Nucléation et croissance de contacts entre cellules biologiques

Hélène Delanoë-Ayari

▶ **To cite this version:**

Hélène Delanoë-Ayari. Nucléation et croissance de contacts entre cellules biologiques. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2003. Français. NNT : . tel-00006847

HAL Id: tel-00006847
https://theses.hal.science/tel-00006847

Submitted on 9 Sep 2004

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.

THESE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Joseph Fourier
Grenoble I

Discipline : Physique

présentée et soutenue publiquement
par :

Hélène DELANOË-AYARI

le 7 octobre 2003

Nucléation et croissance de contacts entre cellules biologiques.

Composition du jury :

Pierre Bongrand (Rapporteur)
Bertrand Fourcade (Examinateur)
François Gallet (Examinateur)
Daniel Riveline (Directeur de thèse)
Olivier Thoumine (Rapporteur)
Marcel Vallade (Directeur de thèse)

Thèse préparée au Laboratoire de Spectrométrie Physique
CNRS - GRENOBLE

Remerciements

Tout d'abord je tiens à adresser mes vifs remerciements à :

- Bertrand Fourcade d'avoir eu la gentillesse de présider mon jury, je le remercie aussi pour ses derniers conseils théoriques.
- Olivier Thoumine et Pierre Bongrand d'avoir accepté d'assumer la tache de rapporteur et d'avoir lu dans les détails mon manuscript malgré le peu de temps que je leur avais laissé. Je les remercie également pour l'éclairage personnel qu'ils ont apporté sur mes travaux de thèse.
- François Gallet d'être venu voir le chemin parcouru par son ancienne élève. Je le remercie aussi pour ses remarques et commentaires intéressants.

Je veux remercier ici aussi très sincèrement mes deux directeurs de thèse. Merci à Marcel Vallade d'avoir prêté attention à mes travaux et à leurs avancées tout au long de cette thèse. Je voudrais aussi le remercier pour son regard critique constructif et sa disponibilité. Cette thèse doit évidemment énormément à Daniel Riveline. Il m'a appris au quotidien le métier de chercheur Il m'a aussi appris le doute et la confrontation des idées, en me poussant dans mes derniers retranchements pour discuter jusqu'au bout la pertinence d'une expérience. Merci pour tout ce temps qu'il m'a consacré. Je le remercie aussi pour son enthousiasme, sa volonté et son écoute.

Je remercie aussi vivement tous nos collaborateurs

- Peter Lenz et J.F. Joanny pour leur contribution théorique à ce travail expérimental. J'ai beaucoup appris par les échanges, que nous avons eus, sur l'assemblage des jonctions adhérentes. Cela m'a souvent amené à me poser de nouvelles questions, à envisager de nouvelles expériences et donc à avancer.
- A. Bershadsky et toute son équipe pour m'avoir accueillie un mois au Weizmann Institute en Israël. J'ai beaucoup apprécié les interactions scientifiques stimulantes que j'ai pu y avoir.
- tout le groupe de D. Gulino à l'IBS. Qu'aurais-je fait sans eux ? sans VE cadhérine ? Je voudrais les remercier pour leur gentillesse et pour toutes les discussions intéressantes que nous avons eu lors des réunions IPMC et autres.

Je voudrais bien sûr remercier le célèbre Dédé pour tous ces coups de main, conseils et astuces, sans lesquels je n'aurais sans doute pas fini ma thèse dans les temps. Je lui souhaite une merveilleuse retraite. Je remercie aussi Patrice Ballet, Jean-Louis Cheval,

Bernard Faure, le personnel de l'atelier, le service informatique, le secrétariat et tous ceux qui ont contribué à faire avancer cette thèse d'une manière ou d'une autre.

Qu'aurait été le quotidien du labo sans ce peuple des thésards, qui au jour le jour met une ambiance amicale et chaleureuse ? Je penserai, je crois avec nostalgie, aux Etats-Unis, à tous ces gâteaux maisons que nous avons partagés... Merci à Fabien, Sébastiens, Benjamin, Malika, Cyril, Pascale, Maude, Juliens, Marguerite et tous les autres.

Cette merveilleuse ambiance doit aussi beaucoup, bien sûr, à toute l'équipe BOM et à ses jeunes permanents toujours de bonne humeur et toujours prêts à vous aider, vous conseiller, ou vous préparer vos pots de thèse !

Je tiens à décerner une mention spéciale à Sébastien pour m'avoir supporté pendant deux ans dans son bureau. Il m'a beaucoup appris en matière d'informatique et de sécurité !

Julien a pris le relais, et a du lui aussi s'accommodé de mes sautes d'humeur (en particulier, quand l'onde évanescente se déréglait pour la nième fois !). Merci pour sa patience. Il a beaucoup contribué à ce que ces derniers mois passés seule loin de mon Anthony passent finalement très vite. Merci pour ses multiples invitations à me sortir du labo et à me détendre.

Merci aussi à toute sa bande de copains qui m'a accueillie pour ces diverses sorties et tout particulièrement à son coloc Paul, qui a accepté que je vienne envahir leur appartement pendant presque trois semaines lors de ma soutenance...

Je voudrais aussi remercier ma famille, et tout particulièrement mes parents, qui m'ont permis d'arriver ici aujourd'hui.

Enfin, je ne peux terminer ces pages sans parler de celui qui a sans doute le plus contribuer à l'aboutissement de cette thèse : mon mari. Merci d'avoir supporté ma mauvaise humeur lorsque je rentrais fatiguée du travail, de m'avoir préparé mes repas, bordée, consolée. Merci de m'avoir toujours poussée vers le haut. Et merci pour tous ces merveilleux moments passés ici à Grenoble, et dans ses montagnes.

Table des Matières

Remerciements i

Préambule 1

1 Introduction générale 5

1.1 Nucléation et croissance 6

1.1.1 Nucléation et croissance en matière condensée. 6

1.1.2 Nucléation et croissance dans une cellule. 7

1.1.3 Horloges cellulaires. 9

1.1.3.1 "Treadmilling" de l'actine. 10

1.1.3.2 Diffusion des protéines d'adhésion. 12

1.1.3.3 Mouvement moteur et microtubule 13

1.1.3.4 Cinétique de liaison ligand-récepteur 13

1.1.3.5 Conclusion 14

1.2 Aspects biologiques de l'adhésion 14

1.2.1 Différents types d'adhésion. 14

1.2.2 Contacts focaux et intégrines. 16

1.2.3 Jonctions adhérentes et cadhérines 19

1.2.3.1 Une superfamille de glycoprotéines. 19

1.2.3.2 Structure des cadhérines des Chordés. 20

1.2.3.3 Complexe cytoplasmique et régulation de l'adhésion. . . . 21

1.2.3.4 Dynamique. 25

1.2.4 Conclusion. 26

1.3 Physique de l'adhésion. 27

1.3.1 Etude théorique. 27

1.3.1.1 Adhésion entre deux membranes. 28

1.3.1.2 Modèle de Bell-Dembo-Bongrand. 30

1.3.1.3 Attraction entre les protéines due à la répulsion de deux membranes. 32

1.3.1.4 Ajout d'une interaction via la membrane dans le modèle de Bell-Dembo-Bongrand. 34
1.3.1.5 Autre modèle proposé par le groupe de Lipowsky. 36
1.3.2 Etudes expérimentales. 38
1.3.2.1 Mesures de paramètres moléculaires et cellulaires d'adhésion. 38
1.3.2.2 Suivi des motifs d'adhésion sur système modèle. 40
1.3.3 Conclusion. 41

2 APPROCHES EXPÉRIMENTALES 43

2.1 Les cellules. 43
2.1.1 Types cellulaires. 43
2.1.2 Entretien des cellules. 44
2.1.3 Congélation et décongélation des cellules 44
2.1.3.1 Congélation. 44
2.1.3.2 Décongélation. 44
2.1.4 Transfection. 44
2.1.4.1 Vecteurs : fusions. 45
2.1.4.2 Protocole de transfection transitoire pour une boîte de Pétri de 2 ml. 45
2.1.5 Transfections stables, clonage. 46
2.1.5.1 Protocole. 46
2.1.5.2 Résultats. 47
2.1.6 Fixation et Immunofluorescence. 48
2.2 Réactifs. 48
2.2.1 Choc hypotonique. 49
2.2.2 Autres réactifs. 49
2.3 Surfaces 51
2.3.1 Surfaces de cadhérines. 51
2.3.1.1 VE cad1-4 his 51
2.3.1.2 Préparation. 52
2.3.1.3 Quantification de la densité de fluorescence des surfaces de cadhérines. 53
2.3.1.4 Resuspension des cellules. 54
2.3.2 Autres surfaces. 55
2.3.2.1 Polylysine. 55

2.3.2.2 Fibronectine. 55
2.3.2.3 Protéines de la matrice extracellulaire : PMEC 55
2.3.2.4 Conclusion. 56
2.3.3 Application de forces. 56
2.3.3.1 Flux. 56
2.3.3.2 Traction par pipettes. 56
2.4 Montages optiques. 57
2.4.1 Matériel. 57
2.4.2 Résolution. 58
2.4.3 Microscopie par ondes évanescentes. 58
2.4.4 Récupération de fluorescence après photoblanchiment 59
2.4.4.1 Méthode 59
2.4.4.2 Analyse 61
2.5 Mesures. 61
2.5.1 Problèmes liés aux mesures 3D. 61
2.5.2 Avantage de notre système cellulaire. 63
2.5.3 Mesures d'intensité. 64
2.5.4 Mesures d'aire. 66
2.5.5 Statistiques. 66

3 Nucléation et Croissance 67

3.1 La VE GFP et la VE tr GFP : des constructions fonctionnelles. 67
3.2 Morphologie des contacts. 67
3.3 *Doigts*. 70
3.3.1 Rôle des faisceaux d'actine. 70
3.3.1.1 VE tr et *doigts* 70
3.3.1.2 L'actine piège les cadhérines. 71
3.3.2 Longueurs et distances entre *doigts*. 73
3.3.3 Modélisation des *doigts*. 74
3.3.3.1 Force exercée par les filaments d'actine. 74
3.3.3.2 Rayon des *doigts* et force critique f_c. 75
3.3.3.3 Tension membranaire. 76
3.3.3.4 Longueur des *doigts*. 77
3.3.4 Contractilité ? 78
3.4 *Lignes*. 82

3.5 Dynamique. 83
3.5.1 Croissance de doigts et de lignes. 83
3.5.2 Dynamique de formation des doigts. 84
3.5.3 Dynamique de croissance des lignes. 87
3.6 Conclusion 87

4 MEMBRANE ET CONTRACTILITÉ ACTO-MYOSINE 89
4.1 Introduction 89
4.2 Greffage de Cadhérines : état de l'art. 89
4.3 Notre greffage : résultats 92
4.3.1 Temps courts : de 0 à 3 h après resuspension. 92
4.3.1.1 Effet de la densité de cadhérines en surface. 92
4.3.1.2 Motifs de cadhérines. 94
4.3.2 Temps longs : temps supérieurs à 5 h. 96
4.3.2.1 Description des motifs et comparaison avec les contacts focaux. 96
4.3.2.2 Apparition des motifs et disparition des contacts focaux. . 97
4.3.2.3 De véritables motifs. 99
4.4 Rôle de l'actine. 99
4.5 Force. 101
4.6 Contractilité acto-myosine. 102
4.7 Augmentation de la tension de membrane. 103
4.8 Discussion 103

SYNTHÈSE ET CONCLUSION 109

ANNEXE 113
A.1 Abréviations 113
A.2 Liste des produits chimiques et biologiques, leur provenance et leur abréviation. 113
A.3 Appareils. 115
A.4 Liste des anticorps et marqueurs fluorescents. 116
A.4.1 Anticorps primaires. 116
A.4.2 Anticorps secondaires. 117
A.4.3 Autres marqueurs. 118
A.5 Valeurs des paramètres physiques cellulaires. 119
A.6 Autres protocoles 120

A.6.1 Préparation du milieu de culture. 120
A.6.2 PDMS 120
A.6.3 Fixation et marquage pour visualiser les microtubules et l'actine sur les mêmes cellules. 120
A.6.4 Préparation du Mowiol 121
A.6.5 Préparation PFA 3 % 122

Bibliographie **123**

Liste des Figures

1 Deux géométries pour l'étude des contacts cellule-cellule. 3

1.1 Diffusion des cadhérines. 9
1.2 Images de microscopie électronique d'une cellule montrant le phénomène de "ruffling". 10
1.3 Images de microscopie électronique de lamellipodes et filopodes. 11
1.4 Schéma du "treadmilling" de l'actine. 12
1.5 Différents types d'adhésion. 16
1.6 Composition protéique des contacts focaux. 17
1.7 Contacts focaux et fibres de tension. 17
1.8 Croissance d'un contact focal soumis à une force de traction. 19
1.9 Différents types de cadhérines 20
1.10 Structure des cadhérines classiques de type I. 22
1.11 Hexamères de cadhérines. 22
1.12 Complexe cytoplasmique lié à la cadhérine. 23
1.13 Rôle de Rac et Cdc42 sur la stabilisation des jonctions. 24
1.14 Description de la dynamique de formation des jonctions adhérentes par Adams *et al.* (1998) 26
1.15 Description de la dynamique de formation des jonctions adhérentes par Vasioukhin *et al.* (2000) 27
1.16 Modèle DLVO d'interaction entre deux surfaces amphiphiles. 29
1.17 Forces stériques de répulsion entre membranes. 29
1.18 Schéma du modèle de Bell-Dembo-Bongrand. 31
1.19 Effet de l'insertion de protéines dans une membrane. 33
1.20 Modèle proposé par Braun *et al.* (1984) pour l'attraction entre protéines d'adhésion. 33
1.21 Diagramme de phase obtenu par Zuckerman & Bruinsma (1998). 36

2.1 VE cadhérine GFP et VE tr cadhérine GFP 46
2.2 Densité de cadhérines en surface. 53

2.3 Montage optique pour l'observation en ondes évanescentes. 60
2.4 Comparaison d'images en épifluorescence et en ondes évanescentes. 61
2.5 Trajet optique du FRAP 62
2.6 Schéma des contacts VE cadhérine. 64
2.7 Correction du photoblanchiment. 65

3.1 La cadhérine VE GFP forme de vraies jonctions. 68
3.2 La cadhérine VE GFP tr ne colocalise pas avec la β-caténine. 69
3.3 Morphologie des contacts : des *lignes* et des *doigts*. 70
3.4 Recrutement de cadhérines lors de la projection de *doigts*. 71
3.5 Expérience de photoblanchiment sur des *doigts*. 72
3.6 Distance entre *doigts*. 73
3.7 Longueur des *doigts*. 74
3.8 Schéma montrant comment un doigt peut polymériser et pousser la membrane. 75
3.9 Caldesmone et *doigts*. 79
3.10 BDM et CHO VE. 79
3.11 Le nocodazole provoque l'allongement des *doigts*. 80
3.12 H7 provoque la disparition des *doigts*. 81
3.13 Différentes voies de signalisation activées par rho. 82
3.14 Caractéristiques de l'intensité de fluorescence le long des *lignes* 83
3.15 Séquence d'images de phase d'une expérience en latrunculine A. 84
3.16 Formation de *doigts* après lavage de la latrunculine A. 84
3.17 Formation de *lignes* après lavage de la latrunculine A. 85
3.18 Dynamique de croissance des contacts cellule-cellule. 86

4.1 Nombre de cellules sur les surfaces de cadhérines en fonction de la densité. 93
4.2 Force d'adhésion des cellules en fonction de la densité de cadhérines en surface. 94
4.3 Formation de tubes sur les surfaces de cadhérines. 95
4.4 Mouvement directionnel de vésicules. 95
4.5 Comparaison des motifs sur surface de cadhérines et de PMEC. 97
4.6 Formation de tubes sur les surfaces de cadhérines. 98
4.7 Formation des motifs de cadhérines. 98
4.8 Motifs de VE tr cadhérines GFP 100
4.9 Motifs et latrunculine. 100
4.10 Croissance de contacts "cadhérines" sur une surfaces de cadhérines, et de contacts "vinculines" sur une surface de PMEC après application d'une force. 101

4.11 Croissance d'un motif de cadhérine GFP sur une surface de cadhérine. . . . 102
4.12 Rôle de la contractilité acto-myosine sur les surfaces de cadhérines et de PMEC. 103
4.13 Rôle de la tension membranaire sur les surfaces de cadhérines et de PMEC. 104
4.14 Croissance d'un motif cadhérines GFP après augmentation de la tension membranaire cellulaire. 105
4.15 Schéma du mécanisme d'agrégation des cadhérines suite à une augmentation de la tension membranaire. 108

Nucléation et croissance de contacts entre cellules biologiques.

Préambule

L'adhésion est un thème central en biologie. Ce sont, en effet, les propriétés adhésives des cellules qui permettent leur assemblage en des tissus tri-dimensionnels, qui nous constituent. La cohésion des tissus est due à l'adhésion spécifique de milliers de protéines transmembranaires exprimées à la surface cellulaire.

Une autre propriété importante des cellules est leur capacité à se ségréger en groupes de différents types de cellule. Ce phénomène est par exemple très important lors de la morphogénèse (Gumbiner, 1996). Cette faculté qu'ont les cellules à se "trier" a été observée pour la première fois chez l'éponge (Wilson, 1907). Ainsi, une éponge dont les cellules ont été dispersées est capable de s'auto-assembler à nouveau. D'autre part, des cellules d'éponges de différentes espèces se séparent les unes des autres lorsqu'elles sont artificiellement mélangées. Chez les vertébrés, le même genre de phénomène a ensuite été observé : si l'on dissocie et l'on mélange des cellules embryonnaires d'amphibiens, on observe que celles-ci sont capables de se réassembler et de se séparer en différents tissus (Townes & Holtfreter, 1955). Les cellules embryonnaires "savent" donc distinguer les cellules qui leur "ressemblent" des autres. Cette reconnaissance est souvent attribuée à l'expression de différents types de protéines d'adhésion selon le type cellulaire (les cellules exprimant un type A de protéines d'adhésion vont se séparer des cellules exprimant un type B de protéines). Steinberg (1963) a suggéré que la ségrégation des cellules provenait d'une différence de tension de surface entre types cellulaires : la séparation des cellules est alors comparable à celle de deux liquides non-miscibles (Differential Adhesion Hypothesis : DLA). Cela ne s'oppose pas forcément avec la première interprétation proposée ci-dessus, puisque la tension de surface va dépendre du type de molécules exprimées à la surface des cellules.

L'adhésion cellulaire est un phénomène beaucoup plus compliqué que la simple mise en commun de ces protéines d'adhésion. Ces dernières sont associées au cytosquelette cellulaire via un complexe cytoplasmique de protéines. La cellule ne contrôle pas seulement le nombre et le type de molécules d'adhésion exprimées à sa surface, elle peut aussi appliquer

des forces sur ces contacts (via par exemple des cables d'acto-myosine), ou encore modifier la composition protéique du complexe adhésif et changer ainsi son énergie d'adhésion.

L'assemblage protéique qui forme le contact cellule-cellule a aussi pour rôle de déclencher des cascades signalétiques cellulaires conduisant en général à l'arrêt des processus de division et pouvant engendrer la différenciation des cellules. Une dérégulation de ces phénomènes peut entraîner l'apparition de cellules cancéreuses.

On l'aura compris, l'adhésion cellulaire est un sujet complexe, qui comporte de multiples facettes ; elle peut donc être abordée par des voies très différentes. Nous avons choisi de nous intéresser au cours de cette thèse à la dynamique de formation des contacts cellule-cellule. Par quel processus des protéines d'adhésion distribuées aléatoirement sur la cellule vont-elles s'agréger au niveau de la zone de contact entre deux cellules ?

Biologistes et physiciens se sont penchés sur la question. Les physiciens expliquent la formation d'agrégats de protéines adhésives en donnant un rôle central à la membrane sans prendre en compte le cytosquelette d'actine. Les biologistes quant à eux ont décrit la formation des contacts comme le résultat d'une orchestration dirigée par l'actine. Il est certain que l'actine doit jouer un rôle dans ce phénomène, mais la membrane n'a-t-elle pas non plus une place à tenir, en particulier dans les stades premiers de formation des contacts ? Pour répondre à cette question, il faut abandonner le système modèle de la vésicule sur lequel les modèles de physique avaient été testés jusqu'à présent et passer à l'étude de la formation des contacts dans un système cellulaire pour pouvoir à la fois traiter membrane et cytosquelette. Nous avons donc étudié ces phénomènes de nucléation et croissance en suivant la dynamique d'agrégation de cadhérines fluorescentes exprimées par des cellules, par microscopie de fluorescence (voir Fig. 1a).

Cette thèse a aussi eu pour but de répondre à une deuxième question : ces phénomènes d'agrégation sont-ils universels ? En d'autres termes, la nature de la protéine d'adhésion change-t-elle les propriétés de formation des contacts ? Nous avons donc voulu comparer la formation des contacts focaux (résultat de l'interaction d'intégrines cellulaires et de protéines de la matrice extracellulaire), et celle des contacts cadhérines-cadhérines. Les contacts focaux ont naturellement une géométrie différente des contacts cellule-cellule, ils sont planaires. Pour rendre la comparaison possible, nous avons greffé des cadhérines recombinantes sur une surface et observé l'adhésion de cellules exprimant la cadhérine fluorescente sur ces surfaces (voir Fig. 1b). Cette géométrie présente un avantage pour

l'observation, tout se passe dans un seul plan (pas de problème de reconstruction d'images comme en 3D), et l'observation par ondes évanescentes permet l'obtention d'une très bonne qualité d'images pour la visualisation des motifs.

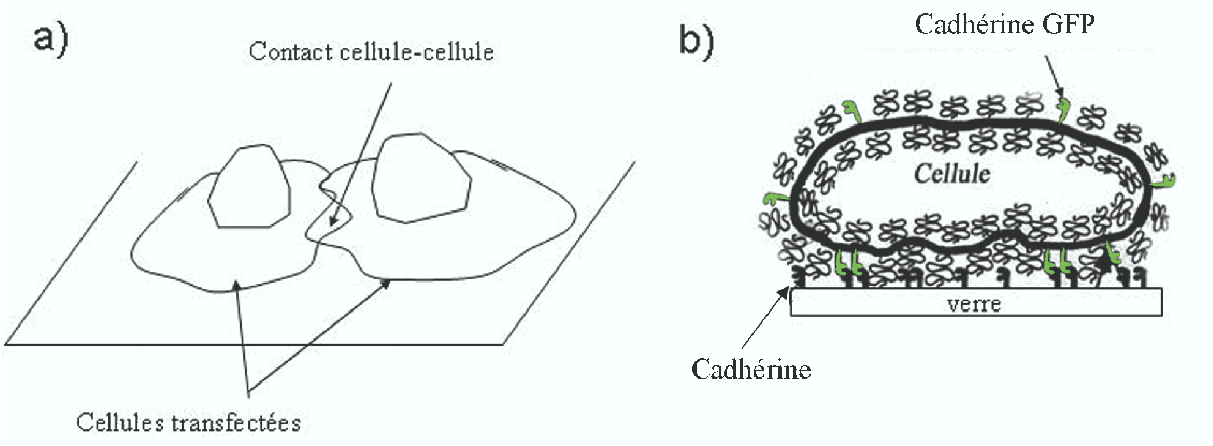

FIG. *1: (a) Nous avons étudié la nucléation et la croissance de contacts entre deux cellules transfectées avec la VE cadhérine GFP. (b) Nous avons aussi utilisé une géométrie 2D. Les protéines Serrures (cadhérines ou protéines de la matrice extracellulaire (PMEC)) sont adsorbées sur une surface de verre, et les protéines Clés (cadhérine GFP ou vinculine GFP) sont fluorescentes à la surface des cellules. L'observation se fait par ondes évanescentes.*

Cette géométrie nous a permis de constater que les mécanismes d'agrégation des protéines cytoplasmiques des contacts focaux liés à la contractilité acto-myosine, étaient différents de ceux liés à l'agrégation des cadhérines (non liées au cytosquelette d'actine). Nous avons ainsi mis en évidence pour la première fois dans un système cellulaire le rôle de la tension de membrane dans ces processus d'agrégation de protéines membranaires.

Nous présenterons donc dans un premier chapitre d'introduction comment la nucléation et la croissance de contacts peuvent être étudiés expérimentalement dans une cellule et quelles sont les différentes horloges impliquées dans la cinétique de ce phénomène. Nous présenterons aussi ce que nous connaissons des aspects biologiques et physiques de l'adhésion.

Dans un deuxième chapitre, nous présenterons les techniques expérimentales qui ont été nécessaires à ce travail.

Dans une troisième partie, nous étudierons ensuite la nucléation et croissance de contacts cadhérines-cadhérines entre cellules et dégagerons les rôles fondamentaux du cytosquelette

d'actine.

Dans une quatrième partie, nous présenterons la deuxième géométrie qui nous a permis de mettre en évidence le rôle que pouvait jouer la membrane dans les phénomènes d'agrégation de protéines membranaires.

Enfin, nous conclurons et verrons que physiciens et biologistes n'ont pas des points de vue opposés mais que leurs travaux se complètent et permettent de décrire l'adhésion des stades premiers, aux stades les plus avancés.

1

Introduction générale

Les cellules adhèrent entre elles, ou sur un substrat, par adhésion spécifique de divers couples ligands-récepteurs. Chaque cellule exprime à sa surface quelques dizaines ou centaines de milliers de ces protéines d'adhésion. Lorsque la cellule n'a pas de partenaires d'adhésion, ces protéines sont distribuées aléatoirement sur la membrane, sous forme de molécules isolées ou de petits agrégats. En revanche, si la cellule entre en contact avec une autre cellule, ces protéines vont progressivement s'agréger dans la zone de contact. Des noyaux apparaissent, ils se développent ou fusionnent pour former une zone uniforme d'adhésion lorsque les protéines sont en nombre suffisant. On passe d'une phase "liquide" (où les molécules sont dispersées sur toute la surface de la membrane), à une phase "solide" (les protéines s'agrègent localement). C'est cette transition que nous avons voulu étudier. Nous nous sommes intéressés à un type particulier de protéines d'adhésion : les cadhérines. Ce chapitre d'introduction présentera, dans une première partie, comment on peut comparer ce phénomène de nucléation et croissance dans la cellule aux phénomènes de nucléation et croissance classiques très étudiés en matière condensée. Et, nous verrons quels sont les moyens techniques à notre disposition pour visualiser et comprendre cette transition de phase. Nous verrons ensuite quelques aspects biologiques de l'adhésion cellulaire et nous dégagerons les paramètres qui apparaissent cruciaux aux yeux des biologistes pour expliquer cette croissance. Enfin, dans une dernière partie, nous verrons comment les physiciens modélisent et expliquent cette transition.

