings of the national Academy of Science USA.*, 79 :5237–5331.
- [Pollard, 1982] Pollard, T. (1982). Mechanism of actin polymerization. *Trends in Biochemical Science.*, 7 :55–58.
- [Pollard, 1986] Pollard, T. (1986). Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *Journal of Cell Biology*, 103 :2747–2754.
- [Pollard, 2000] Pollard, T. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in non muscle cells. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure.*, 29 :545–576.
- [Pourati, 1998] Pourati, J. (1998). Is cytoskeletal tension a major determinant of cell deformability in adherent endothelial cells? *AJP, Cell Physiology.*, 274 :C1283–C1289.
- [Prahlad, 1998] Prahlad, V. (1998). Rapid movements of vimentin on microtubule tracks : kinesin-dependent assembly of intermediate filament networks. *Journal of Cell Biology*, 143 :159–170.
- [Radmacher, 1992] Radmacher, M. (1992). From molecules to cells : imaging soft samples with the atomic force microscope. *Science.*, 257 :1900–1905.
- [Rafelski, 2004] Rafelski, S. (2004). Crawling toward a unified model of cell motility : spatial and temporal regulation of actin dynamics. *Annual Review of Biochemistry.*, 73 :209–239.

- [Reznikoff, 1973] Reznikoff, C. (1973). Establishment and characterisation of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. *Cancer Research*, 33 :3231–3238.
- [Riveline, 2001] Riveline, D. (2001). Focal contacts as mechanosensors : externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDial-dependent and ROCK-independent mechanism. *Journal of Cell Biology*, 153 :1175–1185.
- [Rodionov, 1997] Rodionov, V. (1997). Microtubule treadmilling *in vivo*. *Science*, 275 :70–73.
- [Safer, 1994] Safer, D. (1994). Beta thymosins as actin binding peptides. *Bioessay*, 16 :473–479.
- [Sato, 1987] Sato, M. (1987). Micropipett aspiration of cultured bovine aortic endothelial cells exposed to shear stress. *Arteriosclerosis*, 7 :276–286.
- [Schiessel, 1993] Schiessel, H. (1993). Hierarchical analogues to fractional relaxation equations. *Journal of Physics A : Math. Gen.*, 26 :5057–5069.
- [Schiessel, 1994] Schiessel, H. (1994). Dynamics in disordered systems. *Progr. Colloid Polym. Sci.*, 96 :15–21.
- [Schiessel, 1995a] Schiessel, H. (1995a). Generalized viscoelastic models : their fractionnal equations with solutions. *Journal of Physics A : Math. Gen.*, 28 :6567–6584.
- [Schiessel, 1995b] Schiessel, H. (1995b). Mesoscopic pictures of the sol-gel transition : ladder models and fractal networks. *Macromolecules*, 28 :4013–4019.
- [Schmid-Schonbein, 1981] Schmid-Schonbein, G. (1981). Passive mechanical properties of human leukocytes. *Biophysical Journal*, 36 :243–256.
- [Schmidt, 1989] Schmidt, F. (1989). Chain dynamics, mesh size and diffusive transport in networks of polymerized actin : a quasielastic light scattering and microfluorescence study. *Macromolecules*, 22 :3638–3649.
- [Schmidt, 2000] Schmidt, F. (2000). Microrheometry underestimates the values of the viscoelastic moduli in measurements on f-actin solutions compared to macrorheometry. *Physical Review E*, 61 :5646–5653.
- [Shafer, 2003] Shafer, D. (2003). Actin puts on the squeeze. *Nature Cell Biology*, 5 :693–694.
- [Shroff, 1995] Shroff, S. (1995). Dynamic micromechanical properties of cultured rat atrial myocytes measured by atomic force microscopy. *AJP-Cell Physiology*, 269 :C286–292.
- [Singer, 1959] Singer, C. (1959). *A Short History of Scientific Ideas to 1900*. Oxford University Press.
- [Smilenov, 1999] Smilenov, L. (1999). Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts. *Science*, 286 :1172–1177.
- [Sollich, 1997] Sollich, P. (1997). Rheology of soft glassy materials. *Physical Review Letters*, 78 :2020–2023.
- [Stamenovic, 1999] Stamenovic, D. (1999). The role of prestress and architecture of the cytoskeleton and deformability of cytoskeletal filaments in mechanics of adherent cells : a quantitative analysis. *Journal of Theoretical Biology*, 201 :63–74.
- [Stewart, 1993] Stewart, M. (1993). Intermediate filaments structure and assembly. *Current Opinion in Cell Biology*, 5 :3–11.
- [Suki, 1994] Suki, B. (1994). Lung tissue viscoelasticity : a mathematical framework and its molecular basis. *Journal of Applied Physiology*, 76 :2749–2759.

-
- [Svitkina, 1997] Svitkina, T. (1997). Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes : mechanism of cell body translocation. *Journal of Cell Biology*, 139 :397–415.
- [Tamada, 2004] Tamada, M. (2004). Activation of a signaling cascade by cytoskeleton stretch. *Developmental Cell*, 7 :709–718.
- [Tay, 1991] Tay, R. T. S. (1991). Time-dependent recovery of passive neutrophils after large deformation. *Biophysical Journal*, 60 :856–866.
- [Tempel, 1996] Tempel, M. (1996). Temperature-induced sol-gel transition and microgel formation in α -actinin cross-linked actin networks : A rheological study. *Physical Review E*, 54 :1802–1810.
- [Thoumine, 1997] Thoumine, O. (1997). Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation. *Journal of Cell Science*, 110 :2109–2116.
- [Thoumine, 1999] Thoumine, O. (1999). Changes in the mechanical properties of fibroblasts during spreading : a micromanipulation study. *European Biophysical Journal*, 28 :222–234.
- [Tilney, 1982] Tilney, L. (1982). The acrosomal reaction of *thyone* sperm. the kinetics and possible mechanism of acrosomal process elongation. *Journal of Cell Biology*, 93 :820–827.
- [Titus, 1997] Titus, M. (1997). Myosin V : the multi-purpose transport motor. *Current Biology*, 7 :301–304.
- [Tsai, 1993] Tsai, M. (1993). Passive mechanical behavior of human neutrophils : power law fluid. *Biophysical Journal*, 65 :2078–2088.
- [Tseng, 2001] Tseng, Y. (2001). Mechanics and multiple-particle tracking microheterogeneity of α -actinin-cross-linked actin filament networks. *Biophysical Journal*, 81 :1643–1656.
- [Tseng, 2002] Tseng, Y. (2002). Micromechanical mapping of live cells by multiple-particle-tracking microrheology. *Biophysical Journal*, 83 :3162–3176.
- [Uhde,] Uhde, J. Internal motility in stiffening actin-myosin networks. *Submitted to Physical review Letters*.
- [Vale, 1985] Vale, R. (1985). Identification of a novel force generating protein (kinesin) involved in microtubule-based motility. *Cell*, 41 :39–50.
- [Vereb, 2003] Vereb, G. (2003). Dynamic, yet structured : The cell membrane three decades after the singer-nicolson model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 :8053–8058.
- [Wade, 1998] Wade, R. (1998). Organization and structure of microtubules and microtubule-motor protein complexes. *European Biophysics Journal*, 27 :446–454.
- [Walker, 1988] Walker, R. (1988). Dynamic instability of individual microtubule analyzed by video light microscopy : rate constants and transition probabilities. *Journal of Cell Biology*, 107 :1437–1448.
- [Wang, 1993] Wang, N. (1993). Mecanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, 260 :1124–1127.
- [Wang, 2000] Wang, N. (2000). Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stiffening, and growth. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 279 :C188–C194.
- [Warlus, 2003] Warlus, S. (2003). Dynamic viscoelastic properties of silica alkoxide during the sol-gel transition. *European Physical Journal E*, 12 :275–282.
- [Way, 1993] Way, M. (1993). The secrets of severing? *Current Biology*, 3 :887–890.