1.1 Nucléation et croissance

1.1.1 Nucléation et croissance en matière condensée.

La nucléation est le processus par lequel commence la formation d'une nouvelle phase, c'est donc un phénomène très répandu. Condensation, évaporation, croissance cristalline, croissance de couches minces ne sont que quelques exemples où la nucléation joue un rôle prépondérant. Les phénomènes de nucléation et croissance sont aujourd'hui reconnus pour être au coeur de processus très différents : éruption volcanique (Blander, 1979), condensation électronique dans les solides (Chakraverty, 1970), formation de trous noirs dans l'Univers (Kapusta, 1984), rupture de mousses ou membranes (Exerowa, 1986), formation de liquide électrons-trous dans les semi-conducteurs (Keldysh, 1986), tremblements de terre (Rundle, 1989), formation de particules de matière dans l'espace (Rossi, 1984). Cette liste est évidemment loin d'être exhaustive. A présent, le phénomène de nucléation et croissance est un domaine établi de recherche fondamentale et technologique.

L'étude cinétique de ces phénomènes de nucléation et croissance passe par la résolution des équations "maîtresses" qui peuvent s'écrire dans des systèmes fermés à un seul composant (Kashchiev, 1984) :

$$\frac{dZ_n(t)}{dt} = \sum_{m=1}^{M(t)} \left(f_{mn}(t) Z_m(t) - f_{nm}(t) Z_n(t) \right), \tag{1.1}$$

où n est le nombre de molécules par agrégat, $Z_n(t)$ représente la concentration des agrégats de taille n, et f_{mn} la fréquence de la transition d'un agrégat de taille n à un agrégat de taille m.
La donnée de ces fréquences f_{mn} permet la détermination des caractéristiques importantes du processus de nucléation.

Les taux d'attachement des molécules sont en général facile d'accès car ils dépendent des propriétés de l'ancienne phase, souvent facile à décrire. Ces fréquences sont généralement contrôlées par les transports de matière et sont très souvent liées au coefficient de diffusion dans les phases liquides et solides. Les fréquences de détachement de molécules des agrégats sont, quant à elles, largement déterminées par les propriétés de l'agrégat qui sont mal connues. C'est pourquoi il est souvent pratique théoriquement d'éliminer ces taux de détachement, en leur donnant une valeur nulle ou négligeable.

Nous avons décidé d'étudier ce phénomène de nucléation et croissance dans la cellule, nous devrons donc nous attacher à déterminer quels sont les facteurs susceptibles d'influencer les facteurs f_{mn}, dans le système cellulaire. Mais, d'abord, nous voulons montrer comment il est possible d'étudier de nos jours la dynamique des protéines dans une cellule.

1.1.2 Nucléation et croissance dans une cellule.

La cellule est un objet complexe dont la surface est de l'ordre de 1000-5000 μm^2. La taille des protéines d'adhésion est, elle, d'une dizaine de nanomètres. Un agrégat de ces dernières peut être observé sur des cellules fixées en utilisant des techniques classiques d'immunofluorescence. Les cellules sont figées à un instant t de la vie cellulaire grâce à un réticulant protéique, la membrane est ensuite dissoute. On peut ainsi incuber les cellules avec des anticorps dirigés contre une protéine d'intérêt (par exemple la protéine adhésive), ces anticorps dits primaires sont eux-mêmes ensuite reconnus par des anticorps secondaires fluorescents (voir protocole 2.1.6). La protéine d'intérêt est ainsi marquée par un fluorophore, l'observation au microscope optique permet de révéler la distribution de la protéine à l'intérieur de la cellule.

En fixant les cellules à différents instants du processus de formation des contacts cellule-cellule, il est possible d'étudier de manière statistique la dynamique de ce phénomène. C'est par exemple la technique qu'ont utilisée Vasioukhin *et al.* (2000), en parallèle avec des observations en microscopie électronique (voir § 1.2.3.4).

L'observation de la dynamique de protéines à l'intérieur d'une cellule a été permise par l'utilisation de la Green Fluorescent Protein (GFP). Cette protéine qui fluoresce spontanément a été isolée à partir de coelentérés tels que la méduse du Pacifique *Aequoria Victoria*. Le clonage moléculaire de l'ADN de la GFP et la démonstration par Chalfie *et al.* (1994) que la GFP peut être exprimée comme un gène fonctionnel ont ouvert des nouvelles voies en biologie cellulaire, biologie moléculaire et biologie du développement. La GFP a été exprimée dans la bactérie, la levure, chez *Dictyostelium*, les plantes, la drosophile, le poisson-zèbre et dans les cellules de mammifères. La GFP peut fonctionner comme un marqueur qui peut être inséré dans de nombreuses protéines sans altérer leur fonction native. Cela est en fait assez étonnant, vu la taille de la molécule : le poids moléculaire de la GFP est de : 27 kdal (le poids moléculaire classique d'une protéine est de 50 à 100 kdal).

La biologie moléculaire ouvre aussi beaucoup d'autres voies. En modifiant la structure d'une protéine, on peut apprendre beaucoup sur ses propriétés d'assemblage. Sako *et al.* (1998) ont ainsi étudié la diffusion des cadhérines et ont voulu mettre en évidence le rôle de la partie cytoplasmique dans ce phénomène. Pour cela, ils ont synthétisé plusieurs mutants de la E-cadhérine (voir Fig. 1.1 1) :

- "catenin-minus" : la partie cytoplasmique de la cadhérine permettant aux protéines cytoplasmiques reliant la cadhérine au cytosquelette d'actine (β-caténine et α-caténine) de se lier a été retirée.
- "short-tailed" : pratiquement toute la partie cytoplasmique a été enlevée.
- "fusion" : là encore, on a retiré la partie cytoplasmique de la cadhérine permettant la liaison aux caténines, mais on a cette fois ajouté la moitié C-terminal de l'α-caténine. Cette cadhérine de fusion va donc se trouver très majoritairement liée à l'actine, quand elle est exprimée à la membrane cellulaire.

Ils ont ensuite fait exprimer la E-cadhérine ou ses mutants par des cellules L, qui n'expriment pas naturellement de cadhérines. Des billes de latex préalablement recouvertes d'un anticorps dirigé contre la partie extracellulaire de la E-cadhérine sont ensuite déposées sur ces cellules. Puis, les particules sont suivies par "single particle tracking" : c'est une technique qui permet de suivre leur mouvement et de calculer leur coefficient de diffusion. Les résolutions spatiales et temporelles sont respectivement de l'ordre du nanomètre et de la milliseconde. Les auteurs ont enfin appliqué des forces sur ces billes à l'aide de pièges optiques. Ils ont ainsi pu comparé les propriétés des cadhérines mutées et de la E-cadhérine entière et pu dresser des conclusions quant aux propriétés de diffusion de la cadhérine.

Ils ont trouvé que la cadhérine "catenin-minus" et la cadhérine "short-tailed" pouvaient être tirées à l'aide du piège optique (force de piégeage 0.8 pN) sur des distances respectives de 1.1 et 1.8 μm. Et ils ont mesuré des coefficients de diffusion respectifs de 1.2×10^{-10} et de $2.1 \times 10^{-10} cm^2/s$. Enfin, ils montrèrent que 40 % des cadhérines normales, "short-tailed" et "catenin-minus" avaient un mouvement diffusif mais confiné. Cette aire de confinement était de 0.13 μm^2 pour la cadhérine normale et la cadhérine "catenin-minus", mais était quatre fois plus grande pour la cadhérine "short-tailed". Pour la cadhérine "fusion", le coefficient de diffusion était très faible ($0.2 \times 10^{-10} cm^2/s$). Ce résultat suggère que la cadhérine "fusion" est bien liée au cytosquelette. Enfin, ils ont obtenu que le comportement des cadhérines entières pouvait être séparé en deux groupes : celles qui se comportaient comme les cadhérines "catenin-minus" et celles qui se comportaient comme les cadhérines "fusion".

Ils ont donc pu grâce à toutes ces données recueillies sur les mutants et les cadhérines entières conclure que le mouvement des cadhérines entières était régulé par la partie cytoplasmique qui était soit : i) piégée par les filaments d'actine (comme la fusion) ii) soit confinée par un réseau d'actine sous-jacent (comme la "catenin-minus" (voir Fig. 1.1 2).

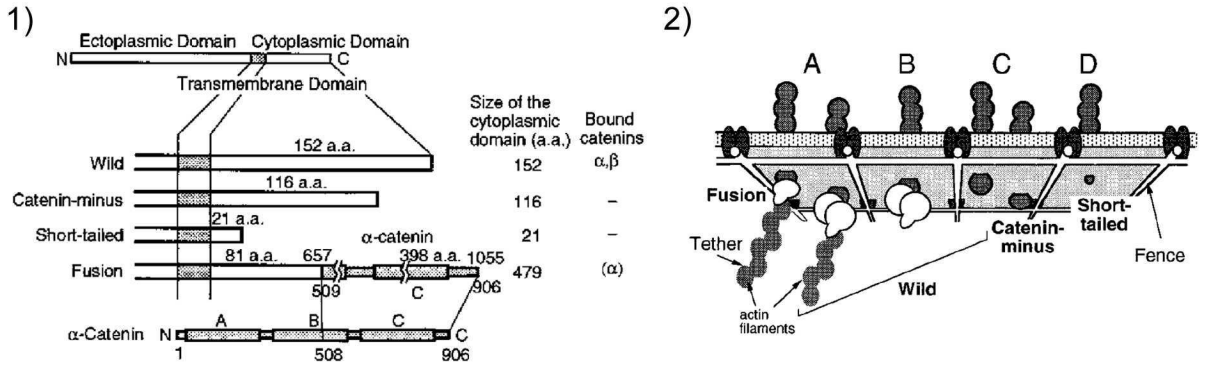

FIG. *1.1: 1) Schéma des différentes constructions de cadhérines utilisées par Sako et al. (1998). 2) Schéma expliquant les résultats obtenus : la "short-tailed", la "catenin-minus" et la "wild" cadhérine non liée à l'actine (B, C, D) diffusent à l'intérieur d'une aire confinée définie par le réseau d'actine sous-jacent. La "fusion" et la "wild" cadhérine liées à l'actine (A) présentent quant à elles, un coefficient de diffusion beaucoup plus faible.*

Cet exemple illustre comment des approches combinées de biologie moléculaire et de biologie cellulaire permettent d'obtenir des informations sur les lois d'assemblage des protéines.
Nous avons mis à profit ces techniques au cours de cette thèse pour obtenir de nouvelles informations sur les lois de nucléation et croissance de contacts cellulaires. Il est en effet possible de suivre la dynamique de formation des jonctions adhérentes en utilisant des cadhérines GFP (voir §1.2.3.4 Adams *et al.* (1998))

1.1.3 Horloges cellulaires.

Il est intéressant, avant de se lancer dans les expériences, d'essayer d'identifier les horloges cellulaires importantes pouvant expliquer la dynamique de nucléation et croissance.

1.1.3.1 "Treadmilling" de l'actine.

Pour adhérer, deux cellules doivent amener leurs deux membranes en contact. D'autre part, une fois ces membranes à proximité, leur forme peut fluctuer. Or, on verra dans le § 1.3.1.5 que des modèles théoriques prédisent que les transitions de phase observées peuvent être causées par des fluctuations. Cependant les fluctuations des membranes qui sont prises en compte dans ces modèles sont le plus souvent d'origine thermique. Cela est très pertinent quand il s'agit de vésicules, mais cela l'est beaucoup moins dans les systèmes cellulaires où le module de courbure κ est très supérieur à kT (500 kT, voir Simson *et al.* (1998)). Si les fluctuations thermiques ne sont pas pertinentes, d'autres fluctuations existent.

La cellule projette :

- des filopodes qui sont des protrusions rigides de largeur $0.2\mu m$ et pouvant atteindre parfois plusieurs micromètres de long. Ils sont constitués d'un réseau très serré d'environ 20 filaments d'actine.
- des lamellipodes, protrusions qui ressemblent à des feuilles d'environ 200nm d'épaisseur.

Ces projections sont des structures dynamiques :elles permettent à la cellule de sonder son environnement : elles peuvent adhérer au substrat ou bien être ramenées vers l'arrière de la cellule (ruffling, voir Fig. 1.2).

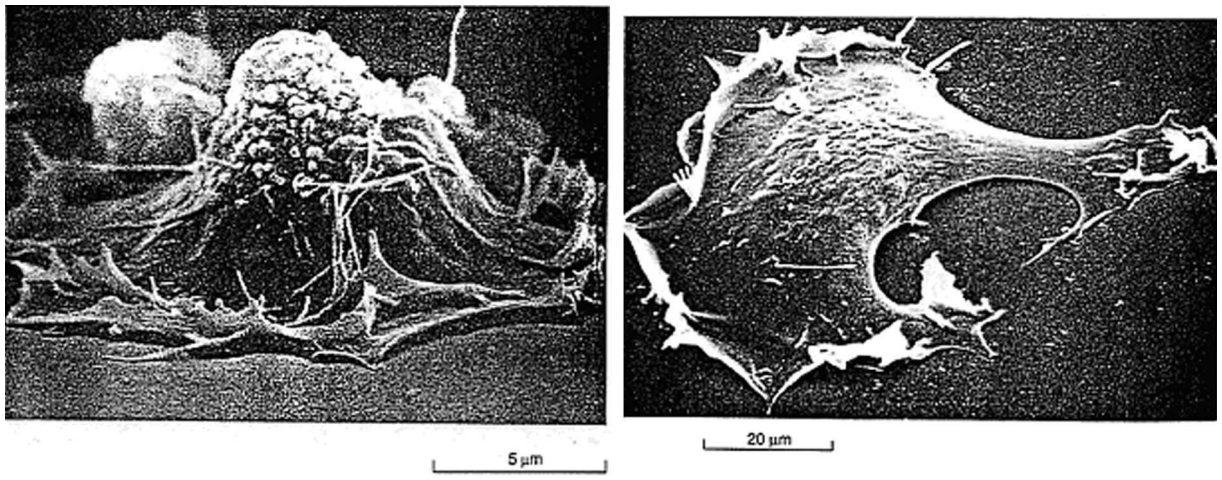

Fig. *1.2: Images de microscopie électronique d'une cellule montrant le phénomène de "ruffling". Source : Bray (1992).*

Elles peuvent se former et se rétracter très rapidement. Le spectre de ces fluctuations

n'a pas encore été mesuré. Les cellules sont donc plus complexes que de passives vésicules géantes.

L'actine est considérée comme l'acteur principal de ces fluctuations de membranes. Elle pousse la membrane par des mécanismes de polymérisation/dépolymérisation dans les deux géométries. Elle est organisée en fibres parallèles dans les filopodes et se structure en un réseau entrecroisé dans le lamellipode (voir Fig. 1.3).

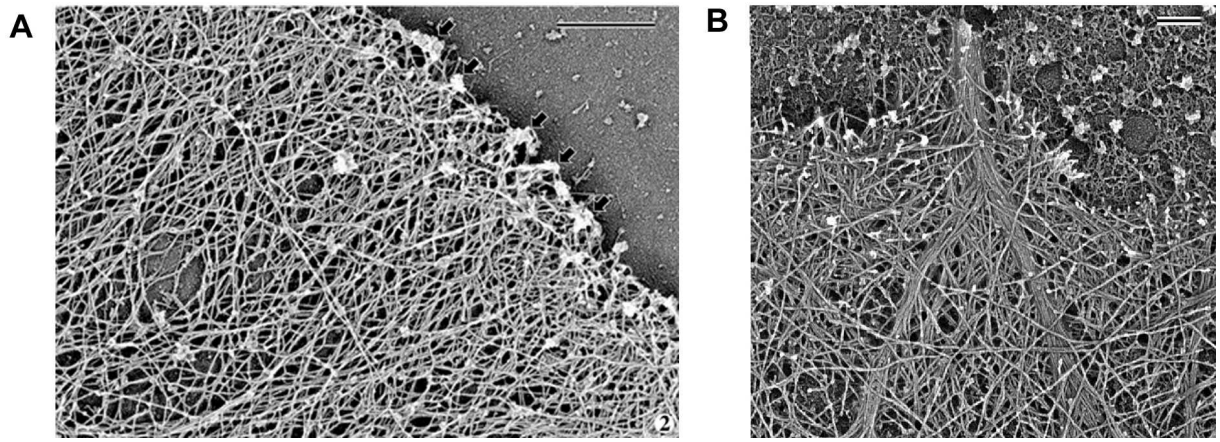

FIG. *1.3: Images de microscopie électronique de lamellipodes A et filopodes B. Les barres en A et B représentent respectivement 0.5 et 0.2 μm. Sources : A Svitkina et al. (1995), B Svitkina et al. (2003).*

L'actine est la protéine la plus abondante dans beaucoup de cellules eucaryotes. Dans un milieu physiologique, cette protéine globulaire polymérise pour former des filaments polaires. On distingue l'extrémité barbée dite +, et l'extrémité pointue dite -. Cette polymérisation est accompagnée d'une hydrolyse de l'ATP. Ainsi, lors de ce processus, des monomères d'actine liés chacun à une molécule d'ATP sont ajoutés à l'extrémité barbée du filament, alors que des monomères liés à des molécules de GDP (l'ATP a été hydrolysé après fixation des monomères au filament) sont retirés à l'extrémité pointue. Lorsque les monomères sont ajoutés aussi vite qu'ils sont retirés, on parle de "treadmilling" (voir Fig. 1.4). Le filament peut se déplacer tout en gardant une longueur constante.

La vitesse du "treadmilling" in vivo est très différente de celle obtenue *in vitro* en l'absence de protéine régulatrice. La vitesse d'avancée d'un filament *in vitro* sera typiquement de l'ordre de 0.04 μm/s, alors qu'un kératinocyte peut lui avancer avec des vitesses de l'ordre de 10 μm/s. Il existe en fait dans la cellule de nombreuses protéines pouvant

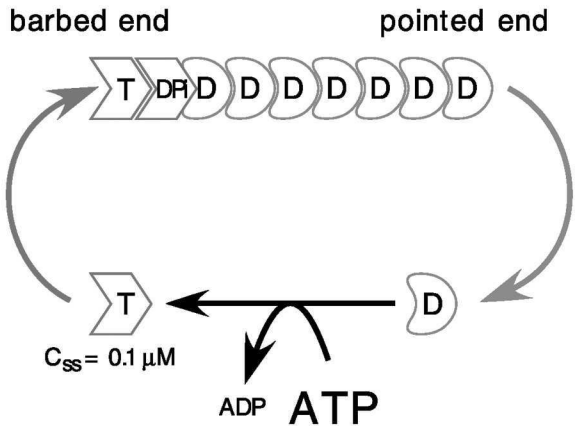

Fig. *1.4: Schéma du "treadmilling" de l'actine. Source : Pantaloni et al. (2001).*

influencer la dynamique du "treadmilling". Elles sont classées en deux groupes les ADF (actin depolymerizing factor) et les protéines cappantes (pour une revue voir (Pantaloni *et al.*, 2001; Pollard & Borisy, 2003)). Les premières vont accélérer le "treadmilling" en augmentant la vitesse de dépolymérisation de l'actine à l'extrémité pointue, qui est le processus limitant du phénomène. Les protéines cappantes vont elles se fixer à certains filaments d'actine et les empêcher de polymériser. Ceux-ci continuant à se dépolymériser, ils alimentent la réserve de monomères d'actine libre, accélérant ainsi la croissance des filaments non cappés.
Ces processus de "treadmilling" ont bien été observés sur les bords de la cellule dans les lamellipodes grâce à des expériences de récupération de fluorescence après photoblanchiment (Wang, 1985). Ils ont aussi été observés sur la comète d'actine de la *listeria*, qui est une bactérie capable de se servir de la polymérisation de l'actine endogène pour se déplacer dans la cellule eucaryote qu'elle infecte. Il a été montré que la vitesse d'avancée de cette bactérie était la même que celle du "treadmilling" de l'actine dans sa comète Theriot *et al.* (1992).

1.1.3.2 Diffusion des protéines d'adhésion.

Comme nous l'avons vu au § 1.1.1, la diffusion des particules est souvent un processus important dans les phénomènes de nucléation et croissance. Dans le système qui nous intéresse (agrégation de protéines d'adhésion), la diffusion a lieu à 2D, les protéines diffusant dans la membrane cytoplasmique. Comme on l'a vu au § 1.1.2, ces coefficients de diffusion ont été mesurés pour les cadhérines et ils dépendent de la liaison de la cadhérine à l'actine

($2 \cdot 10^{-10}$ cm^2/s pour les cadhérines libres et $2 \cdot 10^{-11}$ cm^2/s pour les cadhérines liées à l'actine).

1.1.3.3 Mouvement moteur et microtubule

L'apport de matière peut aussi se faire du cytoplasme vers la membrane : les cadhérines fabriquées par le réticulum endoplasmique sont transportées par des moteurs moléculaires dans des vésicules le long de microtubules vers la membrane (Mary *et al.*, 2002). La vitesse de ces vésicules est de l'ordre de 0.5 à 2 μm.s^{-1}. On ne sait pas très bien pour l'instant si ces vésicules sont amenés aux endroits des contacts naissants, ou bien aléatoirement sur la surface cellulaire. Il a fallu déterminer l'importance de ce processus dans la formation des contacts. Il faut aussi savoir que les protéines ne sont pas seulement amenées à la membrane, elles sont aussi sans arrêt retirées des contacts, en particulier dans le cas des nouveaux contacts (Le *et al.*, 1999) : les protéines sont sans arrêt recyclées. Nous aurons l'occasion de rediscuter de ce phénomène dans le chapitre trois.

1.1.3.4 Cinétique de liaison ligand-récepteur

Une autre horloge pouvant intervenir dans la cinétique de nucléation et croissance est la cinétique de la liaison ligand-récepteur elle-même. Elle a été mesurée *in vitro* par AFM pour des VE-cadhérines par Baumgartner *et al.* (2000). Ils ont trouvé une constante de dissociation K_D de l'ordre de : $10^{-3} - 10^{-5}M$, et des vitesses de formation et de rupture : $k_{off} = 1.8s^{-1}$ et $k_{on} = 10^3 - 10^5 M^{-1}s^{-1}$. L'interaction "trans" cadhérine-cadhérine est donc une réaction à faible affinité. Dans une autre étude, Baumgartner & Drenckhahn (2002) ont mesuré sur des cellules MyEnd (lignées immortalisées de cellules microvasculaires endothéliales de souris) le niveau d'expression et la constante de dissociation de la VE cadhérine par une autre méthode. Ils ont trouvé :10^4 monomères $/\mu m^2$ ce qui est proche du taux d'expression des intégrines sur les "platelets" (10^3 intégrines / μm^2) et $K_D = 10^{-4}M$ (ce qui s'accorde bien aux mesures par AFM). Ces deux valeurs prises de manière brute ne permettent pas d'expliquer la résistance des cellules endothéliales à un fort flux : pour comprendre l'adhésion relativement forte des cellules entre elles ils faut rajouter l'ingrédient de la liaison des cadhérines au cytosquelette. La liaison de l'actine au cytosquelette modifierait selon les auteurs sa mobilité latérale et donc le nombre de liens cadhérines-cadhérines existants. Leurs derniers travaux (Baumgartner *et al.*, 2003) ten-

draient à favoriser cette hypothèse. Ils ont en effet mesuré les forces d'adhésion de billes recouvertes de cadhérines sur des cellules exprimant ces mêmes cadhérines grâce à un piège optique et ont montré que cette adhésion était très atténuée lorsque l'on introduisait des agents déstabilisants l'actine (Cytochalasine D, A23187). Ils ont de plus en parallèle mesuré les temps de vie des liaisons cadhérine-cadhérine par microscopie de fluorescence de molécules uniques et n'ont trouvé aucune différence avec ou sans agents déstabilisant. Par contre, ils ont montré que la mobilité naturelle des cadhérines était accrue quand l'actine était dépolymérisée. Ils concluent donc que la très faible affinité des cadhérines entre elles nécessite l'immobilisation des cadhérines par le cytosquelette, pour permettre à la cadhérine de se relier rapidement après dissociation.

1.1.3.5 Conclusion

Tous ces phénomènes dynamiques peuvent avoir un rôle à jouer dans la formation des contacts cellules-cellules. Cette thèse a eu pour but de décrire l'importance relative de tous ces processus. Si l'on est capable de désigner les horloges importantes intervenant dans la nucléation et croissance de contacts cellulaires, on peut alors, connaissant des paramètres tels que les constantes de diffusion, les constantes d'association du couple cadhérine-cadhérine, calculer les fréquences f_{mn} de passage d'un agrégat de taille m à un agrégat de taille n (voir §1.1.1). Il est ensuite théoriquement possible de prédire la cinétique de croissance des contacts cellulaires.

1.2 Aspects biologiques de l'adhésion

1.2.1 Différents types d'adhésion.

La formation, la réparation et la cohésion des tissus mettent en jeu des mécanismes complexes d'adhésion cellulaire. On peut distinguer plusieurs types de contacts (voir Fig. 1.5) :

1. Les contacts entre la cellule et un réseau de polymères (protéines de la matrice extracellulaire, PMEC) généré par la cellule :
   - Contacts focaux. Les contacts focaux (ou adhérences focales ou plaques d'adhérence) réalisent le chaînon intermédiaire entre les PMEC et les microfilaments

d'actine du cytosquelette. Les récepteurs membranaires assurant les interactions cellule-PMEC au niveau des contacts focaux appartiennent à la famille des intégrines. De nombreuses protéines intra-cytoplasmiques assurent le lien entre le domaine cytoplasmique des intégrines et les microfilaments d'actine. Des jonctions de ce type s'établissent de façon transitoire pour permettre la migration de cellules sur la matrice extracellulaire, notamment au cours des processus de réparation.

- Hémidesmosomes. Les hémidesmosomes unissent les PMEC et les filaments intermédiaires du cytosquelette. Les protéines hémidesmosomales sont loin d'être toutes bien identifiées ; les deux les mieux connues sont l'antigène de la pemphigoïde bulleuse (BP 180) et l'intégrine alpha6-béta4 qui se lie à la laminine 5 de la matrice extracellulaire. Les protéines de la plaque hémidesmosomale ne sont pas encore parfaitement identifiées.

2. Les contacts cellule-cellule :
   - Desmosomes. Ce sont des structures en forme de disque d'environ 0.1 à 0.5 μm de diamètre et 100 nm d'épaisseur. Les desmosomes assurent les liaisons intercellulaires par des molécules transmembranaires de la superfamille des cadhérines (desmogléines et desmocollines). Ces molécules sont en relation avec la plaque desmosomale qui contient en particulier de la plakoglobine et des desmoplakines.
   - Jonctions serrées (tight jonctions) sont des jonctions très étanches qui définissent une barrière physiologique entre les compartiments extérieur et intérieur de l'organisme. Les zonula occludens sont constituées de plusieurs protéines transmembranaires dont les deux principaux représentants sont l'occludine et les membres de la famille des claudines. Ces protéines transmembranaires sont associées à d'autres protéines comme la ZO-1, la ZO-2, la ZO-3. La ZO-1 interagit avec la spectrine, elle-même reliée aux microfilaments d'actine du cytosquelette.
   - Jonctions communicantes (gap jonctions) permettent une communication directe entre les cytoplasmes des cellules adjacentes. Au niveau des jonctions communicantes, les cellules adjacentes sont unies entre elles par des petits canaux intercellulaires tubulaires. Chaque canal intercellulaire est formé de l'aboutement de 2 hémi-canaux (ou connexons), chacun faisant partie de la membrane de chacune des 2 cellules adjacentes.
   - Jonctions adhérentes. Ces jonctions d'ancrage se forment par l'intermédiaire des cadhérines classiques, molécules transmembranaires responsables d'une adhérence dépendant du calcium. Bien que l'adhérence de ces molécules dépende de leur

domaine extra-cellulaire, celle-ci est modulée par des molécules cytoplasmiques, les caténines (α-caténine, β-caténine et γ-caténine) qui se lient d'une part au domaine cytoplasmique des cadhérines et d'autre part - par l'intermédiaire de nombreuses protéines cytoplasmiques - aux filaments d'actine reliés entre eux par des protéines d'α-actinine notamment.

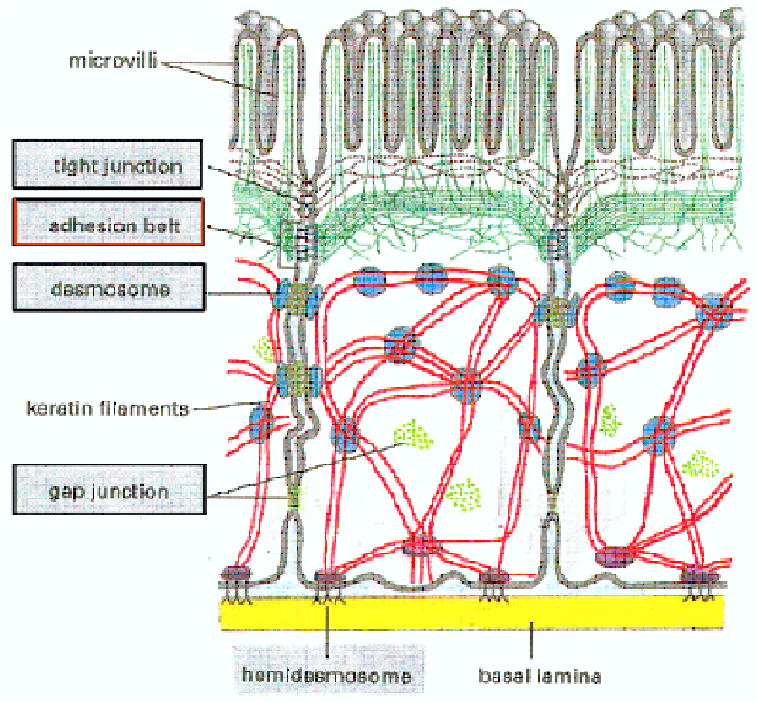

Fig. *1.5: Différents types d'adhésion. Source : Alberts et al. (1989).*

Les deux paragraphes suivants s'attacheront à décrire deux de ces contacts : les contacts focaux, et les jonctions adhérentes cellule-cellule. Les contacts focaux sont aussi classés dans les jonctions adhérentes (Geiger *et al.*, 1995). En effet, comme les contacts cadhérines-cadhérines, ils sont caractérisés par une liaison indirecte des protéines transmembranaires (intégrines) au cytosquelette d'actine. Par souci de clarté dans la suite de cette thèse, le terme jonction adhérente ne fera référence qu'aux contacts cellule-cellule.

1.2.2 Contacts focaux et intégrines.

Un contact focal est une structure composée par trois éléments :

- le couple intégrine-PMEC
- le complexe cytoplasmique associé à l'intégrine (voir Fig. 1.6)

– l'actine

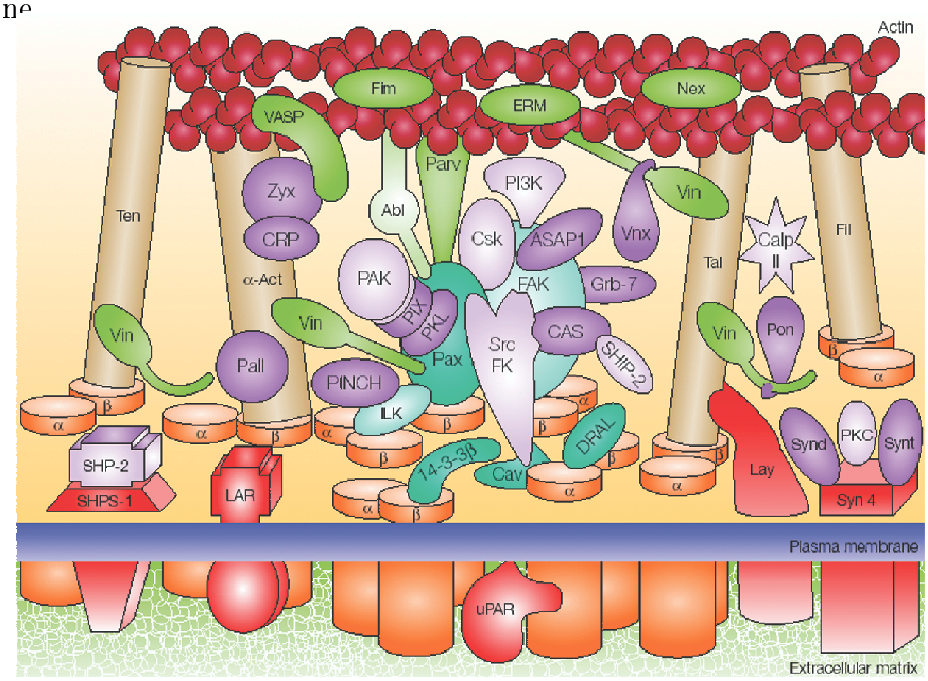

FIG. *1.6: Composition protéique des contacts focaux. Source : Geiger et al. (2001).*

Ces contacts sont des structures qui évoluent au cours du temps, et qui peuvent passer de la forme de petits agrégats, à des formes d'ovales allongés de 2 à 5 μm de long (voir Fig. 1.7 A). Sous cette dernière forme, ces contacts sont soumis à des forces : en effet, l'actine et la myosine organisées en fibres de tension projettent leurs extrémités sur les contacts focaux (voir Fig. 1.7 B).

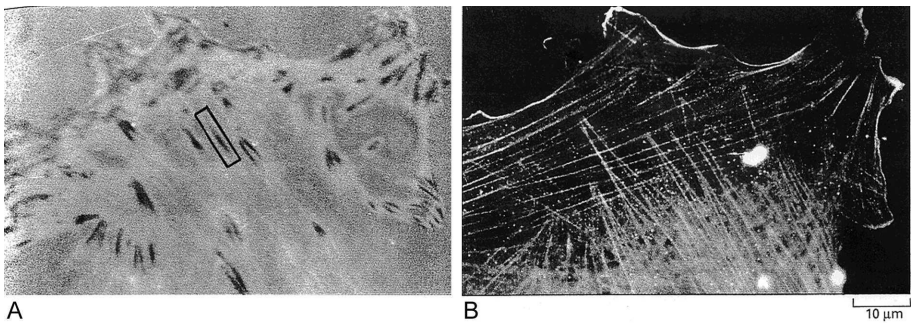

FIG. *1.7: A : Image d'une cellule par Reflection Interference Contrast Microscopy (RICM). Les contacts focaux apparaissent en noir. B : Image d'immunofluorescence des fibres de tension de la même cellule. Source : Alberts et al. (1989).*

Dans un milieu sans sérum, les contacts focaux sont très peu allongés car la contractilité acto-myosine est inhibée pour plusieurs types cellulaires. Il est pourtant possible d'allonger

ces structures localement en appliquant une force. Ainsi, Riveline *et al.* (2001) ont observé la croissance des motifs GFP vinculine, GFP paxilline, GFP vinculine et signal RICM en tirant sur les cellules à l'aide d'une pipette.

Sawada & Sheetz (2002) ont eux aussi appliqué des forces sur des cellules à l'aide de substrats déformables. Ils ont effectué ces expériences sur des cellules sans membrane et ont observé l'agrégation d'une dizaine de protéines cytoplasmiques en étirant leur substrat. On peut donc penser que la majorité des protéines cytoplasmiques du complexe s'agrègent lorsque le complexe est soumis à des forces. Le fait que les cellules soient sans membrane a aussi permis de réfuter l'hypothèse selon laquelle l'ouverture de canaux ioniques étaient à l'origine de cette agrégation. On interprète cet assemblage de protéines cytoplasmiques sous contraintes, comme étant le résultat de l'apparition de nouveaux sites cryptiques révélés par les forces exercées par les câbles d'acto-myosine. Ces nouveaux sites permettent l'attachement de nouvelles protéines lorsque le complexe est étiré (pour une revue, voir Geiger & Bershadsky (2002)).

Il est cependant difficile d'étendre cette agrégation sous force aux intégrines : en effet, aucune observation directe de cette agrégation n'a été observée. Au contraire, comme les expériences de Sawada & Sheetz (2002) ont été réalisées sur des cellules sans membrane, il semble impossible que de nouvelles intégrines se soient agrégées aux zones de contacts lors de l'étirement du substrat, et pourtant les protéines cytoplasmiques s'accumulaient. On peut cependant se demander comment les intégrines survivaient dans ces cellules sans membrane. Pour conclure définitivement sur la question de l'agrégation des intégrines, il conviendrait de répéter les expériences de Riveline *et al.* (2001) avec l'intégrine GFP. En attendant ces résultats, il semble plus prudent de parler d'agrégation des protéines cytoplasmiques du contact focal (PCCF) que d'allongement du contact focal en général.

Enfin, des études sur substrats déformables ont permis de mesurer les forces qu'exercent les cellules sur la surface aux niveaux des contacts focaux. Balaban *et al.* (2001) ont ainsi pu montrer que l'aire et l'intensité des contacts étaient proportionnelles à la force jusqu'à l'obtention d'une saturation d'origine encore inconnue. De même, lorsque la contractilité est inhibée, ces deux paramètres décroissent linéairement avec la force appliquée. Ces résultats renforcent les modèles expliquant l'agrégation sous force par des changements de conformation : Les câbles d'acto-myosine sous tension permettent de révéler des sites cryptiques et donc permettent à de nouvelles PCCF de venir s'agréger.

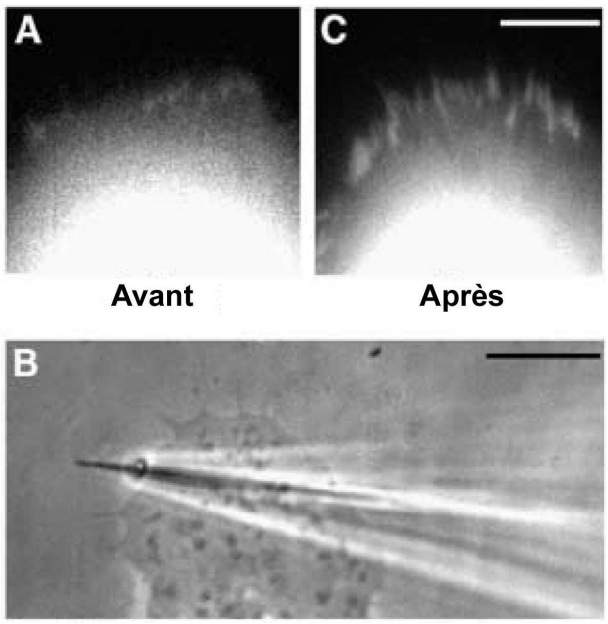

FIG. *1.8: Croissance d'un contact focal soumis à une force de traction. Des cellules SV80 présentent de petits contacts avant application de la force A. Ceux-ci grandissent de façon centripète lorsque la force est appliquée. La figure B montre la position de la pipette sur la cellule lors de la traction. La barre en B fait 10 μm et en C 5 μm. Source : Riveline et al. (2001).*

1.2.3 Jonctions adhérentes et cadhérines

1.2.3.1 Une superfamille de glycoprotéines.

Les cadhérines sont des protéines transmembranaires, dont l'adhésion dépend du calcium (Hyafil *et al.*, 1980, 1981; Ogou *et al.*, 1982; Gallin *et al.*, 1983). La formation des jonction adhérentes commence par l'adhésion homophilique[2] des cadhérines. Il existe deux groupes de cadhérines : les classiques et les non-classiques (voir Fig. 1.9). Nous nous intéresserons par la suite aux cadhérines des Chordés, (cadhérines classiques de type I et II). Elles possèdent toutes cinq domaines extracellulaires (EC), un seul domaine membranaire et un domaine cytoplasmique très conservé. Parmi cette classe de cadhérines, on trouve par exemple : la E-cadhérine (exprimée dans les cellules Epithéliales), la N-cadhérine (exprimée dans les cellules Neuronales), la P-cadhérine (exprimée par les cellules du Placenta), la L-cadhérine (exprimée par les cellules du foi (Liver)), la VE-cadhérine (exprimée par

[2]Deux cellules utilisent deux molécules identiques pour se lier ; hétérophilique : deux cellules utilisent deux molécules différentes pour se lier.

les cellules Vasculaires endothéliales (Lampugnani *et al.*, 2002)). C'est avec cette dernière cadhérine que nous avons essentiellement travaillé : elle appartient au type II et ne possède pas le motif très conservé His-Ala-Val (HAV) des cadhérines de type I. Il a été montré qu'elle jouait un rôle cruciale dans la maintien et la restauration de l'intégrité endothéliale (Gulino *et al.*, 1998). Il est aussi admis que la VE cadhérine est impliquée dans le contrôle de la perméabilité endothéliale (Dejana *et al.*, 1999; Hordijk *et al.*, 1999). Ainsi, lors d'une inflammation, les leukocytes sont amenés à traverser la barrière endothéliale et donc à détruire (Hermant *et al.*, 2003)(ou à déplacer (Shaw *et al.*, 2001), il y a controverse) de façon transitoire les jonctions adhérentes.

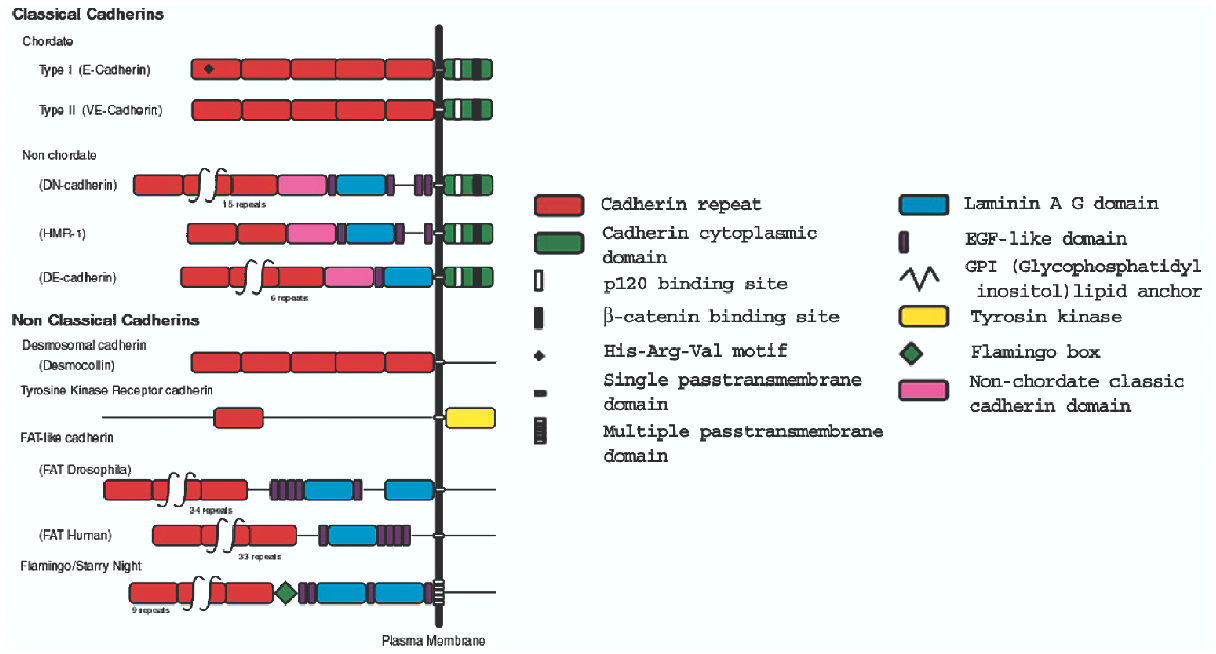

Fig. *1.9: Différents types de cadhérines. Ref : http ://calcium.uhnres.utoronto.ca/cadherin /pub_pages/ general/domain_layout.htm*

1.2.3.2 Structure des cadhérines des Chordés.

Les mécanismes moléculaires d'interaction i) cis (entre deux cadhérines d'une même cellule) ii) trans (entre deux cadhérines de deux cellules opposées) sont toujours sujets de controverse. Différents modes d'assemblage ont été proposés sur la base des structures tridimensionnelles des ectodomaines de cadhérines.

A partir du fragment EC1 de la N-cadhérine, Shapiro *et al.* (1995) ont proposé un premier modèle d'interaction homophilique des cadhérines, appelé "zipper model" . L'in-

teraction cis entre deux cadhérines d'une même cellule se fait par couplage deux à deux des ectodomaines (domaines extracellulaires) (voir Fig. 1.10 A), cette interaction ne dépend pas du calcium. L'interaction trans se fait, elle, via les modules EC1, et dépend du calcium.

Ce mode d'assemblage est en contradiction avec un second obtenu à partir de la structure cristalline des modules EC1 et EC2 de la N-cadhérine (Nagar *et al.*, 1996) et de la E-cadhérine (Pertz *et al.*, 1999), qui limite la dimérisation cis aux deux premiers domaines, mettant en jeu les sites de fixation du calcium entre les modules EC1 et EC2 (voir Fig. 1.10 B).

Ces deux modèles ne font intervenir dans l'interaction trans que le module EC1, et le rôle du motif HAV n'est pas encore bien clair (Renaud-Young & Gallin, 2002). Un autre sujet de controverse entre ces modes d'assemblage concerne l'insertion d'un tryptophane 2 dans une poche hydrophobe du module EC1. Il s'insérerait dans la poche :

- de la cadhérine voisine de l'interaction cis pour Shapiro *et al.* (1995),
- de la même cadhérine pour Pertz *et al.* (1999),
- de la cadhérine opposée de l'interaction trans pour Boggon *et al.* (2002).

Un troisième mode d'assemblage obtenu sur la C-cadhérine implique un recouvrement total de toute la partie extracellulaire des cadhérines pour l'interaction trans (Sivasankar *et al.*, 1999, 2001; Chappuis-Flament *et al.*, 2001) (voir Fig. 1.10 C).

Ce troisième modèle d'assemblage semble aussi valable pour la VE cadhérine, qui possède de plus la propriété de s'associer sous forme d'hexamère. Le groupe de D. Gulino a ainsi produit les quatre premiers fragments de la partie extracellulaire de la VE cadhérine et montré que ceux-ci s'associaient pour former des hexamères (voir Fig. 1.11) (Bibert *et al.*, 2002). Ils ont obtenu une longueur de 233 Å pour leurs hexamères, en accord avec la distance mesurée entre les membranes de jonctions adhérentes par cryomicroscopie électronique.

1.2.3.3 Complexe cytoplasmique et régulation de l'adhésion.

La formation d'une jonction adhérente ne consiste pas simplement en la mise en commun des cadhérines entre deux cellules. C'est un processus plus complexe : il nécessite la mise en place d'un complexe cytoplasmique qui relie les cadhérines au cytosquelette d'ac-

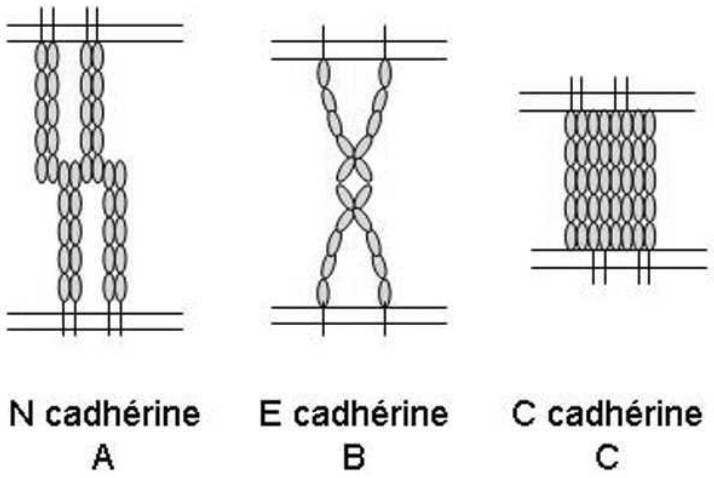

Fig. *1.10: Modèle d'interaction homophilique des cadhérines. A : Shapiro et al. (1995) ; B : Nagar et al. (1996); Pertz et al. (1999) ; C : Sivasankar et al. (1999, 2001); Chappuis-Flament et al. (2001).*

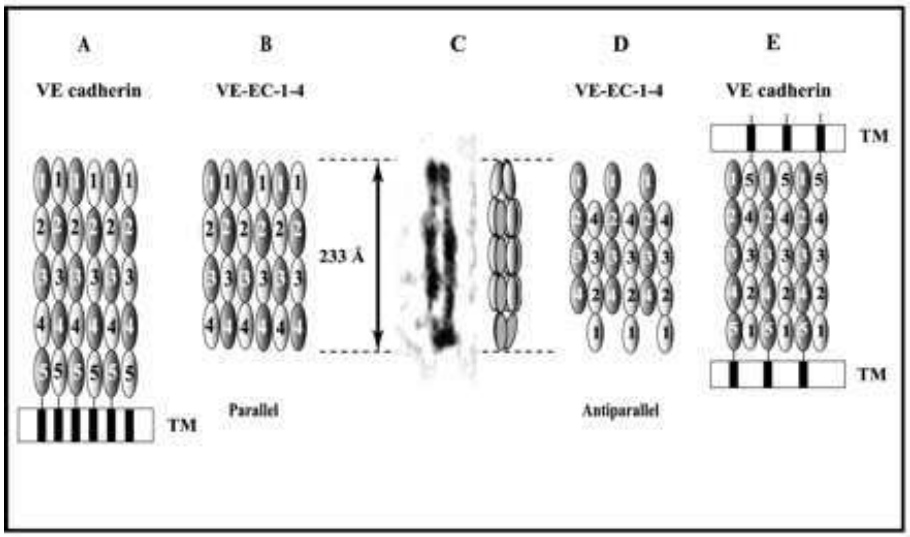

Fig. *1.11: Modèle pour l'orientation des VE-cadhérines aux contacts cellule-cellule des jonctions endothéliales. A et B, orientation parallèle de 6 cadhérines ; C cryo-electron microscopy d'un hexamère de cad1-4 et modèle de trans-interaction hexamérique ; D, projection dans le plan du modèle proposé en C ; E : même représentation pour des cadhérines entières (TM : transmembrane domain) (Bibert et al., 2002).*

tine. L'ancrage au cytosquelette est indispensable pour le développement d'une adhésion forte (Tsuruta *et al.*, 2002; Vasioukhin *et al.*, 2000). Cette connection se fait par l'inter-

médiaire de l'α-caténine, qui se lie d'un côté à la β et γ caténine et de l'autre à l'actine soit directement, soit indirectement (voir Fig. 1.12 gauche).

La cellule peut réguler cette adhésion, en modifiant les protéines composant le complexe ainsi que le nombre de cadhérines à sa surface. Elle peut aussi phosphoryler ou non les molécules du complexe adhésif. Ces moyens lui permettent de modifier son énergie d'adhésion. Ces mécanismes de régulation sont au centre de nombreuses études et sont encore loin d'être totalement compris (pour une revue voir Perez-Moreno *et al.* (2003)). L'enjeu est en effet important car la dérégulation de ces mécanismes est une des caractéristiques des cellules cancéreuses. Les paragraphes suivant présenteront quelques éléments de cette régulation.

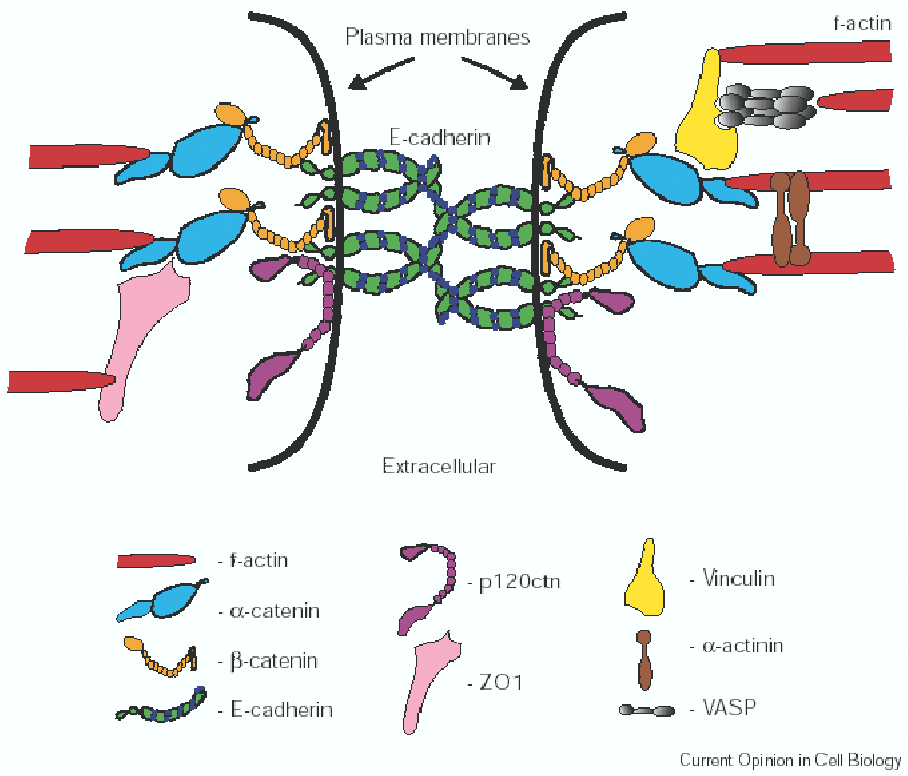

FIG. *1.12: Schéma représentant les protéines du complexe cytoplasmique reliant la cadhérine à l'actine, tiré de (Vasioukhin & Fuchs, 2001).*

i) Les GTPases

Les GTPases sont des petites protéines servant d'interrupteurs moléculaires. Elles permettent lorsqu'elle sont actives, c'est-à-dire liées à une molécule de GTP, d'activer des voies de signalisation cellulaire. Les enzymes sous la forme GDP (forme hydrolysée du

GTP) sont, en revanche, inactives. Les formes GTP et GDP de ces enzymes constituent donc les deux états fermé et ouvert de l'interrupteur.

Il a été montré récemment que les GTPases Rac et Cdc42 étaient activées par l'interaction cadhérine-cadhérine (Kovacs *et al.*, 2002a; Nakagawa *et al.*, 2001). Cette activation entraînerait ensuite un réarrangement du cytosquelette d'actine (Lambert *et al.*, 2002). Un des rôles majeurs de Cdc42 et Rac est de séquestrer IQGAP1, pour l'empêcher d'interagir avec la β-caténine. La β-caténine est alors libre de s'accrocher à la cadhérine et à l'α-caténine, la cadhérine est ainsi reliée à l'actine (voir Fig. 1.13) (Fukata *et al.*, 1999a,b; Kuroda *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999).