- [Weiner, 1999] Weiner, O. (1999). Spatial control of actin polymerization of during neutrophil chemotaxis. *Nature Cell Biology.*, 1 :75–81.
- [Weissenhorn, 1993] Weissenhorn, A. (1993). Determination and height anomaly of soft surfaces studied with the afm. *Nanotechnology.*, 4 :106–113.
- [Welch, 1998] Welch, M. (1998). Interaction of the human Arp2/3 complex and the *listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science*, 281 :105–108.
- [Wiche, 1998] Wiche, G. (1998). Role of plectin in cytoskeletal organization and dynamics. *Journal of Cell Science*, 111 :1998.
- [Wilhelm, 2003] Wilhelm, C. (2003). Rotational magnetic endosome microrheology : viscoelastic architecture inside living cells. *Physical Review E.*, 67 :061908 1–12.
- [Winter, 1986] Winter, H. (1986). Analysis of linear viscoelasticity of a crosslinking polymer at the gel point. *Journal of Rheology.*, 30 :367–382.
- [Winter, 1991] Winter, H. (1991). Polymer gels, materials that combine liquid and solid properties. *Material Research Society Bulletin.*, 16 :44–48.
- [Wu, 1998] Wu, H. (1998). Mechanical properties of L929 cells measured by atomic force microscopy : effects of anticytoskeletal drugs and membrane crosslinking. *Scanning.*, 20 :389–397.
- [Xue, 1998] Xue, J. (1998). Dynamic cross-linking by α -actinin determines the mechanical properties of actin filament networks. *Journal of Biology and Chemistry.*, 273 :9570–9576.
- [Yamada, 2000] Yamada, S. (2000). Mechanics of living cells measured by laser tracking microrheology. *Biophysical Journal.*, 78 :1736–1747.
- [Yang, 1996] Yang, Y. (1996). An essential cytoskeletal linker protein connecting actin microfilaments to intermediate filaments. *Cell*, 865 :655–665.
- [Yang, 2000] Yang, Y. (2000). Stretch-induced alternative splicing of serum response factor promotes bronchial myogenesis and is defective in lung hypoplasia. *The Journal of Clinical Investigation.*, 106 :1321–1330.
- [Yeung, 1989] Yeung, A. (1989). Cortical shell-liquid core model for passive flow of liquid-like spherical cells into micropipets. *Biophysical Journal*, 56 :139–149.
- [Yin, 2004] Yin, T. (2004). Regulation of desmosome assembly and adhesion. *Seminars in Cell and Developmental Biology.*, 15 :665–677.
- [Zahalak, 1990] Zahalak, G. (1990). Determination of cellular mechanical properties by cell poking, with an application to leukocyte. *Journal of Biomechanical Engineering.*, 112 :283–294.
- [Zamir, 2000] Zamir, E. (2000). Dynamic and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nature Cell Biology.*, 2 :191–196.
- [Zhelev, 1994] Zhelev, D. (1994). Role of the membrane cortex in neutrophil deformation in small pipets. *Biophysical Journal.*, 67 :696–705.
- [Zheng, 1995] Zheng, Y. (1995). Nucleation of microtubule assembly by a γ -tubulin-containing ring complex. *Nature*, 378 :578–583.
- [Zhu, 2000] Zhu, C. (2000). Cell mechanics : mechanical response, cell adhesion, and molecular deformation. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 02 :189–226.

Résumé

De l'épigénétique (méthylation de l'ADN) à la mécanotransduction, il y a un nombre croissant de preuves que les propriétés mécaniques jouent un rôle essentiel dans le développement et la survie des organismes. Pour sonder les propriétés mécaniques d'une cellule vivante, nous avons mis au point un véritable rhéomètre à cellule unique. Ainsi avons-nous pu montrer, pour la première fois à l'échelle de la cellule entière, que la fonction de fluage suivait une loi de puissance fonction du temps ($J(t) = At^\alpha$) pour tous les types cellulaires sollicités. L'exposant est distribué normalement autour de 0,25. Le préfacteur est, pour sa part, distribué de manière log-normale. Ayant déterminé le régime linéaire, nous avons pu comparer nos résultats de fluage aux mesures de rhéologie dynamique (magnétocytométrie, AFM). Nous avons ainsi confirmé, qualitativement et quantitativement, les résultats obtenus par des techniques où la sollicitation est locale et oscillante. Par ailleurs, en vue d'identifier la contribution des éléments du cytosquelette à la réponse mécanique d'une cellule, nous avons réalisé des mesures sur des fibroblastes n'exprimant pas la vimentine et sur des fibroblastes sauvages. Il a été mis en évidence que la vimentine n'avait pas d'incidence sur la forme de la fonction de fluage mais qu'elle était nécessaire au maintien de l'intégrité mécanique à grande déformation. Enfin nous avons pu mesurer la force exercée par une cellule lorsqu'elle s'étale entre les deux lamelles de verres. Des résultats préliminaires semblent indiquer que les myoblastes sont capables d'adapter leur force à la raideur des lamelles.

Mots-clés: rhéologie cellulaire, fonction de fluage, microplaques, myoblaste, vimentine.

Abstract

From epigenetics to mechanotransduction, there is increasing evidence that mechanical properties play a central role in the development and the survival of organisms. To determine the mechanical properties of isolated living cells, we built a single cell rheometer. Individual cells, of various types, were strained under constant stress (creep experiment). Their creep function always scaled with a power law of time ($J(t) = At^\alpha$). The exponent gave a normal distribution around 0.25, whereas the distribution of the prefactor was log-normal. As the mechanical response was linear, we could compare our creep parameters to those observed previously by dynamical rheology (magnetocytometry, AFM). Thus we confirmed, qualitatively as well as quantitatively, results obtained with local and oscillating perturbations. In order to identify the contribution of cytoskeletal elements to the mechanical properties, we compared wild-type and vimentin-deficient fibroblasts. We found that vimentin had no effect on the form of the creep function, but was necessary to maintain mechanical integrity at high strain. In addition, we measured the force generated by a cell upon spreading between two glass microplates. Preliminary results indicated that myoblasts adapted the force they applied to the stiffness of the microplates.

Keywords: cell rheology, creep function, microplates, myoblast, vimentin.