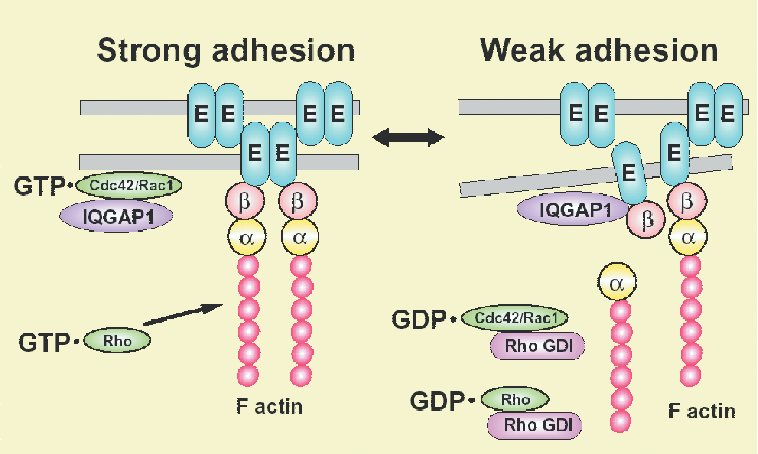

Fig. *1.13: Rôle de la protéine IQGAP1 : libre, elle empêche l'α-caténine de se lier et de former la liaison au cytosquelette. Rac actif permet de complexer cette protéine et permet une adhésion forte (extrait de (Fukata et al., 1999b)).*

ii) Gα12/Gα13 sous-unités des protéines G.

La forme liée au GTP de cette protéine peut se lier à la partie cytoplasmique des cadhérines et entraîner le relargage de la β-caténine et détruire l'adhésion cellulaire (Meigs *et al.*, 2001, 2002; Kaplan *et al.*, 2001).

iii) p120

Cette protéine qui se lie à la partie juxtamembranaire de la cadhérine est aussi une protéine clé pour la régulation de cette adhésion (Anastasiadis & Reynolds, 2000). Ainsi, une cellule dont les cadhérines ne peuvent pas lier p120 est incapable de former des jonctions adhérentes stables (Yap *et al.*, 1998; Ireton *et al.*, 2002). De récents résultats ont montré

que p120 jouait un rôle critique dans la voie de signalisation reliée à Rac (Goodwin *et al.*, 2003). En effet, si on mute la cadhérine pour empêcher sa liaison à p120, on observe que Rac n'est plus activé, et que l'adhésion cadhérine-cadhérine apparaît très faible (ce qui est cohérent avec le paragraphe sur Rac).

On voit ici que l'activation de liaisons cadhérines-cadhérines entraîne des mécanismes complexes de signalisation cellulaire. Grâce à eux, la cellule est capable de réguler son adhésion. L'existence d'une telle complexité, doit-elle décourager pour autant des descriptions de la dynamique de formation des contacts par des lois d'assemblage obéissant à des lois physiques simples ? La réponse est non. La régulation cellulaire permet simplement de modifier la valeur de certains paramètres physiques. Par exemple, une cadhérine liée au cytosquelette présentera un coefficient de diffusion différents des cadhérines libres. Il faudra simplement tenir compte des gammes de variations de ces paramètres dans des modèles faisant intervenir les coefficients de diffusion. Il ne faut donc pas s'effrayer de ces phénomènes de régulation. Une connaissance approfondie de leur fonctionnement, permet d'insérer en fonction de l'environnement cellulaire des valeurs correctes des paramètres d'adhésion dans les modèles.

1.2.3.4 Dynamique.

Outre les études structurales sur l'adhésion cadhérine-cadhérine et les études de signalisation liées à la composition protéique des complexes adhésifs, quelques travaux se sont intéressés à la dynamique de formation cellulaire des jonctions adhérentes.
Adams *et al.* (1998) ont par exemple décrit les différents stades de l'adhésion lors de la formation de jonctions adhérentes dans des cellules MDCK transfectées de façon stable avec la E-cadhérine GFP. Dans un premier temps, les membranes entrent en contact et forment des agrégats immobiles à partir de cadhérines diffusant librement dans la membrane. Ces agrégats colocalisent avec l'extrémité de filaments d'actine qui sont reliés au câble d'actine circulaire qui entoure la cellule (voir Fig. 1.14 I).

Dans un deuxième temps, ce câble d'actine circulaire se scinde aux niveaux des contacts et les deux extrémités se placent à la périphérie de la zone de contact. Au même moment, les noyaux de E-cadhérines viennent s'agréger sur ces bords et former de larges plaques (Fig. 1.14 II). Le câble entoure les deux cellules, la compaction est maximale.

Dans un troisième temps lorsque trois cellules au moins sont en contact, les câbles d'actine liés aux plaques de E-cadhérines se tendent, ce qui entraîne la coalescence de plaques individuelles aux points de jonction des cellules (voir Fig. 1.14 III). Une fois encore cela permet d'atteindre une compaction maximale : l'ensemble des cellules s'organisent en un disque.

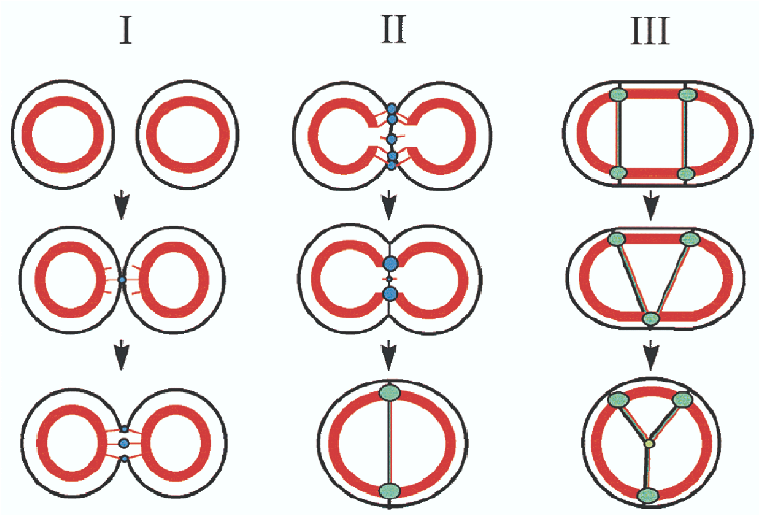

Fig. *1.14: Description de la dynamique de formation des jonctions adhérentes par Adams et al. (1998). Voir texte.*

Vasioukhin *et al.* (2000) ont eux utilisé des techniques de microscopie électronique et d'immunofluorescence pour étudier la dynamique de formation de jonctions E-cadhérines, mais sur des lignées primaires de Kératinocytes. Ils ont montré que les premiers stades de développement des jonctions consistaient en la formation de filopodes qui pénètrent dans la cellule voisine et forment des agrégats de cadhérines à leur extrémité (voir Fig. 1.15). Les doigts des cellules opposés s'entremêlent et forment ainsi une double rangée de points d'adhésion. Les membranes sont ensuite attachées ensemble par la formation de desmosomes composés de vinculine, zyxin, VASP et MENA. L'actine se réorganise alors pour que les points puissent fusionner et sceller les bords de la cellule.

1.2.4 Conclusion.

Les biologistes se sont évidemment beaucoup intéressés aux voies de signalisation reliées aux cadhérines, puisque mieux comprendre ces voies c'est aussi mieux comprendre comment les mécanismes d'adhésion cellulaire peuvent se dérégler. A ces travaux, il faut ajouter

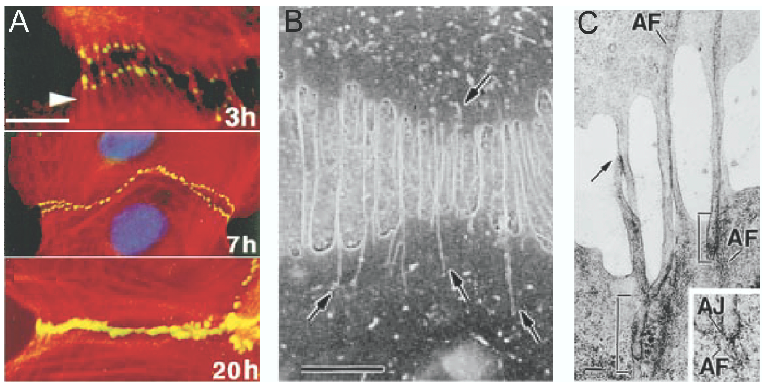

FIG. *1.15: Description de la dynamique de formation des jonctions adhérentes par Vasioukhin et al. (2000). A : Images d'immunofluorescence des contacts cellules-cellules à différents temps. L'actine apparaît en rouge et les E-cadhérines en jaunes. La barre représente 10 µm. B : Image de microscopie électronique de kératinocytes trois heures après le début de formation des jonctions. Les flèches montrent les filopodes montant sur la cellule voisine. La barre représente 5 µm. C : Image de microscopie électronique montrant une paire anti-parallèle de filopodes faisant des contacts cellule-cellule à leur extrémité dans la membrane opposée (encadré). La barre représente 200 nm.*

ceux sur la structure des cadhérines et ceux sur la dynamique d'assemblage des jonctions adhérentes. La description des différents stades de formation des contacts cadhérines-cadhérines dans ces derniers articles se fait toujours en parallèle avec celle du réseau d'actine. Il est très clair pour leurs auteurs, que ce réseau impose la géométrie des contacts et leur dynamique. Ces études restent toujours très descriptives, les mécanismes permettant, par exemple, de passer les différentes étapes (I, II, III) dans les travaux d'Adams *et al.* (1998) sont encore très mal compris.

1.3 Physique de l'adhésion.

1.3.1 Etude théorique.

Les physiciens ont essayé eux-aussi de comprendre les mécanismes régulant l'adhésion cellulaire. La modélisation la plus simple de la cellule a d'abord été une simple vésicule : c'est-à-dire une bicouche lipidique fermée. Nous verrons que l'interaction entre bicouches lipidiques a été très étudiée et que l'on connaît maintenant assez bien les forces en jeu

dans ce phénomène. Mais, l'adhésion cellulaire n'est pas le simple résultat d'interaction entre bicouches phospholipidiques ; elle est due à l'adhésion spécifique de couples ligands-récepteurs. Des premiers modèles ont pris en compte ces nouvelles interactions en intégrant des paramètres tels que les coefficients de diffusion de ces molécules, leurs taux d'attachement et de détachement. Mais, cela ne suffisait pas à décrire complètement les phénomènes observés en biologie et en particulier la distribution inhomogène de ces récepteurs sur la surface d'adhésion. Les théoriciens ont alors intégré les paramètres de membrane et montrer que les propriétés d'élasticité membranaire peuvent engendrer des forces d'attraction entre molécules d'adhésion permettant d'expliquer leur agrégation. Par contre, aucun modèle jusqu'à présent ne tient compte du cytosquelette cellulaire.

1.3.1.1 Adhésion entre deux membranes.

i) Bicouches artificielles.

De nombreuses études ont été faites sur la nature des interactions qui existent entre bicouches lipidiques (pour une revue, voir (Israelachvili, 1985)). Il a été montré que la force d'attraction dominante était la force de Van der Waals :

$$W = \frac{-A}{12\pi d^2} \text{ par unité d'aire,} \tag{1.2}$$

où A est la constante de Hamaker et d la distance entre bicouches. Les forces de répulsion ont, elles, de multiples origines :

- électrostatique (elle dépend du pH et de la salinité, elle est faible dans les milieux physiologiques car la longueur de Debye y est faible). Le modèle DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek) prend en compte cette interaction et celle de Van der Waals. La courbe 1.16 montre le résultat de ces interactions, elle peut présenter un minimum secondaire pour des distances de l'ordre de quelques nanomètres et des énergies par unité de surface de l'ordre du $\mu J.m^{-2}$.
- hydratation (courte portée)
- stérique (longue portée), voir Fig. 1.17 :
  - ondulation.
  - péristaltique.
  - protrusion.

  Les forces d'ondulation sont celles qui ont la plus longue portée et sont celles dont on tient en compte dans les modèles d'adhésion sur les vésicules. Helfrich (1973) a

montré que force pouvait s'écrire : $\frac{(k_bT)^2}{2\kappa d^3}$ par unité de surface, où κ est le module de courbure de la membrane et d la distance intermembranaire.

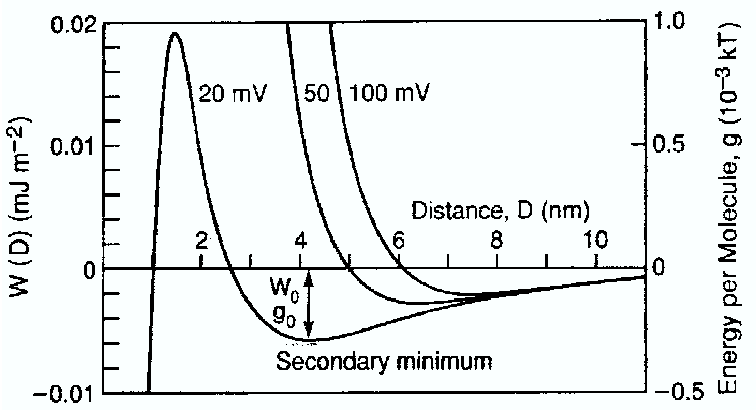

FIG. *1.16: Modèle DLVO d'interaction entre deux surfaces amphiphiles avec 0.15 M de NaCl. La constante de Hamaker est prise égale à* $6 \times 10^{-21} J$. *Les surfaces sont supposées interagir avec un potentiel de surface constant* Ψ_0. *Les trois courbes à* Ψ_0*=100, 50, 20 mV correspondent à une densité de charges surfaciques respectives de 1 électron pour 1, 3, 8.5* nm^2. *L'énergie par molécules est calculée pour une aire par molécule* $a_0 = 0.4nm^2$. *Extrait de Israelachvili (1985).*

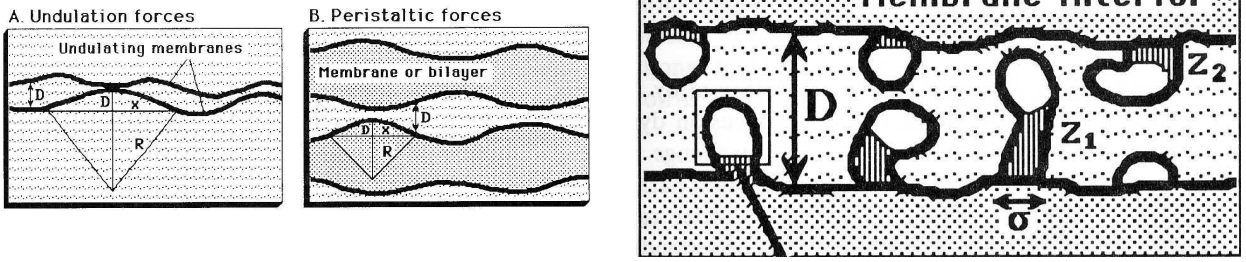

FIG. *1.17: A gauche : chaque bicouche ondule sous l'effet de l'agitation thermique et repousse l'autre (force d'ondulation). Les bicouches peuvent gonfler par endroit et donc à nouveau repousser localement l'autre bicouche (force péristaltique). A droite : des protrusions dans les membranes en opposition vont se gêner et entraîner elles aussi une répulsion stérique. Figures extraites de (Israelachvili, 1985).*

ii) Membranes biologiques.

L'adhésion n'est pas due aux forces de Van der Waals, mais à la formation de liens faibles (1 à 20 k_bT), mais très spécifiques entre une paire de protéines complémentaires que nous

appellerons par la suite : Clés C, et Serrures S [3] (Springer & Barondes, 1982; Edelman, 1983). L'énergie de liaison des molécules Clés-Serrures semblent tout-à-fait appropriée pour des molécules d'adhésion. Si l'énergie était plus faible que k_bT, la liaison ne résisterait pas aux fluctuations thermiques. Et si elle était trop importante, les contacts seraient impossible à défaire. Cela nuirait aux facultés d'adaptation de la cellule et aussi à son déplacement qui nécessite à tout instant formation et détachement des liens adhésifs.

1.3.1.2 Modèle de Bell-Dembo-Bongrand.

Le modèle développé par Bell, Dembo et Bongrand a permis une grande avancée dans la compréhension des phénomènes physiques régulant l'adhésion cellulaire. Ce modèle la décrit comme le résultat d'une compétition entre deux mécanismes opposés. Il prend d'abord en compte l'interaction Clé-Serrure citée précédemment et l'oppose à la force de répulsion entre les cellules due à la pression osmotique des lipo-polysaccharides (glycocalix) qui ornent la membrane et qui sont comprimés lorsque deux cellules entrent en contact. L'existence d'une telle force de répulsion se base sur des faits expérimentaux qui montrent que même lorsque de nombreuses molécules C-S sont présentes à la surface cellulaire, il faut amener les cellules en contact très proche pour qu'elles puissent adhérer (Capo *et al.*, 1982). La portée de cette répulsion est de 500 à 1000 Å, elle est beaucoup plus importante que celles des forces entre bicouches lipidiques (voir §1.3.1.1) en milieu salin, qui est au maximum de quelques dizaines de nanomètres. Cette force de répulsion empêche l'adhésion non spécifique des membranes lipidiques. Les molécules Clés-Serrures permettent alors une régulation fine de l'adhésion. La figure 1.18 schématise ce modèle.

Bell *et al.* (1984) ont traité les molécules Clés-Serrures comme une solution idéale à 2D, où C et S sont en équilibre chimique avec le complexe ligand-récepteur CS : $C + S \rightleftarrows CS$. Cela leur permet ensuite de calculer la différence d'énergie libre ΔG entre l'état lié où les cellules sont accolées et l'état non lié où les cellules sont séparées.

$$\Delta G = ((N_{1t} - N_b)\mu_1(n_1) - N_{1t}\mu_1(N_{1t}/A_1)) + ((N_{2t} - N_b)\mu_2(n_2) - N_{2t}\mu_2(N_{2t}/A_2))$$
$$+N_b\mu_b(n_b, S) + A\Gamma(S).$$

Les indices i=1,2 font référence aux cellules 1 et 2. N_{it} représente le nombre total de molécules d'adhésion portées par la cellule i. N_b représente le nombre total de couples Clés-Serrures entre la cellule 1 et 2. μ_i représente le potentiel chimique des récepteurs

[3] dans le cas d'une adhésion homotypique, C et S représentent la même protéine

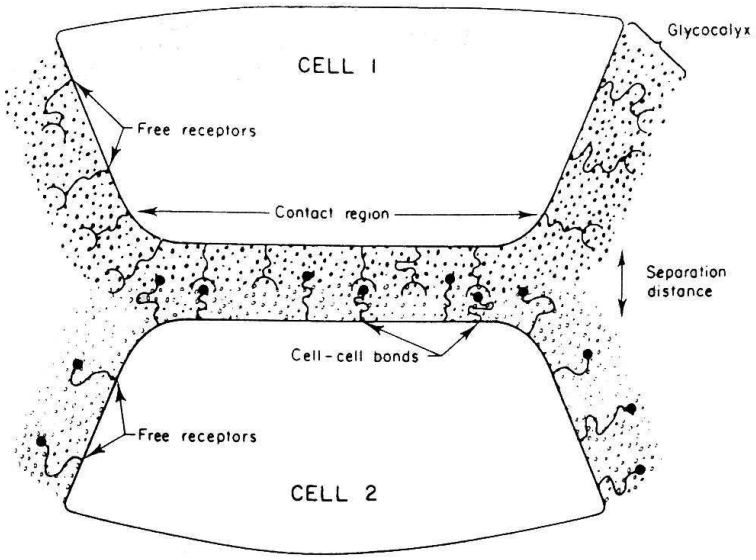

FIG. *1.18: Le modèle de Bell-Dembo-Bongrand explique l'adhésion de deux cellules par la compétition entre les interactions ligand-récepteur et la répulsion liée au glycocalyx (tiré de (Bell et al., 1984)).*

libres de la cellule i, alors que μ_b est le potentiel chimique du couple Clé-Serrure. S est la distance entre les membranes des deux cellules dans la zone d'adhésion. A_i représente la surface totale de la cellule i, et A la surface de la zone de contact. Enfin, Γ est l'énergie libre par unité de surface de la répulsion non-spécifique entre les membranes. Les auteurs minimisent ensuite cette énergie par rapport à N_b, A et S. Il faut que les solutions obtenues puissent satisfaire aux contraintes qui existent sur ces paramètres :

- $0 < S$
- $0 \leq N_b \leq min(N_{1t}, N_{2t})$
- $0 \leq A \leq A_{max} \leq min(A_1, A_2)$

Les solutions se divisent en trois groupes. Il existe des régions dans l'espace des paramètres où $A = 0$: les cellules n'adhérent pas, des régions où $A < A_{max}$ et enfin une région où $A = A_{max}$.

Ils peuvent donc ainsi déterminer en fonction des paramètres de départ (N_{it}, Γ, A_i, μ_i^0), si oui ou non les cellules adhèrent et calculer leur forme.

Une des hypothèses de ce modèle est que la répartition en ligands et récepteurs à l'intérieur du disque d'adhésion est homogène. Or, les observations montrent que la répartition des complexes d'adhésion est inhomogène, ceux-ci ont tendance par exemple à migrer en

bordure du disque (Tozeren *et al.*, 1989), ou à se concentrer dans des points focaux d'adhésion entre la cellule et un substrat recouverts de protéines de la matrice extracellulaire. Pour expliquer ces phénomènes, il faudra abandonner l'approximation de solution idéale et tenir compte des propriétés élastiques de la membrane.

1.3.1.3 Attraction entre les protéines due à la répulsion de deux membranes.

Au même moment, paraissait une étude s'intéressant à l'agrégation des protéines d'adhésion dans les jonctions communicantes (Braun *et al.*, 1984; Abney *et al.*, 1987). Dans ces jonctions, une interaction homophilique s'établit entre protéines d'adhésion des membranes en vis-à-vis et résulte en la formation de paires de protéines interagissant de façon "trans" et s'agrégeant pour former les jonctions. L'étude de clichés de microscopie électronique permet de localiser très précisément ces paires de protéines à l'intérieur de la plaque d'adhésion. Une analyse statistique de ces positions permet de remonter à la nature des interactions entre paires de protéines. Leur résultat a mis en évidence l'existence d'une unique force de répulsion à courte portée. Comment expliquer alors que ces protéines soient agrégées ? Il existe une force d'attraction à longue portée qui peut agir comme une force de pression effective obligeant les protéines à s'agréger, mais ne contribuant pas à la fonction de corrélation de paires de protéines adjacentes dans la phase agrégée. Braun *et al.* (1984) ont proposé deux types de mécanismes :

1. une attraction entre protéines due à la perturbation qu'elles entraînent sur les lipides avoisinants lorsqu'elles sont insérées dans une membrane (voir Fig. 1.19).
2. une interaction entre protéines via les propriétés élastiques de la membrane. La répulsion entre les membranes que les protéines d'adhésion tiennent rapprochées favorisent leur agrégation (voir Fig. 1.20). Lorsque les jonctions sont rassemblées en un seul agrégat, les membranes peuvent se séparer et abaisser l'énergie de répulsion. Celle-ci peut être soit d'origine électrostatique, soit d'origine stérique (glycocalyx).

Les premières études concernant le mécanisme 1, ont été menées par Marcelja (1976) et Owicki & McConnel (1979). Ils montrèrent qu'en prenant en compte les variations en épaisseur et en surface par amphiphile engendrées par des inclusions dans une membrane, on trouvait une interaction attractive à courte portée induite par la membrane. Ces variations des paramètres de la membrane entraînait en effet un terme de compression et un terme de tension de surface dans l'énergie, expliquant l'existence de ces forces. Huang (1986) prit ensuite en compte un troisième terme, une énergie de courbure. Cela lui permit d'expliquer des résultats expérimentaux sur le temps de vie de canaux de gramicidine

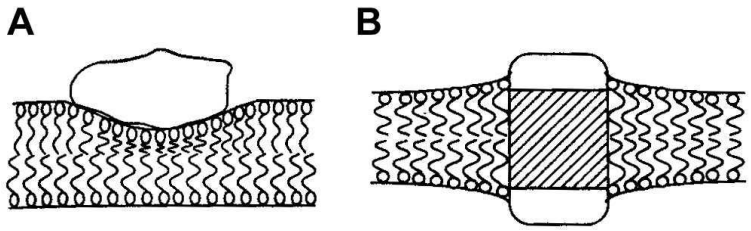

FIG. *1.19: Effet de l'insertion de protéines dans une membrane. La protéine peut déformer la membrane de deux façons : par adsorption et seule une des membranes est affectée (A), ou par absorption et les deux monocouches sont déformées (B). Source : Aranda Espinoza et al. (1996).*

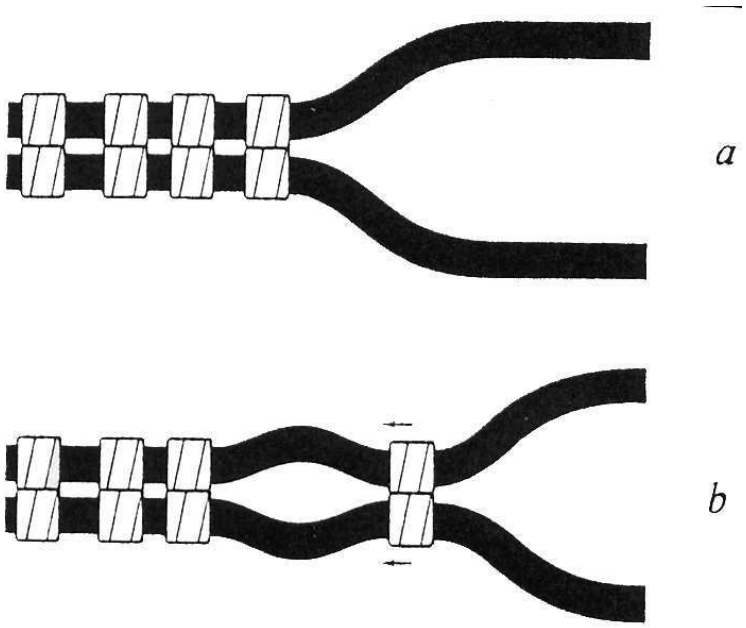

FIG. *1.20: L'éloignement d'un couple de protéines adhésives de l'agrégat (a → b) réduit la distance entre des membranes qui ont naturellement tendance à se repousser. b est donc énergétiquement moins favorable que a. Source : Braun et al. (1984).*

inclus dans une membrane qui se séparent en deux morceaux sous l'effet des forces qu'ils créent en déformant la membrane (Elliot *et al.*, 1983). Par la suite, d'autres raffinements ont été apportés à ces modèles (par exemple, l'étude de l'effet d'une courbure spontanée des monocouches composant la bicouche (Dan *et al.*, 1993)). Des expériences sur système modèle sont venues confirmer ce genre de théorie. Ainsi, Koltover *et al.* (1999) ont observé l'agrégation de colloïdes sur des vésicules géantes. Ces particules induisaient de fortes distortions de la membrane, qui a leur tour entraînaient l'agrégation des particules.

Concernant le deuxième mécanisme, Bruinsma *et al.* (1994) ont montré, qu'en effet, si l'on prenait en compte l'énergie associée à la courbure de membrane, on trouvait une pression à longue portée assez importante pour expliquer l'agrégation des jonctions. Ils ont étudié deux régimes :

- Le régime de Van der Waals, où la rigidité de courbure est supposée trop grande pour permettre les fluctuations de membrane. La distance entre les membranes imposée par les jonctions étant plus petite que la distance d'équilibre, les membranes se repoussent au niveau des jonctions. Il obtient l'expression d'une pression négative expliquant l'agrégation.
- Le régime d'Helfrich où cette fois la rigidité de courbure est faible, les membranes fluctuent et se repoussent. Dans cette configuration, ils obtiennent une force d'attraction qui croît de façon logarithmique avec la distance entre proches voisins. Menes & Safran (1997) ont étudié plus en détail ce régime en y ajoutant un terme de pression obligeant les membranes à rester liées à l'infini. Ils ont pu calculer la forme des membranes, près des sites de liaisons Clés-Serrures. Celles-ci se repoussent très fortement. Ils ont aussi prédit l'agrégation des protéines via les fluctuations de membrane.

1.3.1.4 Ajout d'une interaction via la membrane dans le modèle de Bell-Dembo-Bongrand.

Zuckerman & Bruinsma (1995, 1998) reprirent enfin le modèle de Bell, Dembo et Bongrand, en ajoutant l'ingrédient d'interaction entre des molécules Clés-Serrures via la membrane développé dans le paragraphe précédent. Ceci leur permit de résoudre le problème d'inhomogénéités de la surface d'adhésion que ne prévoyait pas le modèle de Bell, car il n'incluait pas d'interaction entre les protéines.

Ils purent écrire le Hamiltonien d'interaction comme une somme de trois termes :

$$H = H_{el} + H_{glyc} + H_{LR}$$

où H_{el} représente l'énergie de courbure élastique de la membrane, H_{glyc} la contribution de la répulsion due aux sucres et H_{LR} le Hamiltonien d'interaction ligand/récepteur.

Malgré le très grand nombre de protéines membranaires présentes dans la membrane cellulaire, il est possible de la décrire par un petit nombre de paramètres (Safran, 1994). Le Hamiltonien de courbure élastique de la membrane dans le cas d'une vésicule s'écrit alors :

$$H_{el} = \frac{\kappa}{2} \int \int_{surface} \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)^2 + \gamma A - \Pi V \tag{1.3}$$

où κ est l'énergie de courbure de la membrane, R_1 et R_2 les rayons de courbure principaux, γ la tension de la vésicule de surface A et de volume V et Π la différence de pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule.

On peut considérer les sucres portés par les phospholipides comme une brosse de polymères (glycocalix). Dans le cas de polymères chargés, l'interaction ionique est prépondérante. On écrit donc simplement la pression osmotique comme : $\Pi(h) = \frac{z\varphi}{h} k_B T$ où φ est la densité surfacique de polymère, z la charge par macro-molécule et h la distance intermembranaire supposée être légèrement plus faible que l'épaisseur moyenne h_{glyc} de la brosse. Sous faible compression, le Hamiltonien dû au glycocalix s'écrit alors :

$$H_{glyc} = \frac{z k_B T \varphi}{h_{glyc}} \int d^2 \left[h_{glyc} - h(\vec{r}) \right]$$

En ce qui concerne l'interaction ligand/récepteur, on suppose qu'une des vésicules ne présente que des ligands et l'autre que des récepteurs en quantité égale. On fait l'hypothèse que M liaisons d'énergie E_B sont formées et que les complexes diffusent librement dans la membrane avec toutefois un rayon de sphère dure a_0 pris en compte dans le potentiel d'exclusion réciproque V_p. Ce Hamiltonien est donc composé de trois parties :

$$H_{LR}[h] = -ME_B + \sum_{i<j} V_p \left(\left| \overrightarrow{R_i} - \overrightarrow{R_j} \right| \right) + \frac{\gamma}{2} \int d^2 r \left(\overrightarrow{\nabla} h \right)^2$$

qui correspondent respectivement à l'énergie d'adhésion ligand/récepteur, au potentiel d'exclusion entre complexes et à l'énergie élastique supplémentaire due aux déformations de la membrane introduites par les points de piégeage des protéines Clés-Serrures. L'intégrale est calculée sur la surface du disque d'adhésion. En notant u le rayon du disque d'adhésion et τ la tension de ligne de ce disque, on obtient après calculs l'Hamiltonien complet :

$$H = \frac{\gamma}{2} \int d^2 r \left(\overrightarrow{\nabla} h \right)^2 + \frac{1}{2} \sum_{i \neq j} V_p \left(\overrightarrow{R_i} - \overrightarrow{R_j} \right) - ME_B + \frac{z k_B T \varphi}{h_{glyc}} \int d^2 \left[h_{glyc} - h\left(\vec{r}\right) \right] + \frac{\pi}{2} \gamma \frac{u^4}{R^2} + 2\pi u \tau,$$

les intégrales respectant les conditions de piégeage.

Leurs principaux résultats sont décrits par le diagramme de phase de la figure 1.21. L'axe horizontal représente la tension membranaire, et l'axe vertical la pression due au glycocalix. La ligne en pointillé représente la pression critique $p_T^{(0)}$ de rupture de l'adhésion obtenue par Bell *et al.* (1984) dans leur modèle qui ne prenait pas en compte les interactions entre protéines via la membrane.

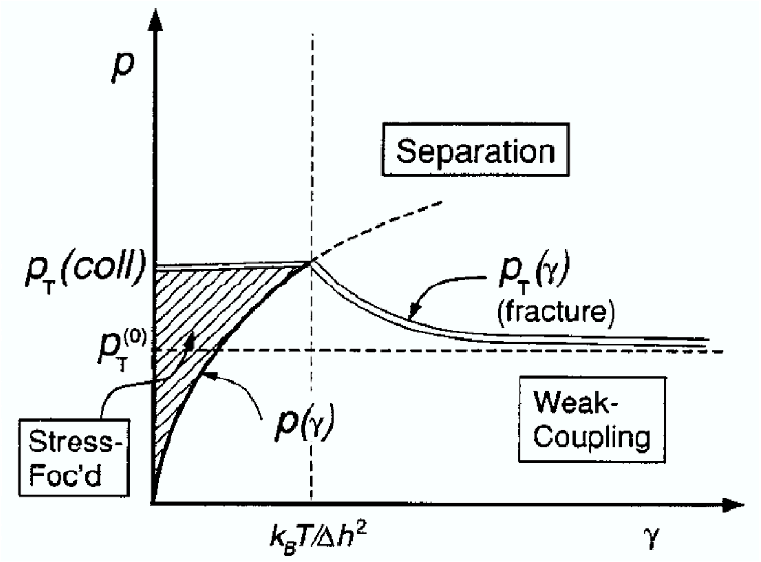

Fig. *1.21: Diagramme de phase obtenu par Zuckerman & Bruinsma (1998).*

Augmenter p conduit à la rupture d'adhésion décrite par la double ligne $p_T(\gamma)$. Pour des valeurs de γ importantes (i.e. $\gamma \gg \frac{k_bT}{\Delta h^2}$, où $\Delta h = h_{glyx} - h_{CS}$ avec h_{glyx} est l'épaisseur du glycocalyx et h_{CS} est la distance entre membrane imposée par la liaison clé-serrure), $p_T(\gamma) \simeq p_T^{(0)}$ du modèle de Bell. Si on réduit γ on s'approche de la frontière marquée $p(\gamma)$ où les molécules d'adhésion se concentrent pour ne former qu'un agrégat.

La force d'adhésion de cet unique agrégat $p_T(coll)$ est très supérieure à $p_T^{(0)}$ (à condition que l'énergie d'adhésion entre C et S, E_B soit significativement supérieure à k_BT).

Les auteurs se sont intéressés à la pertinence de ce modèle en biologie. Par exemple, dans les premiers stades de développement des jonctions adhérentes, lorsque les cadhérines ne sont pas liées au cytosquelette d'actine, celles-ci pourraient s'agréger selon le modèle évoqué ci-dessus : l'attraction des protéines via la membrane provoquerait leur agrégation. Le fait qu'on observe plusieurs points focaux d'adhésion et non un seul comme le prévoit la théorie pourrait être due à une cinétique de décomposition conduisant à la formation d'agrégats dans des endroits distincts.

1.3.1.5 Autre modèle proposé par le groupe de Lipowsky.

i) Un cadre très général

Le groupe de Lipowsky utilise un autre formalisme pour décrire l'adhésion entre deux

membranes ou entre une membrane et un substrat (Weikl *et al.*, 2000; Weikl & Lipowsky, 2001; Weikl *et al.*, 2002). Ils prennent un réseau de taille a et deux champs définis sur ce réseau : l_i (distance entre les membranes) et $n_k(i)$ (densité des différents types k de molécules attractives ou répulsives). Ils écrivent ensuite le Halmitonien grand canonique :

$$H(l, n_k) = \sum_i \left(\frac{\kappa}{2a^2} (\Delta_d l_i)^2 + \frac{\sigma}{2} (\nabla_d l_i)^2 \right) + \sum_{i,k} (V_g(l_i) + n_k(i)(V_k(l_i) - \mu_k)) + \sum_{i,j,k} W_{i,j,k} n_k(i) n_k(j)$$

La première somme représente le terme élastique, où $\kappa = \frac{\kappa_1 \kappa_2}{(\kappa_1 + \kappa_2)}$ et $\sigma = \frac{\sigma_1 \sigma_2}{(\sigma_1 + \sigma_2}$ avec κ_i et σ_i respectivement modules de courbure et tensions des deux membranes. Δ_d et ∇_d sont respectivement le laplacien et le gradient discrétisés. Le deuxième terme représente l'interaction "trans", V_g correspond au potentiel d'interaction des deux membranes nues, V_k est le potentiel d'interaction "trans" des particules de type k, et μ_k représente leur potentiel chimique relatif. Enfin, la troisième somme représente les termes d'interaction "cis" entre les molécules d'une même membrane, où W est l'énergie d'interaction.

Weikl *et al.* ont alors étudié différents cas présentant une séparation de phase avec coexistence de deux zones : une riche en protéines d'adhésion et une où celles-ci étaient en quantité beaucoup plus faible.

ii) Séparation de phases d'origine entropique.

Si l'on prend en compte une seule sorte de molécule (les "stickers"), celles-ci vont s'agréger sous l'effet des fluctuations de membrane si :

1. on ajoute des interactions "cis" entre "stickers" renormalisées par la forme des fluctuations de membrane (Weikl & Lipowsky, 2001),
2. ou si les "stickers" ont une rigidité supérieure à celle de la membrane (Weikl & Lipowsky, 2001)
3. ou bien encore si les "stickers ont une taille latérale supérieure à celle des molécules non-adhésives. (Weikl *et al.*, 2000).

iii) Séparation de phase d'origine non-entropique.

Weikl *et al.* ont trouvé d'autres mécanismes provoquant cette séparation de phase :

1. si l'on introduit une autre sorte de molécules dans la membrane les "repellers" qui ont un potentiel répulsif (Weikl & Lipowsky, 2001),
2. si l'adhésion des "stickers" est en compétition avec une répulsion non spécifique des membranes à courte portée. L'interaction effective prend alors la forme d'une barrière de potentiel qui a pour conséquence l'apparition d'une tension de ligne entre les parties liées et non-liées des membranes (Weikl *et al.*, 2002).

Ces deux mécanismes entraînent la séparation de phase entre les zones riches en "stickers" et celles qui en sont dépourvues. Cette fois, les fluctuations entropiques ne sont pas en cause, elles ont même tendance lorsqu'elles existent à empêcher cette séparation.

En conclusion, grâce aux propriétés élastiques des membranes, on peut théoriquement expliqué l'agrégation de protéines adhésives. Ces modèles prennent en compte de nombreux paramètres cellulaires tels que le module de courbure membranaire, la tension membranaire mais aussi des paramètres moléculaires (cinétiques d'association ligand-récepteur). De nombreuses études expérimentales se sont attachées à fournir de telles valeurs.

1.3.2 Etudes expérimentales.

1.3.2.1 Mesures de paramètres moléculaires et cellulaires d'adhésion.

Expérimentalement, il est nécessaire d'appliquer des forces pour obtenir des informations quantitatives sur les paramètres moléculaires et cellulaires d'adhésion. Il existe de nombreuses méthodes : flux hydrodynamique, AFM, piège optique... On peut ainsi mesurer des cinétiques et énergie de liens ligands- récepteurs (pour une revue voir Bongrand (1999)) ou bien des paramètres macroscopiques tels que l'énergie d'adhésion, les paramètres de tension et courbure de la membrane, dont nous avons vu toute l'importance dans les modèles d'adhésion. Voici quelques exemples des mesures et différentes techniques utilisées sur des protéines d'adhésion *in vitro*, des vésicules contenant ces protéines d'adhésion, ou sur des cellules.

i) L'AFM est une méthode de choix pour étudier l'interaction des liaisons ligands-récepteurs *in vitro*. Nous en avons vu un exemple au §1.1.3.4.

ii) On peut aussi étudier les propriétés des couples Clés-Serrures *in vitro* en utilisant des flux hydrodynamiques. Pierres *et al.* (1998) ont par exemple greffé des cadhérines 11 sur des billes et des surfaces de verre. Ils ont ensuite observé le roulement intermittent des billes soumises à un flux sur ces surfaces. En analysant les positions, vitesses et accélérations

des billes, ils ont pu déduire le taux d'association des cadhérines soit environ $1.2 \cdot 10^{-3} s^{-1}$, ainsi que la portée de l'interaction (environ 10 nm).

iii) D'autre travaux ont été menés en parallèle sur des cellules. Decave *et al.* (2002) ont aussi utilisé des flux hydrodynamiques pour remonter à des paramètres moléculaires. Ces mesures ont été faites sur des cellules attachées par de multiples liens adhésifs au substrat (pas de roulement). A partir de la cinétique de détachement de cellules *dictyostelium*, ils purent en analysant leurs données grâce à un nouveau modèle de pelage remonter à des paramètres tels que le taux de dissociation des liens adhésifs ($k_{off}^0 = 10^{-2} s^{-1}$) et le nombre totale de molecules adhésives par unité de surface membranaire ($n_0 = 10^{16} m^{-2}$).

iv) Thoumine *et al.* (1999); Thoumine & Meister (2000) ont, eux, utilisé un système de microplaques pour appliquer des forces sur des plaques adhésives cellulaires. Des fibroblastes adhèrent sur une première microplaque rigide qui peut être déplacée à l'aide d'un piezoélectrique. Les cellules sont ensuite mises en contact avec une deuxième microplaque flexible, recouverte d'une densité connue de fibronectine. Ils laissent la cellule adhérer à cette microplaque pendant 5 minutes puis ils séparent les deux microplaques avec une vitesse contrôlée. A un temps seuil correspondant à la rupture de l'adhésion, l'aire de la zone de contact sur la microplaque flexible décroît jusqu'à s'annuler. La force à l'interface est calculée grâce à la déflexion de la microplaque souple. En comparant leurs données expérimentales à un modèle théorique de détachement, il purent déduire le taux de formation des liens adhésifs de $3 \cdot 10^{-4} \mu m^2/s$.

v) L'application de force permet aussi d'accéder à d'autres paramètres cellulaires non-moléculaires. Henon *et al.* (1999) ont par exemple utilisé des pièges optiques pour appliquer des forces calibrées sur la membrane d'érythrocytes via des billes de silices. Ils en déduisent un module de cisaillement μ à partir de mesures de déformation de la cellule dans un régime linéaire de faible tension ($\mu = 2.5 \pm 0.4 \mu N/m$).

vi) Simson *et al.* (1998) ont eux aussi employé un flux hydrodynamique pour obtenir cette fois des informations sur les paramètres d'élasticité de la cellule et son énergie d'adhésion. Le flux ici est faible et ne sert pas à détacher la cellule, mais à la déformer. La déformation induite par le flux sur les bords de la cellule est imagée par Reflection Interference Contrast Microscopy (RICM). Les formes obtenues sont expliquées en terme d'équilibre entre forces de tension et forces de courbure, sur la ligne de contact. Ils remontent ainsi aux valeurs de tension de membrane, courbure de membrane et énergie d'adhésion. Ils ont évalué ces paramètres sur des cellules *dictyostelium* au cortex d'actine

intact ou muté. Ils montrèrent par exemple que dans une cellule *dictyostelium* ne possédant pas de taline (protéine de liaison du cytosquelette à la membrane) le module de courbure était de 70 k_bT, au lieu de 390 k_bT pour une cellule non mutée.

vii) Enfin, au lieu d'appliquer des forces sur la cellule, on peut aussi observer comment celle-ci est elle-même capable d'exercer des forces. Nous avons vu par exemple au §1.2.2, que Balaban *et al.* (2001) ont observé, grâce à l'utilisation d'un substrat déformable, les forces engendrées par les câbles d'acto-myosine au niveau des contacts focaux. Tan *et al.* (2003) ont pu améliorer ces mesures en utilisant non pas des surfaces continues, mais des surfaces discrètes faites d'une multitude de microplots déformables. Cela leur permet de savoir très précisément où sont exercées les forces et quelles sont leur intensités et directions. La technique ne demande aucun calcul numérique et modélisation compliqués. Ils ont ainsi mis en évidence que la force exercée sur le substrat était proportionnelle à l'aire des contacts focaux lorsque ceux-ci avaient une taille supérieure à 1 μm^2 (ce qui confirmait les résultats de Balaban *et al.* (2001)). Ils montrèrent, en outre, que la force exercée sur des contacts de taille inférieure à 1 μm^2 n'était pas corrélée à leur aire.

1.3.2.2 Suivi des motifs d'adhésion sur système modèle.

D'autres études se sont attachées à suivre la cinétique de formation des contacts adhésifs dans des systèmes modèles.

i) Adhésion forte-Adhésion faible.

Le groupe de E. Sackmann en Allemagne a une forte expérience de l'adhésion de vésicules. Celles-ci peuvent contenir en surface différentes sortes de ligands et des polymères mimant le glycocalyx de la cellule. L'adhésion de ces vésicules sur des surfaces recouvertes des récepteurs appropriés est observée par RICM (Reflection Interference Contrast Microscopy). Différents couples ligands-récepteurs ont été utilisés :

- vésicules contenant des lipides biotinylés[4] adhérant sur une bicouche elle-même biotinylée via la streptavidine[4] (Albersdorfer *et al.*, 1997).
- vésicules contenant le récepteur homophilique, *contact site A* de *Dictyostelium discoideum*, adhérant sur une bicouche contenant le même récepteur (Kloboucek *et al.*,

[4]La biotine plus connue sous le nom de la vitamine H est une protéine qui possède une très forte affinité pour la streptavidine (protéine bactérienne). La constante d'association de la réaction biotine-streptavidine est de $10^{15}M$, ce qui correspond presque à une liaison covalente.

1999).

- Vésicules contenant un récepteur de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (peptides RGD) sur un substrat couvert de cette intégrine (Guttenberg *et al.*, 2001).

Ils ont montré que, dans ces trois systèmes, il existait deux types de zones d'adhésion : des zones d'adhésion forte où la membrane de la vésicule ne fluctue pas et des zones d'adhésion faible où la fluctuation membranaire est bien visible. Ces zones ont des aires typiques de quelques μm^2.

Cette coexistence de deux zones d'adhésion a pu être modélisée par Bruinsma *et al.* (2000). Les ingrédients du modèle exposé en 1.3.1.4 ont été repris, mais cette fois les molécules de glycocalyx ont été rendues mobiles (mais avec un potentiel chimique fixe). On obtient alors en réintroduisant des énergies d'interaction entre membrane pure (où la concentration de glycocalyx est quasi-nulle) un potentiel d'interaction à double puits, ce qui permet d'interpréter ces résultats. Si la concentration de molécules répulsives reste fixe, on obtient le potentiel classique d'interaction avec un seul puits. Les deux puits obtenus permettent d'expliquer les deux zones d'adhésion faible et forte.

ii) Cinétique d'adhésion.

En utilisant le même type de vésicules que celui décrit précédemment, et en greffant des concentrations de molécules adhésives différentes, Boulbitch *et al.* (2001) ont pu déduire des caractéristiques cinétiques d'adhésion. Ils ont montré que :

- pour des faibles concentrations de molécules adhésives, le déplacement du front de faible adhésion suit une loi en $\sqrt{t}$ limitée par la diffusion des molécules,
- pour de fortes concentrations, cette loi est linéaire en t, elle est seulement limitée par la cinétique d'association ligand-recepteur.

1.3.3 Conclusion.

Ces études permettent de comprendre comment des protéines peuvent s'agréger dans une membrane. Ces modèles semblent être parfaitement adaptés à l'étude de systèmes tels que les vésicules, où la membrane est le seul objet pouvant expliquer l'agrégation des protéines. Mais, ceux-ci peuvent-ils être appliqués aux systèmes cellulaires ? Est-ce réellement pertinent, étant donné que le cytosquelette n'a pas été pris en compte ? Pour répondre à ces questions, il est nécessaire d'abandonner les systèmes modèles et de travailler sur la

cellule. C'est ce que nous avons fait. La suite de cette thèse présente les résultats que nous avons obtenus sur la cinétique d'agrégation de protéines adhésives dans les cellules.

2

Approches expérimentales

Les références des produits chimiques sont données dans l'annexe A.2, celles des différents équipements sont dans l'annexe A.3. Enfin, on pourra trouver dans l'annexe A.6 quelques protocoles complémentaires.

2.1 Les cellules.

Nous avons étudié la nucléation et la croissance de contacts VE cadhérines sur des systèmes cellulaires. Nous avons utilisé des lignées stables (qui se divisent indéfiniment et qui sont donc plus faciles à manipuler).

2.1.1 Types cellulaires.

Deux types cellulaires ont essentiellement été utilisés :

- EA·hy926 (appelée par la suite simplement EAhy) : lignée stable, résultat de la fusion d'une lignée stable A549 et de cellules de cordon ombilical humain (HUVEC) (Edgell *et al.*, 1983). Elles expriment naturellement la VE-cadhérine. Elles proviennent du laboratoire du Dr Edgell (University of North Carolina, Chapel Hill, USA).
- Cellules d'ovaire d'hamster chinois (CHO) : lignée stable. Ces cellules n'expriment pas naturellement de cadhérines. Elles ont été achetées chez ATCC (CHO-K1, ref. CCL-61).

La première nous a permis d'avoir des contacts VE cadhérines "naturels" (sans aucune modification génétique). La deuxième nous a permis grâce à une modification de son patrimoine génétique d'y exprimer de façon stable des VE-cadhérines fluorescentes. Les jonctions cellulaires formées par ces cellules ainsi modifiées étaient indiscernables de celles formées par les EAhy.

2.1.2 Entretien des cellules.

Les cellules sont cultivées dans du Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) auquel on ajoute 10% de sérum de veau (BCS). On les resuspend en les détachant avec de la trypsine à 0.25%-1mM EDTA (1 min à 37°C) tous les 4 jours et en les diluant au 1/10, 1/20 pour les EAhy et 1/40 pour les CHO ou CHO VE.

2.1.3 Congélation et décongélation des cellules

Il est possible de stocker pendant plusieurs mois des cellules à -80°C. Cela permet une très grande souplesse pour les expériences.

2.1.3.1 Congélation.

1. Resuspendre une boîte de 10 ml de cellules confluentes avec de la trypsine 0.25%-1mM EDTA.
2. Centrifuger.
3. Resuspendre les cellules dans 70 % DMEM (contenant 1% d'antibiotiques pénicilline-streptomycine), 20% BCS, 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO).
4. Congeler à -20°C pendant 1 heure.
5. Conserver à -80°C.

2.1.3.2 Décongélation.

1. Laisser les cellules décongeler dans la glace.
2. Laisser 10 min à température ambiante.
3. Mettre les cellules dans 10 ml dans du milieu de culture (voir § A.6.1).
4. Centrifuger.
5. Resuspendre dans deux boîtes de 5 ml.
6. Le lendemain, changer le milieu des cellules.

2.1.4 Transfection.

Pour modifier le patrimoine génétique des cellules, on introduit dans leur noyau par des techniques dites de "transfection" l'ADN codant pour des protéines que nous voulons lui

faire exprimer. Ces manipulations ont été faites au Laboratoire de Spectrométie Physique (LSP). Ce genre d'expériences usuelles dans les laboratoires de biologie, ne sont pas très courantes dans des laboratoires de physique.

2.1.4.1 *Vecteurs : fusions.*

Les ADN codants pour la VE cadhérine et pour la VE tronquée (VE tr) cadhérine (voir Fig. 2.1) (Navarro *et al.*, 1995) ont été insérés dans le vecteur de la E-GFP (pEGFP-N3, Clonetech). La fusion a été effectuée, dans les deux cas, avec la partie C-terminale de la protéine. Les sites de clonages et amorces qui ont été utilisés sont les suivants :

- pour la VE cadhérine GFP : EcoR1/BamH1 ; amorces :
  - 5' - GAA TTC ATG CAG AGG CTC ATG ATG CTC CTC -3'
  - 5' -GGA TCC ATA CAG CAG CTC CTC CCG GGG-3'
- pour la VE tr cadhérine GFP : EcoR1/ BamH1, pour BamH1 le site a été créé avec introduction Sma I ; amorces :
  - 5' - CCG GAA TTC ATG CAG AGG CTC ATG ATG CTC CTC -3'
  - 5' - CGC GGA TCC GGG CCC TCC GTG TGC CCC AG-3'

Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage (Genome Express). Les amorces ont été achetées chez MWG Biotech.

On a retiré à la VE tr cadhérine la partie cytoplasmique de la VE-cadhérine qui permet sa liaison au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire des caténines. Par contre, la partie juxtamembranaire n'a pas été supprimée. La VE tr cadhérine peut donc en particulier se lier à p120. Cela semblerait permettre aux cadhérines de former des multimères cis, favorisant l'adhésion (Yap *et al.*, 1998).

2.1.4.2 *Protocole de transfection transitoire pour une boîte de Pétri de 2 ml.*

Les cellules ont été transfectées en utilisant l'Exgen500 (Euromedex).
Remplacer le milieu de culture des cellules par du DMEM, en diminuant de 50 % le volume (1ml). Diluer 1 μg d'ADN dans 50 μl de DMEM, agiter au vortex doucement. Diluer 10 μl d'Exgen500 dans 40 μl de DMEM, agiter au vortex doucement. Ajouter les 50 μl contenant l'Exgen500 sur les 50 μl contenant l'ADN, agiter au vortex doucement. Incuber 10 min à température ambiante. Ajouter les 100 μl à la boîte de Pétri à transfecter et agiter doucement pour homogénéiser. Laver 2, 3 heures après la transfection avec du milieu contenant du sérum.

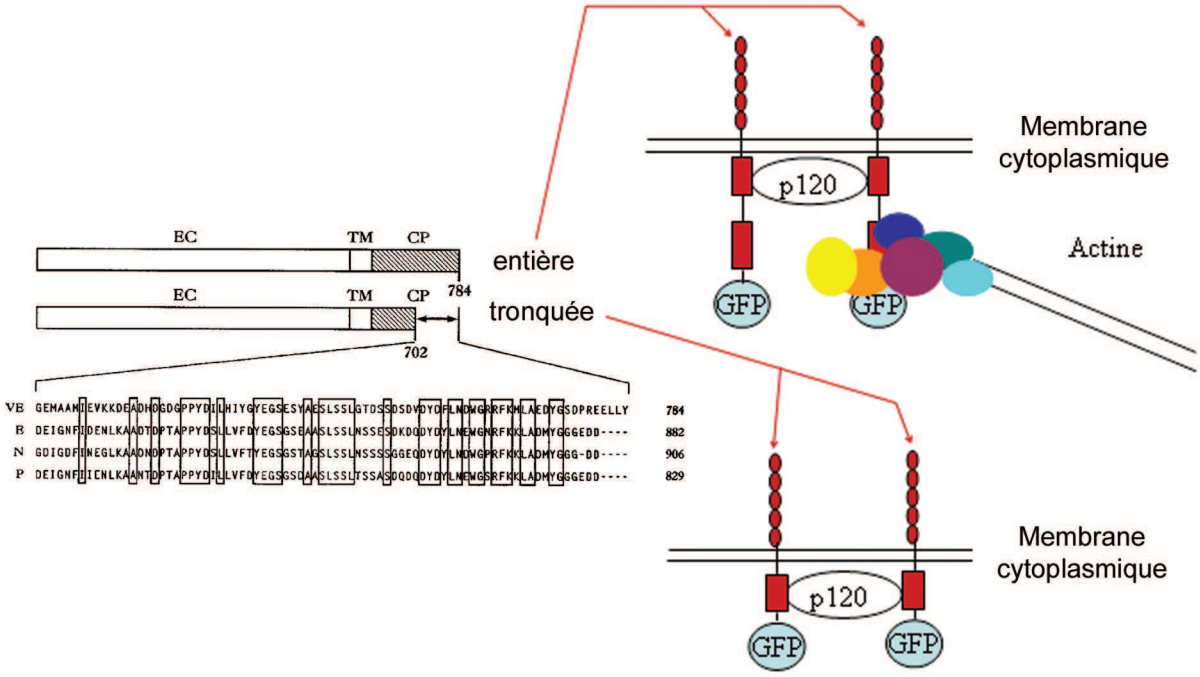

Fig. *2.1: VE cadhérine GFP et VE tr cadhérine GFP. La partie gauche de la figure est tirée de Navarro et al. (1995)*

2.1.5 Transfections stables, clonage.

Après transfection, seule une partie des cellules exprimera la protéine d'intérêt. Le taux de transfection dépend du protocole utilisé, du niveau de confluence des cellules, de la lignée cellulaire et de l'ADN. Dans notre cas, nous obtenions en général un taux de l'ordre de 30% de cellules transfectées. De plus, le niveau de transfection est très inhomogène, beaucoup de cellules surexpriment la protéine par rapport à son niveau d'expression naturel. Il est donc souvent très intéressant d'établir une lignée stable issue d'un même clone : toutes les cellules expriment alors la protéine à un niveau homogène. Les expériences sont donc ainsi plus facile à mener et à analyser. Malheureusement, il n'est pas toujours si simple d'obtenir de telles lignées ; c'est une approche empirique, et le résultat dépend là-encore de la lignée cellulaire utilisée, ainsi que de l'ADN introduit.

2.1.5.1 Protocole.

Les vecteurs dans lesquels sont clonées les protéines d'intérêt possèdent aussi un gène de résistance à un antibiotique (la généticine dans notre cas). On peut donc en introduisant

cet antibiotique dans le milieu de culture sélectionner les cellules exprimant la protéine d'intérêt.

1. Choisir la concentration optimale de l'agent de sélection. La meilleure est celle qui entraîne la mort cellulaire en 5 à 7 jours. Nous avons utilisé dans notre cas pour les CHO de la généticine 418 à 1,2 mg/ml.
2. Transfecter les cellules.
3. Après deux jours, changer le milieu, pour du milieu contenant l'agent de sélection.
4. Attendre quelques jours et resuspendre, dans du milieu de sélection, les cellules diluées 10 à 100 fois (voire beaucoup plus si beaucoup de cellules ont survécu). Le but est d'obtenir des clones bien séparés les uns des autres.
5. Après une semaine, on obtient des colonies. Marquer au crayon, sur l'extérieur de la boîte de Pétri l'emplacement des clones (petits ronds blancs que l'on repère par transparence, en exposant la boîte de Pétri à la lumière).
6. Préparer des disques de 3 mm de papiers Whatmann stériles.
7. Aspirer le milieu de culture.
8. Tremper les disques dans de la trypsine et les poser à l'endroit où l'on a préalablement marqué l'emplacement des clones. Laisser une minute ou deux.
9. Mettre ensuite chaque disque où se trouve maintenant le clone dans des puits contenant du milieu de culture. Vérifier que les cellules ont bien été prises.
10. Attendre que le clone se développe. Si l'on a transfecté avec des protéines GFP, on peut facilement sélectionner les clones d'intérêt en observant leur fluorescence.
11. Changer le milieu de sélection le lendemain puis tous les deux jours (penser à changer de pipette Pasteur pour chaque puits, afin de ne pas mélanger les clones). Le papier va pouvoir être retiré par aspiration.
12. Quand les cellules arrivent à confluence, les resuspendre dans une boîte de Pétri de 35 mm de diamètre. Puis, lorsque les cellules sont de nouveau arrivées à confluence, les resuspendre dans trois boîtes de 60 mm de diamètre (une boîte pour la congélation, une boîte pour effectuer un "Western blot" ou une immunofluorescence et vérifier que le clone exprime la protéine d'intérêt, une boîte pour continuer la culture cellulaire).

2.1.5.2 Résultats.

Nous avons réussi à obtenir plusieurs clones exprimant la VE-cadhérine GFP. Nous avons nommés ces clones : CHO VE. Par contre, il fut impossible d'obtenir des clones

stables de CHO VE tr, les cellules dérivent et finissent par devenir uniformément vertes (pour illustration voir (Bibert *et al.*, 2003) qui devrait être publié prochainement). Pour les EAhy, là encore il est impossible d'obtenir des clones, les cellules finissent toujours par mourir. Pour cette lignée cellulaire, nous n'avons donc utilisé que des transfections transitoires. Nous avons évité de travailler avec les EAhy transfectées avec la VE tr car les résultats sont plus difficiles à interpréter : on a dans ce cas une cellule à la fois capable d'exprimer des cadhérines entières et des cadhérines tronquées [2]. Le problème ne se pose pas avec la VE tr et les CHO puisque ces cellules n'expriment pas de cadhérines avant transfection.

2.1.6 Fixation et Immunofluorescence.

Pour observer la distribution des protéines à l'intérieur des cellules, on utilise des techniques d'immunofluorescence.
Les cellules sont fixées avec de la paraformaldéhyde (PFA) 3% dans du tampon phosphate (PBS) pendant 20 min, puis elles sont perméabilisées avec du Triton 0.5% dans la même solution de PFA 3%, puis sont lavées deux fois cinq minutes avec du PBS. Les cellules sont ensuite incubées avec des anticorps primaires pendant 45 min (voir A.4.3) puis rincées trois fois cinq minutes avec du PBS et incubées pendant 45 min avec un anticorps secondaire (voir A.4.3) et enfin lavées trois fois avec du PBS. On dépose enfin la lamelle, cellules en dessous, sur une lame sur laquelle a été préalablement déposé 10 μl de milieu de montage (50% PBS, 50% glycérol). On scelle les bords avec du vernis à ongles et on laisse sécher 3 minutes. On peut utiliser le Mowiol à la place du mélange PBS/glycérol (protocole de préparation voir A.6.4). Le Mowiol ne nécessite pas l'utilisation de vernis, mais il sèche en 12 heures. La fluorescence apparaît plus intense et les échantillons se conservent un peu mieux. Il est préférable de conserver les lames à -20°C, pour éviter la diffusion des colorants.

2.2 Réactifs.

Ce paragraphe détaille les différents réactifs que nous avons ajoutés au milieu de culture des cellules pour modifier leurs propriétés physiques.

[2] On peut cependant faire l'hypothèse que la VE tr supplante complètement la VE lorsque le niveau de transfection est assez important.

2.2.1 Choc hypotonique.

Pour modifier la tension de membrane des cellules, nous avons utilisé un milieu hypotonique : 70 % de milieu de culture standard, plus 30 % d'eau distillée (Raucher & Sheetz, 2000).

2.2.2 Autres réactifs.

Les autres réactifs que nous avons utilisés sont détaillés dans le tableau suivant.

Nom	Effet	Origine	Référence	Solution mère	Solution expérimentale	Temps d'incubation
Jasplakinolide	Stabilise les filaments d'actine (Cramer, 1999).	Molecular probes	J7473	1 mM éthanol	1 μM	5 à 60 min
Latrunculine A	Dépolymérise les filaments d'actine.	Molecular probes	L12370	1 mM éthanol	1.5 μM	5 min
H7	Inhibiteur de Kinase. Bloque la contractilité.	Sigma	I6891	100 mM éthanol	100 μM	30 min
Nocodazole	Dépolymérise les microtubules.	Sigma	M14104	10 mM DMSO	10 μM	30 min
Cytochalasin D	Dépolymérise les filaments d'actine.	Sigma	C8273	1 mM DMSO	1 μM	30 min
2,3-Butanedione Monoxime (BDM)	Inhibe la myosine II (Cramer & Mitchison, 1995)	Sigma	B0753	6 M DMSO	30 mM	30 min
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Dissout la membrane	Bio-Rad	161-0416		0.1%	5 min
Triton X-100	Dissout la membrane	Sigma	T9284	10%	1%	5 min

2.3 Surfaces

Nous présentons, dans ce paragraphe, tout d'abord les protocoles concernant les surfaces de cadhérines (protocole de greffage, mesure de la densité de cadhérines et resuspension des cellules), puis nous abordons la méthode pour greffer d'autres protéines sur des surfaces de verre (polylysine, fibronectine, protéines de la matrice extracellulaire (PMEC)). Enfin, nous détaillons la façon dont nous avons appliqué des forces sur les cellules adhérant sur une surface (flux et pipette).

2.3.1 Surfaces de cadhérines.

2.3.1.1 VE cad1-4 his

Les cadhérines recombinantes que nous avons utilisées ont été produites dans des bactéries *Escherichia coli* par nos collaborateurs à l'IBS (Al-Khurdi *et al.*, 2003). Ces cadhérines sont constituées des quatre premiers domaines de la partie extracellulaire de la VE cadhérine et possèdent une étiquette faite de six histidines à sa partie C-terminale (VE cad1-4 his), ce qui permet leur greffage sur des surfaces recouvertes du complexe Nickel-Nitrilotriaceticacide (Ni-NTA). Les histidines sont, en effet, des acides aminés qui possèdent la propriété de se complexer de manière très spécifique avec le Nickel. Le NTA sert à fixer le Nickel sur la surface, c'est un complexant quadridentate, c'est-à-dire qu'il forme 4 liaisons. Il complexe fortement le Nickel qui est de valence 6. Ces ions, une fois complexés, gardent 2 sites accessibles qui peuvent être occupés soit par des molécules d'eau soit par d'autres molécules. Chargées avec du Ni^{2+}, les résines Ni-NTA lient de manière très spécifique les protéines ou polypeptides présentant plusieurs histidines consécutives en surface. Les étiquettes histidines sont donc très souvent utilisées pour purifier des protéines d'intérêt : des extraits cellulaires contenant la protéine étiquetée passent à travers une colonne recouverte de Ni-NTA. Les protéines d'intérêt se fixent à la colonne, alors que le reste de l'extrait est évacué. On élue ensuite la colonne en utilisant de l'Imidazole, qui va permettre de détruire le complexe protéines/Ni-NTA/ et de récupérer ces dernières. Nous avons utilisé cette liaison cad1-4 his/Ni-NTA pour greffer et orienter correctement les cadhérines sur la surface. En effet, si l'on recouvre les surfaces de protéines par simple adsorption, les protéines s'orientent de façon aléatoire. Le protocole pour greffer des complexes Ni-NTA de façon covalente a été inspiré de celui proposé par Noren *et al.* (2001).

La VE cad1-4 his présente un équilibre monomère-hexamère en présence de calcium

(Bibert *et al.*, 2002). Cet équilibre se déplace vers les hexamères lorsque la concentration en cadhérine augmente. L'hypothèse la plus probable est que l'hexamère est fait de trois paires de cadhérines interagissant de façon "trans". Il apparaît donc, que si nous greffons ces hexamères sur la surface, tous les sites d'interaction des cadhérines de la surface sont déjà bloqués : la cellule ne pourra pas adhérer. C'est pourquoi nous avons effectué la majorité des greffages de VE cad1-4 his sur la surface en présence d'EGTA qui chélate le calcium et déplace l'équilibre monomère-hexamère vers les monomères.

2.3.1.2 Préparation.

1. Lavage des lamelles de verres.
   - Rincer à l'eau distillée.
   - Incuber les lamelles en agitant dans 1 part H_2O_2 30% pour 9 parts H_2SO_4 pendant 10 min.
   - Rincer à l'eau distillée.
   - Rincer avec du NaOH 1M.
   - Rincer 20 fois à l'eau distillée.
   - Sécher les lamelles 60 min à 130°C.
2. Silanisation
   - Incuber les lamelles 30 secondes en agitant dans : 94% ethanol, 5% H_2O, 1% silane.
   - Laver 3 fois à l'éthanol pur.
   - Aspirer complétement l'éthanol.
   - Laisser sécher 10 min à 120 °C.
3. Monter les lamelles avec de la cire sur des boîtes de Pétri de 2 ml préalablement percées en leur centre.
4. Glutaraldéhyde
   - Incuber les lamelles 1 h à température ambiante dans : 0.08% glutaraldéhyde, 99% eau.
   - Rincer 2 fois à l'eau distillée.
5. Incuber les lamelles 20 min avec du Nitrilotriacetic acid (NTA) 1 μg/ml (solution mère 100 mg/ml dans du NaOH 1M, dilution par 100 000 dans l'eau)
6. Incuber les lamelles 20 min $NiSO_4$ 100 mM (solution mère 0.2 g/ml soit 0.76 M dans eau, dilution par 7.6 dans l'eau).
7. Rincer 3 fois à l'eau distillée.

8. Incuber les lamelles avec les VE cad1-4 his à 37°C pendant 4 heures dans du DMEM contenant 5mM d'EGTA.
9. Passivation des surfaces.
   - Rincer avec du DMEM contenant 1% de BSA.
   - Incuber avec du DMEM contenant 1% de BSA pendant la nuit.

2.3.1.3 Quantification de la densité de fluorescence des surfaces de cadhérines.

La densité de cadhérine sur les lamelles a pu être déterminée grâce à un titrage au luminol, utilisé classiquement pour les "Western blots". Les lamelles couvertes de différentes densités de cadhérines sont saturées avec du lait, lavées 3 fois et incubées avec des anticorps dirigés contre la VE cadhérine. Puis, elles sont rincées 2 fois et incubées avec un anticorps secondaire marqué à la "horseradish peroxidase". Pour la calibration, 100 μl d'une concentration connue de VE cadhérine est séchée sur une membrane de PolyVynilDiFluorène. La membrane subit ensuite les mêmes incubations que les lamelles. Enfin, membrane et lamelles sont déposées simultanément sur un film photo et exposées pendant une minute. Après avoir "scanné" ces films, la densité de cadhérines sur les lamelles est mesurée avec le logiciel NIH Image. Elle est ensuite traduite en unité de concentration grâce aux standards de densités obtenus sur les membranes (voir Fig. 2.2).

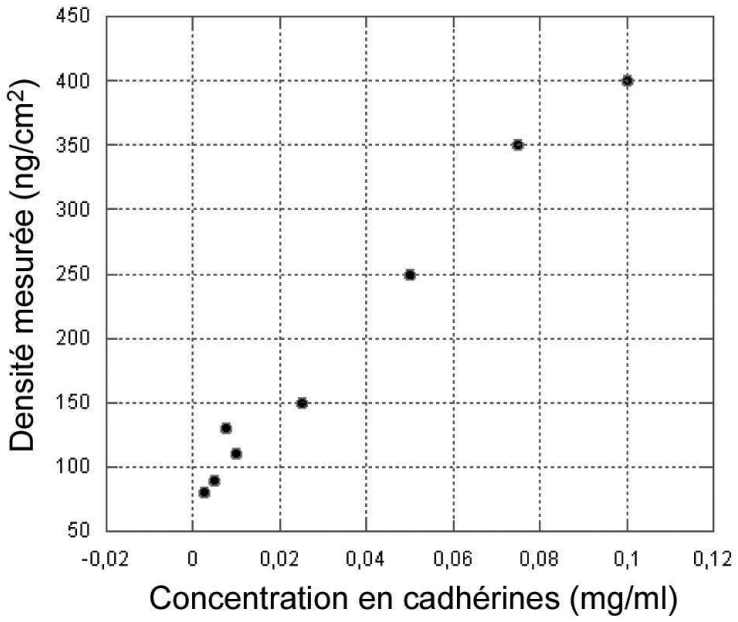

FIG. *2.2: Densité de surface des cadhérines en fonction de la concentration de cadhérines utilisée lors de l'incubation.*

2.3.1.4 Resuspension des cellules.

Nous avons utilisé, pour cette expérience, des EAhy transfectées avec la VE cadhérine GFP ou la VE tr cadhérine GFP. La transfection avait lieu la veille de l'expérience sur surface, et la monocouche était quasiment confluente. Pour la resuspension, nous suivions le protocole suivant :

1. Incuber les cellules avec de la trypsine 0.25%-1mM EDTA (1 min à 37°C).
2. Récupérer les cellules et les mélanger à 10 ml de milieu L15 contenant des antibiotiques mais pas de sérum, et auquel a été ajouté 0,1% d'inhibiteurs de trypsine.
3. Centrifuger les cellules pendant 3 min avec une accélération $a = 1500 \times g$ (où g représente la constante de gravitation terrestre).
4. Aspirer le milieu et resuspendre les cellules dans 10 ml de L15 sans sérum.
5. Centrifuger pendant 3 min avec la même accélaration que précédemment.
6. Resuspendre les cellules dans un volume adapté.

On peut utiliser une boîte de 5 ml confluente pour 10 boîtes de Pétri de 2 ml. En effet, il ne faut pas que les cellules soient trop denses une fois resuspendues, car on veut éviter que les cellules fassent des contacts avec leurs voisines. Si la cellule a l'opportunité de faire des contacts cellule-cellule naturels, il se peut que cela nuise à l'établissement des contacts cellule-cellule avec la surface (la majorité des cadhérines pouvant par exemple être réquisitionnée aux contacts cellule-cellule).

Il est très important ici d'utiliser du milieu sans sérum. En effet, le sérum contient des protéines de la matrice extracellulaire qui peuvent venir recouvrir la surface de cadhérines : le greffage des cadhérines n'a alors servi à rien.

Nous avons utilisé des CHO VE pour des expériences préliminaires, mais ces cellules sont beaucoup plus sensibles à la trypsine. Il faut un protocole particulier de détachement, et les résultats sont difficilement reproductibles : la cinétique d'étalement est variable, elle dépend étroitement du niveau de confluence des cellules avant resuspension, et du temps d'incubation avec la trypsine. La moindre variation dans le protocole entraîne des résultats très différents. Par conséquent, les études en surface, ont principalement été menées avec des EAhy.

2.3.2 *Autres surfaces.*

Nous avons aussi utilisé d'autres recouvrements de surfaces, pour effectuer des contrôles. En effet, il fallait montrer que les motifs obtenus sur les surfaces de cadhérines dépendaient bien du greffage de cadhérines sur la surface et n'étaient pas obtenus si nous greffions autre chose sur ces surfaces. D'autre part, nous avons voulu comparer les contacts focaux aux contacts cadhérines : nous présentons donc les différentes méthodes pour recouvrir les surfaces de protéines de la matrice extracellulaire (PMEC).

2.3.2.1 *Polylysine.*

Incuber les lamelles avec de la polylysine à 0.1 mg/ml dans de l'eau pendant 20 min. Rincer trois fois à l'eau distillée. Laisser sécher (1 à 2 heures) (Bershadsky *et al.*, 1996).

2.3.2.2 *Fibronectine.*

i) Protocole *nuit.*

Recouvrir les lamelles d'une solution de fibronectine 10 μg/ml dans du PBS. Laisser incuber la nuit à 4°C.

ii) Protocole avec polylysine.

Commencer par le protocole du 2.3.2.1 pour recouvrir les lamelles de polylysine. Une fois que les lamelles sont sèches, incuber 1 minute avec de la fibronectine à 100 μg/ml dans du PBS. Laisser sécher (Bershadsky *et al.*, 1996).

2.3.2.3 *Protéines de la matrice extracellulaire : PMEC*

Pour recouvrir les surfaces de protéines de la matrice extracellulaire, il suffit de resuspendre les cellules sur des lamelles de verre en présence de sérum. En effet, celui-ci contient des PMEC. Puis, le lendemain, on peut retirer le sérum du milieu en lavant les boîtes de culture avec du DMEM. On laisse les cellules dans ce milieu pendant trois heures ; on peut alors considérer que les cellules ne ressentent plus les effets du sérum. On peut alors commencer des expériences.

2.3.2.4 Conclusion.

Une fois les surfaces fonctionnalisées, on resuspend des cellules exprimant des protéines d'adhésion fluorescentes et on peut suivre alors l'évolution des motifs d'adhésion par ondes évanescentes. On peut aussi sur ces surfaces, appliquer des forces :

- sur toutes les cellules de la lamelle en appliquant un flux,
- localement sur une cellule à l'aide d'une pipette.

Le paragraphe suivant décrit ces deux techniques.

2.3.3 Application de forces.

Nous avons voulu voir comment les motifs en cadhérines ou en protéines des contacts focaux se comportaient lorsque nous appliquions des forces. Nous avons utilisé deux techniques : flux et pipette.

2.3.3.1 Flux.

Nous avons utilisé une chambre à flux laminaire (Glycotech) et un pousse-seringue (KD Scientific, KDS 100). Les dimensions de la chambre étaient les suivantes : 2 cm * 2.5 mm * 127 μm. Une lamelle ronde de 35 mm recouverte de VE cad1-4 his (voir 2.3.1.2) est scellée à la chambre par un système de pompe à vide. Les cellules sont déposées dans la chambre, on les laisse ensuite adhérer pendant 15 min. On applique alors un flux de 488 ml/h pendant le temps nécessaire pour atteindre un état d'équilibre, i.e. le temps pour lequel les cellules ne se détachent plus (entre 15 et 30 min). Le flux appliqué correspond à un taux de cisaillement de 20000 s^{-1} et à une force de cisaillement de 15pN/μm^2. Le détachement est suivi à l'aide d'un objectif $\times$4.

2.3.3.2 Traction par pipettes.

Pour appliquer une force sur des cellules, on utilise des capillaires de verres (Clark Electromedical Instruments, GC100F-10) que l'on étire à l'aide d'une étireuse de pipettes (Sutter Instrument, P97) qui permet d'obtenir des pipette de constante de ressort de 1 $nN/\mu m$. On les utilise telles quelles sans traitement de surface. On utilise ensuite un micromanipulateur (WPI, DC3001) pour déplacer la pipette de manière "centripète" sur la cellule, comme cela a été fait dans la référence (Riveline *et al.*, 2001).

2.4 Montages optiques.

La partie optique a été une composante importante de cette thèse. Il a fallu par exemple mettre au point un montage d'observation à ondes évanescentes pour les expériences de surface. Nous avons aussi monté un trajet optique pour effectuer des expériences de récupération de fluorescence après photoblanchiment (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP).

2.4.1 Matériel.

Les cellules ont été observées avec un microscope Olympus inversé IX70. Nous avons utilisé différents objectifs à immersion à huile (PlanApo 60x NA=1.40, UPlanFl 100x NA=1.30, PlanApo 60x tirfm NA=1.45). Trois sources de lumières permettent l'acquisition de différents types d'image :

- une lumière blanche, pour des images de phase,
- une lampe à arc (Hg, 100 W), pour des images en épifluorescence,
- un laser (177-G02, 395 mW ; Spectra-Physics) pour des images en ondes évanescentes ou pour des expériences de FRAP.

Les faisceaux provenant des différentes sources lumineuses sont interceptés par des obturateurs électroniques (Uniblitz pour le laser et roue à filtre Sutter Instruments pour la lampe à arc). Différents jeux de filtre (Omega, Melles Griot) sont utilisés pour l'observation des fluorochromes :

- pour la Rhodamine, MWG (Omega, set XF34),
- pour la Fluorescéine, MNB (Omega, set XF25) avec filtre à l'émission 93/XF3017 ou 530DF30,
- pour le DAPI, MWU (Omega, set XF02) avec un filtre à l'émission 450DF65/E,
- pour l'Alexa Fluor 488 ou GFP (Omega, set XF100-2), avec un filtre à l'émission 535AF45.

Les images sont prises avec une caméra CCD 12 bits MicroMax refroidie à -15°C par trois éléments Peltier successifs (Roper Scientific). Les objectifs sont vissés sur un piezoélectrique (PIFOC, Physic Instruments, P721.10) permettant de contrôler la position verticale du plan d'observation lors de la prise d'images en volume. Le tout est contrôlé depuis un ordinateur par l'intermédiaire du logiciel MetaMorph (Universal Imaging). Lors des observations d'échantillons de cellules vivantes, le microscope est placé dans une enceinte

régulée à 37°C.

2.4.2 Résolution.

La résolution en X,Y est donnée par le critère de Rayleigh. Deux points pourront être distingués, s'ils sont séparés d'une distance r_{xy} :

$$r_{xy} = \frac{1.22\lambda}{2O.N.}$$

où O.N. représente l'ouverture numérique de l'objectif, et λ la longueur d'onde. Avec des objectifs d'ouverture numérique 1.3, 1.4 et des longueurs d'onde de l'ordre de 500 nm, on obtient des résolutions de l'ordre de 0.2 μm.

La formule ci-dessus ne peut être utilisé pour l'axe z. Cependant, on peut utiliser le même type de critère de résolution pour établir une nouvelle expression. La résolution est donnée par la distance minimum nécessaire pour séparer deux tâches de diffraction selon l'axe z (mathématiquement : distance entre le maximum et le premier minimum de l'intensité diffractée selon l'axe z). On obtient alors r_z :

$$r_z = \frac{2n\lambda}{O.N.^2}$$

où n correspond à l'indice du milieu de montage et du milieu d'immersion (en effet, cette formule est établie en supposant que les deux milieux ont le même indice, si tel n'est pas le cas, la résolution est moindre à cause des aberrations sphériques).
Avec un objectif d'ouverture numérique de 1.4, un milieu d'indice 1.5 et une longueur d'onde de 580 nm, on obtient une résolution théorique (sans prendre en compte aucune aberration) de 0.9 μm. La profondeur de champ (qui correspond à l'épaisseur de la région qui apparaît focalisée) est en général donnée par la moitié de r_z, soit $\frac{n\lambda}{O.N.^2}$.

La microscopie confocale permet d'améliorer quelque peu cette résolution en z (Sheppard, 1989) :

$$R_z = \frac{1.4n\lambda}{O.N.^2}.$$

Cela donne des résolutions de l'ordre de 0.5 μm.

2.4.3 Microscopie par ondes évanescentes.

L'observation de contacts entre une cellule exprimant des VE cadhérines GFP et une surface recouverte de VE cadhérines peut se faire par épi-fluorescence. Cependant le

contraste des images est fortement affaibli par la superposition de la fluorescence provenant des fluorophores présents dans les plans successifs du volume d'excitation. En effet, le faisceau excitateur traverse l'ensemble de l'échantillon et tous les fluorochromes sont excités. L'idée est alors de n'exciter que les fluorochromes présents au niveau des contacts. Cela peut être réalisé par l'intermédiaire d'une onde évanescente à l'interface verre-cellule dont le faible pouvoir de pénétration permettra une excitation sélective des fluorochromes au voisinage de la surface.

Nous avons choisi de réaliser un montage à ondes évanescentes sans prisme (pour exemple voir Tokunaga *et al.* (1997)) en utilisant un objectif à forte ouverture numérique qui permet un angle d'incidence du rayon laser, au niveau de l'interface lamelle-échantillon, supérieur à l'angle critique de réflexion totale (Fig. 2.3 gauche). La profondeur de pénétration de l'onde évanescente peut ensuite être réglée en jouant sur l'angle d'incidence du faisceau. Lorsqu'on reste juste au-dessus de l'angle critique, l'onde a une longueur caractéristique de pénétration de l'ordre de la centaine de nanomètres. Cela convient donc parfaitement pour n'éclairer que les fluorochromes des VE cadhérines GFP présentes dans la membrane ventrale. On estime en effet qu'elles se trouvent au plus à quelques centaines de nanomètres de l'interface. Le signal ainsi obtenu est nettement moins bruité (voir Fig. 2.4).

2.4.4 Récupération de fluorescence après photoblanchiment

L'exposition prolongée d'un fluorochrome à une onde excitatrice altère plus ou moins rapidement son efficacité. Ce phénomène est un des principaux inconvénients de l'observation par microscopie de fluorescence. On peut cependant le mettre à profit pour mettre en évidence des processus de diffusion ou de transport des molécules associées aux fluorochromes. Il suffit "d'éteindre" la fluorescence d'une zone de l'échantillon et de regarder son retour assuré par la diffusion ou le transport des fluorochromes intacts voisins.

2.4.4.1 Méthode

Le faisceau laser est focalisé par une lentille de courte focale (25 mm) sur le diaphragme de champ du microscope (voir Fig. 2.5). Comme ce dernier est conjugué avec le plan d'observation, on focalise sur une petite zone le faisceau laser sur l'échantillon. En pratique, nous avons obtenu des zones circulaires dont le diamètre allait de 1 à 6 μm. La zone cible était éclairée pendant 10 s à puissance maximale (100 mW à 488 nm en sortie du laser).

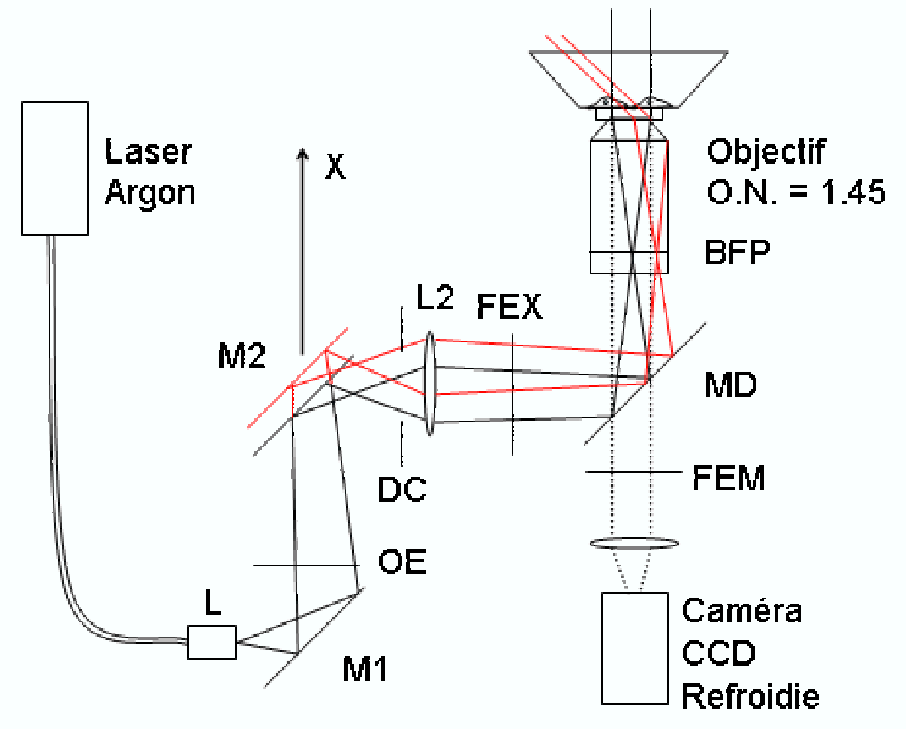

Fig. *2.3: Schéma du trajet optique utilisé dans le montage en ondes évanescentes. Le laser est focalisé via une fibre optique et deux lentilles L et L2 sur le "Back focal plane" (BFP) d'un objectif 60X à forte ouverture numérique (1.45). On passe d'une illumination en épi-fluorescence (trajet noir) à une illumination en ondes évanescentes (trajet rouge) en déplaçant le miroir M2 selon l'axe X. L : lentille ; L2 : lentille du microscope Olympus ; M1, M2 : miroirs ; FEX : filtre d'excitation du cube GFP ; MD : miroir dichroïque ; FEM : filtre d'émission du cube GFP. OE : obturateur électronique.*

La puissance du laser sur l'échantillon n'est évidemment pas de 100 mW, le faisceau est atténué le long du trajet optique (en particulier par le passage à travers la fibre optique). Nous n'avons pas mesuré la puissance exacte en sortie de l'objectif, mais la cellule n'est pas affectée outre mesure par l'expérience et se comporte tout-à-fait normalement : elle possède toujours une activité soutenue de polymérisation et dépolymérisation de l'actine aux alentours de la zone photoblanchie. Le photoblanchiment n'altère donc pas la dynamique cellulaire. L'observation du retour de fluorescence se fait ensuite par épi-fluorescence avec la lampe à arc.

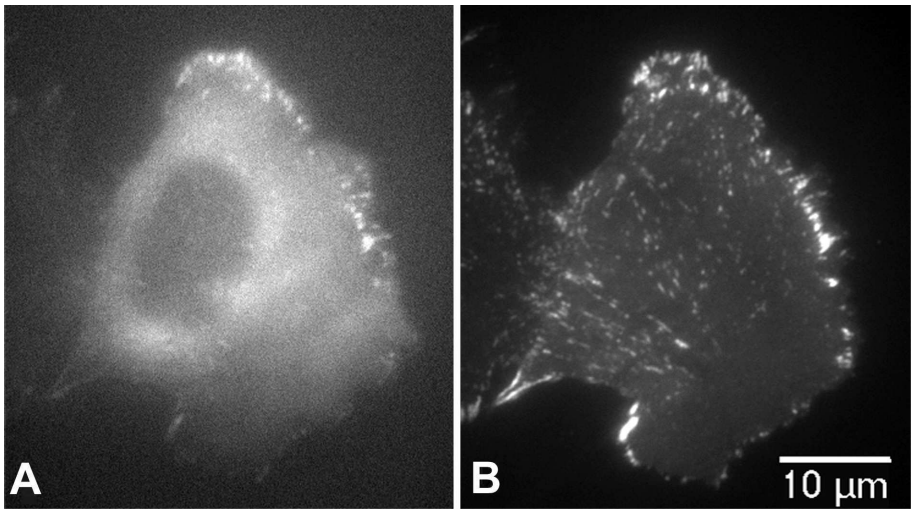

FIG. *2.4: Comparaison d'images d'une même cellule en épifluorescence et en ondes évanescentes.*

2.4.4.2 Analyse

On mesure l'intensité de la zone blanchie et des régions environnantes en fonction du temps à l'aide du logiciel Metamorph. Les courbes obtenues (intensité brute de la zone blanchie en fonction du temps, $I_{brute}(t)$, intensité de la zone blanchie corrigée par rapport au photoblanchiment en fonction du temps $I_{correc}(t)$ (voir §2.5)) sont ensuite ajustées par des courbes du type : $y = A_1 - A_2 \exp(-t/t_d)$. Le temps caractéristique de diffusion (t_d) peut être relié au coefficient de diffusion D des cadhérines à partir des équations de diffusion sur un disque circulaire (Axelrod *et al.*, 1976; Soumpasis, 1983) :

$$D = \frac{0.224 * r^2}{t_d}$$

où r est le rayon de la région blanchie. Les résultats donnés par I_{correc} et I_{brute} ne sont pas significativement différents.

2.5 Mesures.

2.5.1 Problèmes liés aux mesures 3D.

A cause de la faible résolution en z, les analyses d'image en 3D sont assez délicates. On peut essayer d'améliorer cette résolution en utilisant des algorithmes de déconvolution. Pour effectuer leurs calculs, ces algorithmes utilisent des fonctions de transfert calculées ou expérimentales (celles-ci sont obtenues en prenant des piles d'images de billes

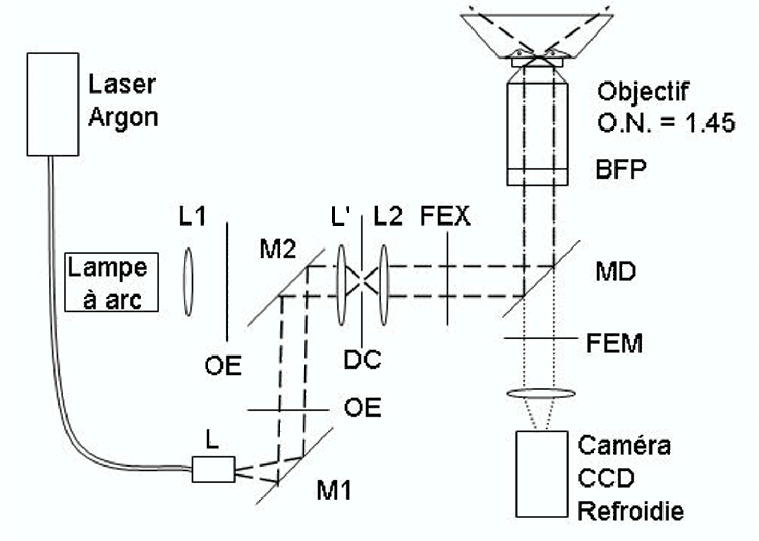

Fig. *2.5: Schéma du trajet optique du faisceau laser dans le montage de récupération de fluorescence après photoblanchiment. A l'aide du couple de lentilles (L, L'), on focalise le laser sur le diaphragme de champ. Ce dernier étant conjugué avec le plan d'observation par la lentille L2 du microscope, on focalise ainsi le laser sur l'échantillon. Le miroir M2 est manuellement amovible on peut donc après avoir photoblanchi l'échantillon observer la récupération par épifluorescence. L : lentille de focale ajustable ; L' : lentille de focale 2.5 cm ; L1,L2 : lentilles du microscope Olympus ; M1, M2 : miroirs ; FEX : filtre d'excitation du cube GFP ; MD : miroir dichroïque ; FEM : filtre d'émission du cube GFP. OE : obturateur électronique.*

fluorescentes de 100 nm). Or, ils ne prennent en général pas compte de la dépendance de cette fonction avec z (cette dépendance est assez importante surtout lorsqu'on s'approche de la surface). Les quelques algorithmes qui en tiennent compte demandent des temps de calcul trop importants (plusieurs jours). Les mesures quantitatives d'images déconvoluées ne sont donc pas si simples (pour plus d'informations sur ce sujet, consulter : http ://www.olympusmicro.com/primer/digitalimaging/deconvolution/deconartifacts.html.) Le confocal est bien entendu un autre moyen d'améliorer cette résolution, mais il accentue en même temps les phénomènes de photoblanchiment.

Nous avons tout de même utilisé deux types de logiciels permettant d'effectuer cette déconvolution : celui vendu avec le logiciel Metamorph, et celui développé sous linux, Priism. Concernant le premier, c'était un tout nouveau produit de la compagnie Universal Imaging. Il n'était en fait pas au point à sa sortie et demandait énormément de mémoire vive à l'ordinateur (1 G de RAM). Après avoir attendu quelques "updates", nous avons

pu finalement faire fonctionner le logiciel. Mais, il était très difficile de savoir comment il calculait exactement l'image finale. Après de nombreux échanges de mail avec la compagnie, nous avons fini par obtenir cette réponse : "une analyse quantitative d'intensité de fluorescence après déconvolution avec le logiciel Metamorph n'est pas possible".

Quant au deuxième logiciel beaucoup plus transparent, il a posé quelques problèmes de compatibilité (les formats d'images ne sont pas les mêmes). Nous avons bien obtenu des images déconvoluées, mais il est extrêmement difficile d'évaluer les erreurs commises. Nous avons donc finalement décidé de travailler sur les données brutes, en nous plaçant dans des conditions expérimentales appropriées : nous avons essayé d'observer des contacts quasiment plans.

2.5.2 Avantage de notre système cellulaire.

Les cellules épithéliales qui expriment la E-cadhérine forment des murs de cadhérines entre cellules. Au contraire, les contacts VE cadhérines observés dans les cellules endothéliales forment des lignes entre cellules dont l'épaisseur est inférieure à la profondeur de champ de l'objectif (voir Fig. 2.6 gauche). L'information d'intensité du contact est donc entièrement contenue dans le plan de meilleure mise-au-point. Nous essayons alors pour nos mesures de prendre des images de contacts à peu près plans, ce qui permet de faire abstraction des problèmes cités dans le paragraphe précédent (§ 2.5.1). Cela est possible si la confluence des cellules n'est pas trop importante, ce qui est le cas pour une aire projetée par cellule de 400 à 500 μm^2. Cependant, la planéité n'est pas toujours parfaite, nous faisons donc tout de même une acquisition d'images en trois dimensions (tous les 0.3 μm) et choisissons le long du contact le plan de meilleure mise-au-point (voir Fig. 2.6 droite). Nous nous sommes autorisés des variations de mise-au-point de l'ordre de 2 μm.

Nous avons montré que grâce à ce système quasi-unidimensionnel, notre résolution en z était suffisante pour faire des mesures. En effet, nous avons reproduit les types de mesures présentés dans cette thèse en utilisant un microscope confocal (grâce à une collaboration avec le Weizmann Institute, Israël). Et malgré une amélioration de la résolution en z, nous n'avons pas obtenu de différences notoires pour nos résultats.

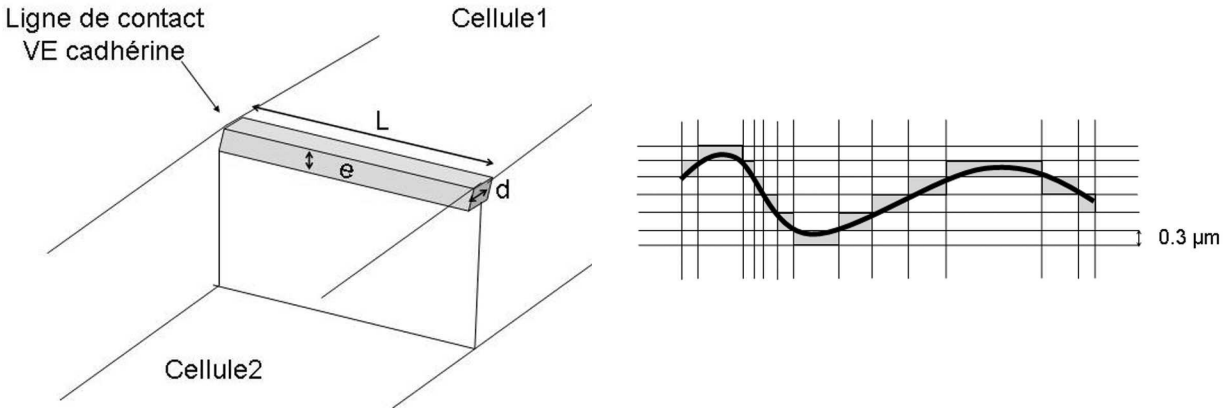

Fig. *2.6: A gauche : Un contact VE cadhérine peut être modélisé par un parallélipède de longueur L de largeur d et d'épaisseur e inférieure à la profondeur de champ de l'objectif. A droite : Si le contact n'est pas parfaitement plat, on le rend plan pour l'analyse en prenant le long de la ligne de contact le plan de meilleure mise-au-point (zone en gris).*

2.5.3 Mesures d'intensité.

Nous n'avons pas fait de mesure d'intensité du contact en fonction du temps à cause de la difficulté à corriger le photoblanchiment pour un signal de relativement faible intensité. En effet,

$$I_{mesurée}(X_1, Y_1, t) = I_{fond}(X_1, Y_1) + I_{motif}(X_1, Y_1, t),$$

où $I_{mesurée}(X_1, Y_1, t)$ représente l'intensité mesurée au point de coordonnées X_1, Y_1, et au temps t I_{fond} représente la partie du signal qui ne dépend pas du photoblanchiment (bruit de la caméra) et I_{motif} représente la partie du signal liée au motif observé. Pour faire la correction, il faut trouver sur l'image, une zone neutre sans motif, comme une partie cytoplasmique. Pour cette zone notée 2, le nombre de fluorophores est constant, alors que l'intensité apparente décroît à cause du photoblanchiment :

$$I(X_2, Y_2, t) - I_{fond}(X_2, Y_2) = \alpha(I(X_2, Y_2, t_0) - I_{fond}(X_2, Y_2)),$$

où t_0 représente le temps de début d'observation.

On peut alors théoriquement corriger la zone 1 d'intérêt contre le photoblanchiment :

$$I^{correct}_{motif}(X_1, Y_1, t) = \frac{(I_{mesurée}(X_1, Y_1, t) - I_{fond}(X_1, Y_1)) * (I(X_2, Y_2, t_0) - I_{fond}(X_2, Y_2))}{(I(X_2, Y_2, t) - I_{fond}(X_2, Y_2))} \tag{2.1}$$

Voici un exemple d'une tentative de correction sur échantillon fixé. Un champ est choisi et imagé plusieurs fois (on prend une pile d'images pour visualiser tous les contacts). Le

temps d'illumination et le nombre d'images sont gardés constants au cours de l'expérience. On trace ensuite l'intensité d'un motif, d'une zone neutre et du zone du fond (endroit sans cellules) en fonction du temps (voir Fig. 2.7 droite).

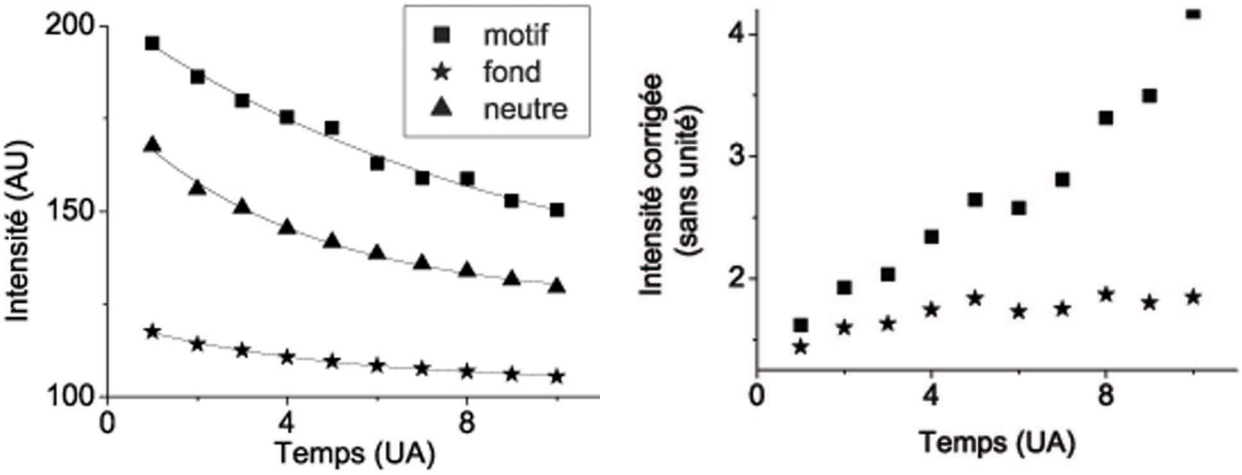

FIG. *2.7: A gauche : Intensité de trois zones (motifs, neutre, fond) en fonction du temps. Les courbes sont ajustées avec des exponentielles décroissantes :* $y_0 + A_1 \times \exp(-t/t_1)$. *A droite : Intensité corrigée du motif en utilisant l'équation 2.1 avec* $I_{fond}(X_1, Y_1) = I_{fond}(X_2, Y_2) = 105$ *pour les étoiles et* $I_{fond}(X_1, Y_1) = I_{fond}(X_2, Y_2) = 125$ *pour les rectangles.*

On voit que la valeur finale de l'intensité pour des temps infinis y_0 est différente pour les zones avec et sans cellule. On peut donc se demander si la valeur de I_{fond} doit être prise au niveau d'une zone sans cellule ou bien si l'on doit prendre la valeur y_0 obtenue au niveau des cellules. Il est à noter que cette dernière valeur ne peut être obtenue que par un ajustement des données expérimentales. Cela est assez difficile à faire pour une expérience sur échantillon vivant car il faut maîtriser le temps d'illumination, il faut comptabiliser toutes les images prises mêmes celles qui ne sont pas sauvées mais qui ont par exemple été utilisées pour se remettre au point. Une autre solution consisterait en fin d'expérience à photoblanchir complètement l'échantillon et à mesurer alors la valeur y_0. Il est aussi intéressant de noter que les valeurs des temps de décroissance ne sont pas les mêmes dans la cellule et à l'extérieur de la cellule. Cela n'est pas très étonnant, car les éléments photoblanchis (GFP, autofluorescence du milieu ou de la cellule) ne sont pas forcément les mêmes à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. De plus, on sait très bien que les phénomènes de photoblanchiment pour une même substance dépendent fortement de l'environnement, les taux de décroissance peuvent même être très différents d'un endroit à l'autre d'une même cellule. En résumé, le phénomène de photoblanchiment est un processus non linéaire très

difficile à corriger.

La figure 2.7 à droite montre ce que donne une correction contre le photoblanchiment. On voit que quelle que soit la valeur de I_{fond} choisi (les points rouges correspondent à une correction en utilisant $I_{fond} = 105$ (zone sans cellule) et les points noirs à $I_{fond} = 125$ (zone cellulaire)), les résultats sont loin d'être satisfaisants : ils ne donnent pas une valeur constante pour l'intensité corrigée.

Nous avons donc abandonné les mesures d'intensité en dynamique dans les mesures de nucléation et croissance de contacts. Nous avons limité nos mesures d'intensité à des échantillons fixés (voir §3.4) et à des expériences de FRAP où le photoblanchiment (non voulu) restait limité (voir §3.3.1.2).

2.5.4 Mesures d'aire.

Nous avons modélisé le contact cellule-cellule par un parallélépipède de longueur L, de largeur d et d'épaisseur e (voir Fig. 2.6). Nous avons supposé que e et d étaient constants. Mesurer le volume du contact revenait donc à mesurer la longueur du contact. Mais, pour des raisons de facilité d'analyse, nous avons mesuré une aire (L*d). En effet, il suffit d'effectuer un seuillage de l'image pour obtenir l'aire des contacts. Pour avoir la longueur L, il suffit alors de diviser l'aire par la largeur apparente d du contact [3].

2.5.5 Statistiques.

Les erreurs résultant de l'écart à la moyenne sur plusieurs mesures, sont présentées avec leur taux de confiance noté P (Protassov, 2002).

[3] La largeur réelle est égale à l'espace intermembranaire qui selon les clichés de microscopie électronique est de l'ordre de 20 nm, mais à cause des limites de résolution en microscopie de fluorescence, le contact apparaît sur quelques pixels.

3

Nucléation et Croissance

3.1 La VE GFP et la VE tr GFP : des constructions fonctionnelles.

Ces expériences ont été réalisées avec des cellules CHO transfectées avec les constructions VE GFP et VE tr GFP. Il a d'abord fallu montrer que la GFP ainsi fusionnée à la cadhérine n'empêchait pas la formation de véritables jonctions adhérentes. Nous avons pour cela effectué des expériences d'immunofluorescence montrant :
i) que la VE GFP ou VE tr GFP étaient bien localisées aux contacts cellule-cellule.
ii) que les protéines (β-caténine, p120, actine) faisant parties des jonctions adhérentes colocalisaient bien avec la VE GFP (voir Fig. 3.1) et que la β-caténine par contre ne colocalisait pas avec la VE tr GFP (voir Fig. 3.2).

De plus, des expériences d'immunoprécipitation effectuées par Stéphanie Bibert à l'Institut de Biologie Structurale (IBS) ont montré, elles aussi, que transfecter des cellules avec l'ADN codant pour la VE GFP conduisait bien à la formation de véritables jonctions adhérentes (Bibert *et al.*, 2003). Elle a aussi obtenue que la VEtr GFP exprimée dans les CHO n'était pas liée à la β-caténine, ni à l'α-caténine. Enfin, elle a pu vérifier que la lignée mère CHO n'exprimait pas de cadhérines en effectuant un Western blot avec un anticorps anti-cadhérines (anti-pan cadhérine).

3.2 Morphologie des contacts.

Dans une monocouche confluente, les cellules forment des contacts avec 4 à 6 voisines. Cela définit, comme dans une mousse, 4 à 6 plans de contacts.

Deux types de contacts peuvent être formés par les cellules (voir Fig. 3.3) :

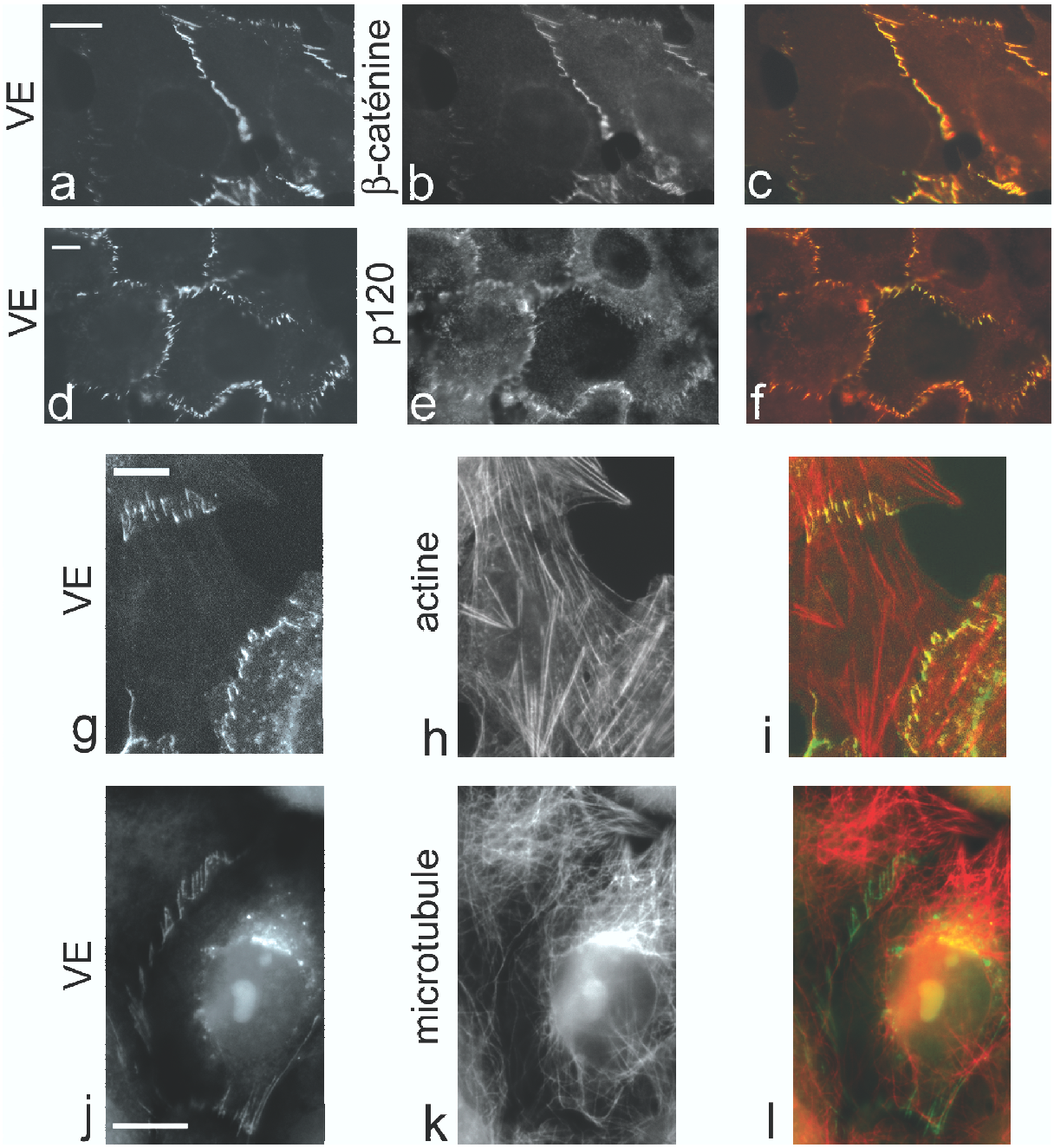

Fig. *3.1: a, d, g, j sont des images de contacts cadhérines GFP. b montre un marquage en β-caténine des cellules en a. e montre un marquage en p120 des cellules en d. h montre un marquage en actine des cellules en g. k montre un marquage en microtubule des cellules en j. c, f, i, l sont le résultat de la superposition respective de : a (verte) et b (rouge), d (verte) et e (rouge), g (verte) et h (rouge), j (verte) et k (rouge). Les barres représentent 10 μm.*

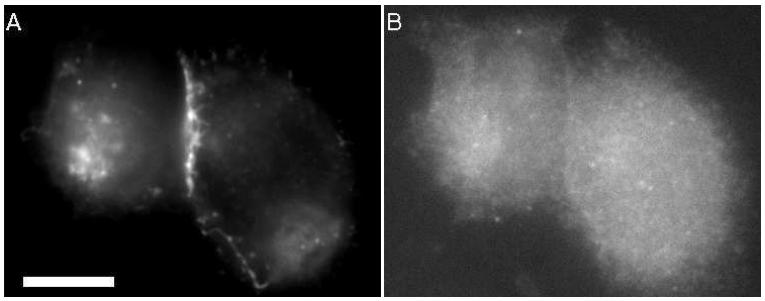

FIG. *3.2: La cadhérine VE GFP tr ne colocalise pas avec la β-caténine. A : contacts de cellules CHO VE tr GFP. B : Marquage en β-caténine des mêmes cellules. La barre représente 10 μm.*

1. des *lignes* discontinues appartenant au plan de contact,

2. des *doigts* perpendiculaires à ce plan qui brisent la symétrie. Ces formes sont obtenues lorsqu'une cellule étend un lamellipode ou des filopodes sur ou sous une autre cellule.

Les *lignes* sont faites de petits agrégats d'une longueur d'environ 0.5 μm (voir Fig. 3.3). Ces structures semblent ressembler aux agrégats immobiles dont parlent Adams *et al.* (1998) (voir chap 1). Elles sont en général observées sur le plus grand côté des cellules, là où la polymérisation d'actine est réduite, alors que les *doigts* sont observés sur les côtés courts de la cellule là, où la cellule forme lamellipodes et filopodes.

Il peut cependant y avoir une ambiguïté sur la nature des motifs : i) la fluorescence vient-elle simplement d'une accumulation de cadhérines libres dans le filopode qui projette sur l'autre cellule, ou bien ii) les cadhérines du filopodes sont-elles vraiment liées à des cadhérines de la cellule du dessous ?

Nous avons pu répondre à cette question en utilisant la lignée EAhy qui exprime naturellement des cadhérines et qui forme ces mêmes motifs *doigts* et *lignes* et en la transfectant de façon transitoire avec des cadhérines fluorescentes. Il est alors possible de voir des contacts entre une cellule transfectée avec la cadhérine GFP et une cellule non transfectée (ce qui est impossible avec la lignée CHO). La figure 3.4 en montre un exemple. La cellule de gauche qui n'est pas fluorescente projette des filopodes sur la cellule de droite qui exprime elle la cadhérine fluorescente, on voit les doigts en fluorescence. Par conséquent, des cadhérines sont recrutées sur la cellule du dessous, l'hypothèse ii) apparaît donc juste : les cadhérines sont recrutées de part et d'autre du *doigt*.

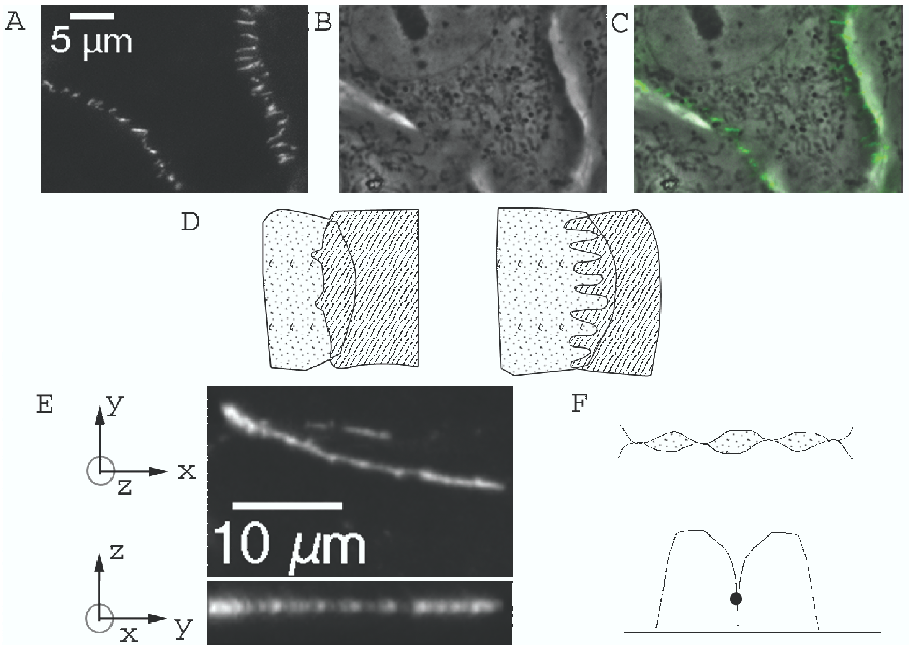

Fig. *3.3: Morphologie des contacts cadhérine-cadhérine. Images de doigts en fluorescence a) et en phase b).c) superposition de a) et b). d) : les doigts correspondent à des filopodes ou des lamellipodes d'une cellule (hachurée) sur ou sous une autre cellule (en pointillés). L'image de phase b) montre qu'il est très souvent difficile de savoir dans quelle configuration on se trouve. e) Image de fluorescence d'une ligne dans le plan focal d'observation (haut) et une section en z de ce même contact (bas). f) haut : zoom schématisé d'une ligne dans le plan de contact (Les pointillés représentent soit du glycocalyx, soit d'autres partenaires adhésifs, soit le milieu de culture) ; bas : section en z du même motif.*

3.3 Doigts.

Les *doigts* sont des motifs assez intrigants. Ils traduisent une forme hors-équilibre du contour cellulaire. Si la cellule se comportait comme une simple vésicule, son contour serait arrondi. Ici, l'actine, qui permet la formation des filopodes, semble le candidat idéal permettant d'expliquer cette brisure de symétrie (voir § 1.1.3.1).

3.3.1 Rôle des faisceaux d'actine.

3.3.1.1 VE tr et doigts

Que se passe-t-il si l'on empêche la formation des faisceaux d'actine liés aux cadhérines ? C'est ce que nous avons voulu voir en comparant les motifs formés avec la VE tr GFP, à

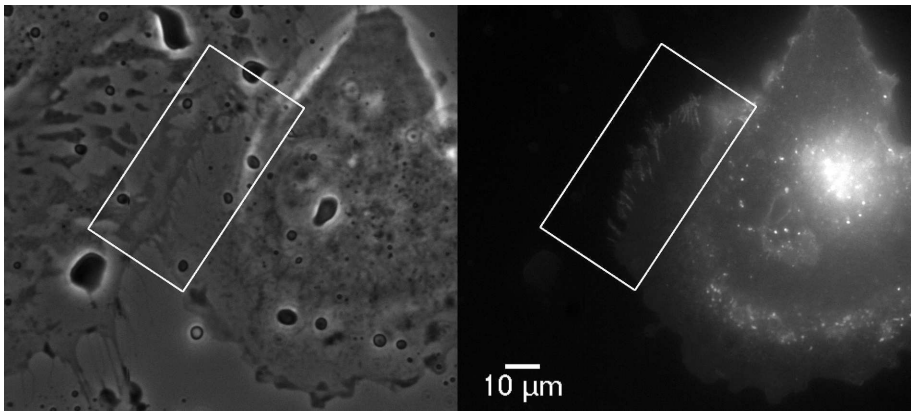

FIG. *3.4: A gauche : Image de phase montrant une cellule EAhy en train de projeter des filopodes sur sa voisine de droite. A gauche : Image de fluorescence des mêmes cellules : la cellule de gauche n'a pas été transfectée, contrairement à la cellule de droite. Les doigts de la cellule non transfectée apparaissent en fluorescence, ce qui signifie que les doigts de la cellule de droite ont recruté des cadhérines sur la cellule de gauche.*

ceux formés par la VE GFP. Le résultat est que les cellules transfectées avec l'ADN codant pour la VE tr GFP sont incapables de former des *doigts*, nous n'observons que des *lignes* (voir Fig. 3.2). La liaison des cadhérines à l'actine semble donc cruciale pour la formation de ces structures.

3.3.1.2 L'actine piège les cadhérines.

Les câbles d'actine peuvent être vus comme une structure servant de points de piégeage pour des cadhérines. Pour tester cette hypothèse, nous avons effectué des expériences de FRAP (voir §2.5). Elles furent menées en présence de nocodazole (voir §2.2.2), qui entraîne outre la dépolymérisation des microtubules, une stabilisation des motifs cadhérines [2]. Nous photoblanchissions une aire circulaire de 6 μm de diamètre et observions la récupération de fluorescence. La figure 3.5 a) montre une suite d'images prises lors de l'une de ces expériences. Les motifs imagés ici sont le résultat de la formation d'un lamellipode (et non de filopodes) de la cellule de droite sur celle de gauche. Les motifs photoblanchis réapparaissent exactement au même endroit. Ce résultat montre que l'actine sert de points d'ancrage pour les cadhérines.

[2]Nous avons utilisé cet effet inattendu pour mener plus facilement nos expériences de photoblanchiment, car sans nocodazole, les motifs de cadhérines se remodelaient beaucoup trop vite pour que nous puissions conclure quoi que ce soit quant à la récupération de fluorescence.

Outre le rôle structurant de l'actine, cette expérience montre que les cadhérines du contact sont constamment échangées avec les cadhérines de la membrane par simple diffusion. Le transport actif le long des microtubules n'intervient pas à cette échelle de temps : nous l'avions interdit pendant cette expérience en incubant les cellules avec du nocodazole. La figure 3.5 b montre que l'intensité des motifs photoblanchis recouvrent partiellement (environ 50 %), la moitié des cadhérines du contact ont donc été renouvelées. De plus, nous avons pu ajuster ces courbes par ($y = A[1 - \exp(-kt)]$) qui modélise une récupération de fluorescence par diffusion sur une aire circulaire, et en déduire un coefficient de diffusion pour les cadhérines dans la membrane $D = 0.04 \pm 0.02 \mu\text{m}^2/\text{s}$ qui est en accord avec les mesures de Sako *et al.* (1998) (voir § 1.1.2) ou avec celles de Adams *et al.* (1998). On peut donc conclure de cette expérience que l'actine contrôle la géométrie des *doigts* et les cadhérines fluorescentes sont sans cesse échangées le long de cette structure d'actine. La cellule échange-t-elle des dimères trans de cadhérines préalablement liés ou bien des cadhérines seules (ou en interaction cis) de chaque côté de la cellule qui se lieront seulement au niveau de l'agrégat ? La deuxième hypothèse apparaît la plus plausible au regard de la faible affinité trans des cadhérines (voir § 1.1.3.4).

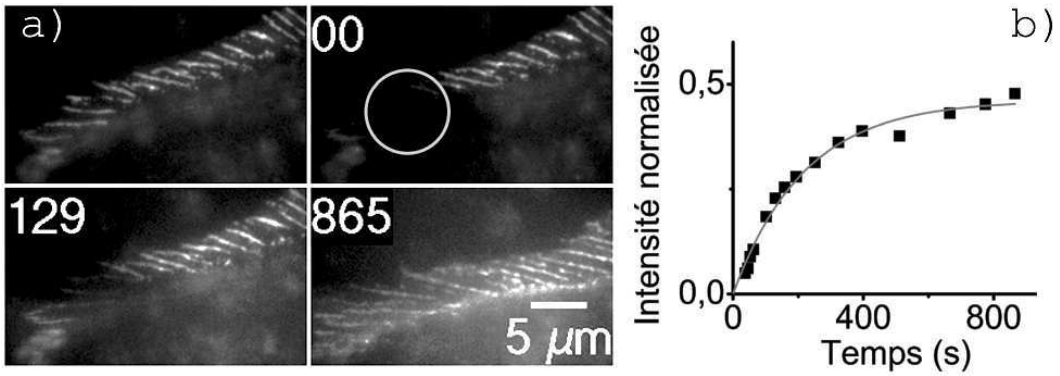

Fig. *3.5: Le motif imposé par la structure d'actine recouvre par pure diffusion sans transport actif (les microtubules ont été dépolymérisées). (a) Images de fluorescence d'une expérience de FRAP, le temps est en seconde. (b) Intensité du motif photoblanchi en fonction du temps ; La courbe est ajustée avec :* $y = A[1 - \exp(-kt)]$, *où* $A = 0.92 \pm 0.03$ *et* $k = (0.0046 \pm 0.0004)s^{-1}$ *(Adams et al., 1998). L'expérience fut répétée trois fois sans différences notables.*

3.3.2 Longueurs et distances entre doigts.

Nous avons mesuré les tailles caractéristiques des *doigts* (longueur, distance entre *doigts*) sur des images d'épifluorescence prises sur des échantillons fixés.
Les *doigts* sont séparés par une distance moyenne de $d = 1.0\mu\text{m} \pm 0.1\mu\text{m}$ (valeur obtenue pour 8 *facettes* voir Fig. 3.6, nombre de *doigts*=99, $P = 0.95$). Notre hypothèse est que les premiers stades de formation des *doigts* consistent en la formation de petits agrégats de cadhérines, qui entraîne ensuite un mécanisme de polymérisation d'actine. L'apparition d'une distance entre *doigts* bien définie est peut-être le signe que la formation des *doigts* est induite par une instabilité de croissance liée à la polymérisation d'actine et aux déformations de membrane (Bohin, 2001). La longueur d'onde critique k est imposée par le coefficient de diffusion D_l des cadhérines liées à l'actine dans la membrane et la vitesse v de croissance des *doigts* : $d = D_l/v$. En utilisant, les valeurs typiques de ces paramètres, $v = 1nm/s$ et $D_l = 10^{-11}cm^2/s$, on obtient : $d \simeq 1\mu m$.

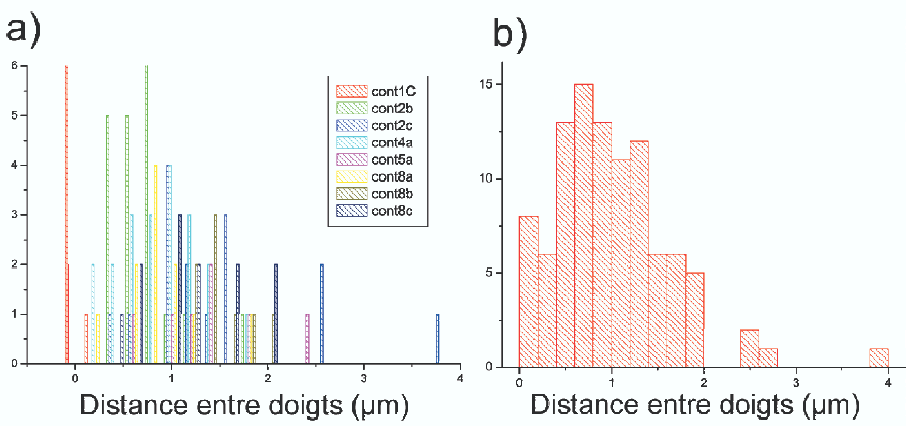

FIG. *3.6: Distribution de la distance entre doigts : (a) pour des contacts doigts individuels ; (b) pour l'ensemble des contacts doigts sommés sans distinction.*

En première approximation, le *doigt* peut être décrit comme un cylindre de longueur moyenne : $L = 1.3\mu\text{m} \pm 0.1\mu\text{m}$ (voir Fig. 3.7, valeur obtenue pour 8 facettes, nombre de *doigts* : 124, P=0.95) et de rayon $R = 0.1\mu\text{m}$. Cette dernière valeur étant inférieure à la résolution optique, nous nous sommes appuyés sur les valeurs de largeur de filopodes obtenues par microscopie électronique (Svitkina *et al.*, 2003).

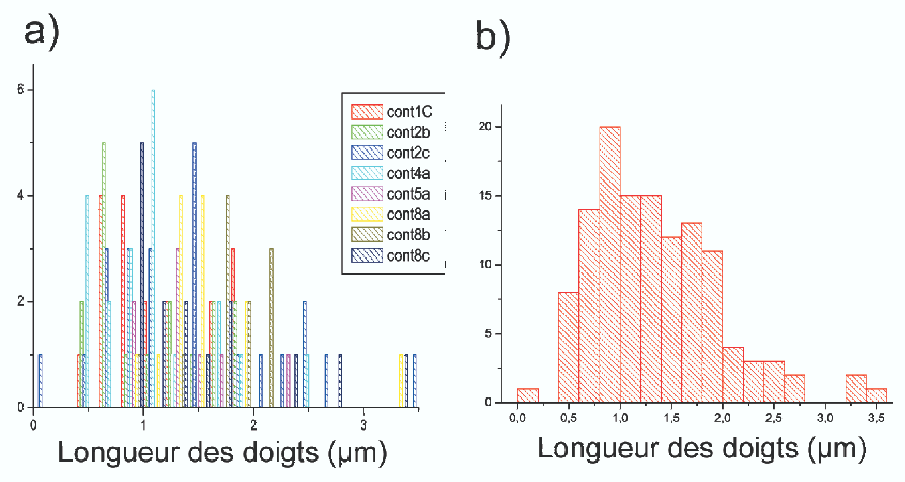

Fig. *3.7: Distribution de la longueur des doigts : (a) pour des contacts doigts individuels ; (b) pour l'ensemble des contacts doigts sommés sans distinction.*

3.3.3 Modélisation des doigts.

Le fait que les *doigts* soient stabilisés à une longueur finie conduit à l'idée que la polymérisation d'actine est en compétition avec une autre force empêchant ces *doigts* de grandir à l'infini. Il a été montré que, pour la formation des lamellipodes, la force reliée à la tension de membrane contrebalançait justement cette polymérisation d'actine (Raucher & Sheetz, 2000).
P. Lenz et J.F. Joanny (Institut Curie, Paris) ont donc proposé un modèle pour la formation des *doigts* fondé sur cette compétition.

3.3.3.1 Force exercée par les filaments d'actine.

Ils ont supposé que les *doigts* étaient formés de n filaments d'actine parallèles, et ont estimé la force exercée par chaque filament d'actine partant du modèle développé par Mogilner & Oster (1996, 2003).

Chaque extrémité libre des filaments est traitée comme une corde élastique de longueur l, de longueur de persistance l_p et de module de courbure $B = l_p k_b T$. L'extrémité libre de chaque filament est en contact avec la membrane, alors que l'autre bout est fixé au gel d'actine. Le filament d'actine subit des fluctuations de courbure, ce qui accroît la distance x entre le bout libre du filament et la membrane (voir Fig. 3.8). Si $x > \delta$ où δ représente la taille d'un monomère d'actine, un monomère peut être ajouté.

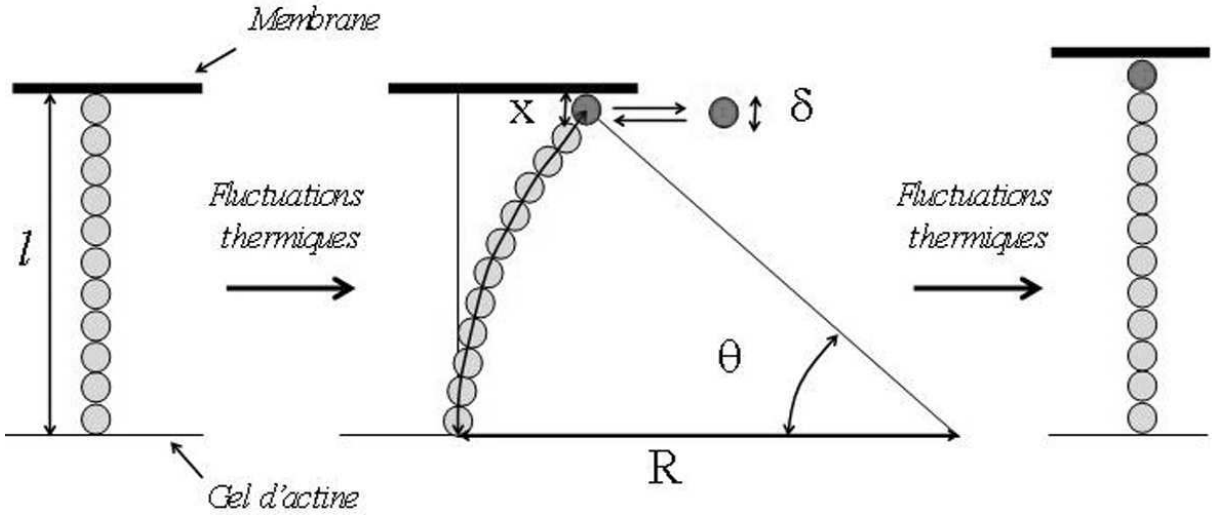

FIG. *3.8: L'extrémité libre d'un filament d'actine peut fluctuer et permettre l'insertion d'un monomère d'actine qui va ensuite pousser la membrane : le doigt grandit.*

Pour de faibles angles de courbure θ, on obtient $x = l - R\sin\theta \approx l^3/6R^2$, où R est le rayon de courbure de la configuration courbée (voir Fig. 3.8). Alors, l'énergie de courbure est donnée par :

$$E = B\frac{l}{2R^2} \approx B\frac{3x}{l^2}. \tag{3.1}$$

Si $x > \delta$, un monomère est ajouté et le filament d'actine exerce une force sur la membrane donnée par :

$$f = \frac{dE}{dx} = \frac{3B}{l^2}. \tag{3.2}$$

Si la force exercée par tous les filaments, f_{tot}, est supérieure à une force critique f_c, le *doigt* peut croître.

$$f_{tot} = \frac{3nl_pkT}{l^2}, \tag{3.3}$$

avec n le nombre de filaments poussant la membrane.

3.3.3.2 Rayon des doigts et force critique f_c.

Pour calculer la force critique f_c, l'énergie de courbure de la membrane du *doigt* F_b et son énergie de tension de membrane F_i doivent être prises en compte. Par simplicité, on

modélise un *doigt* par un cylindre de rayon R, de longueur L. L'énergie totale F_t est alors donnée par :

$$F_t = F_b + F_i - fL = \frac{1}{2}\kappa \int_0^{2\pi RL} dA'(2H)^2 + \int_0^{2\pi RL} dA'\sigma(A') - fL$$
$$= \pi\kappa\frac{L}{R} + \int_0^{2\pi RL} dA'\sigma(A') - fL, \tag{3.4}$$

où H est la courbure moyenne de la membrane, κ la rigidité de courbure de la membrane et σ la tension de membrane.

Si l'on se place aux tous premiers stades de la formation des *doigts* : $\sigma = \sigma_0$. La minimisation de l'Hamiltonien par rapport à L et R, nous donne la valeur R du rayon du *doigt* commençant à se former et la force f_c nécessaire à sa formation.

$$\frac{\partial F_t}{\partial L} = 0 \Longrightarrow f_c = \frac{\pi\kappa}{R} + \sigma_0 2\pi R \tag{3.5}$$

$$\frac{\partial F_t}{\partial R} = 0 \Longrightarrow R = \sqrt{\frac{\kappa}{2\sigma_0}} \tag{3.6}$$

On fait ensuite l'hypothèse que le rayon R ainsi obtenu reste le même tout au long de la croissance des *doigts*. De plus, on suppose ici qu'il n'y a pas de réservoir lipidique.

3.3.3.3 Tension membranaire.

Il existe deux expressions pour la tension de membrane σ, selon sa gamme de valeurs (Evans & Rawicz, 1990; Boal, 2002) :

1. La membrane cellulaire est naturellement froissée de telle sorte que l'aire A est beaucoup plus grande que l'aire projetée A_p. Une petite tension agissant sur la membrane va avoir tendance à la "dérider" et à augmenter A_p. Si cette tension est suffisamment importante on obtient : $A = A_p$. C'est le régime entropique donné par :

$$\sigma_{entro}(R, L) = \sigma_0 e^{\alpha\frac{\delta A}{A}}, \tag{3.7}$$

avec $\alpha = 8\pi\kappa/k_bT$ (Evans & Rawicz, 1990; Boal, 2002), $\delta A = p2\pi RL$ (avec p le nombre de *doigts*), A l'aire totale de la membrane.

2. Cependant, si la tension devient encore plus grande, A, lui-même, finit par augmenter, la force s'accroît entre les lipides, on est alors dans le régime élastique, où l'accroissement de tension est donné par :

$$\sigma_{el}(R, L) = k^m \frac{\delta A}{A} \tag{3.8}$$

avec, k^m module de compression élastique.
On a alors : $\sigma_{tot} = \sigma_0 + \sigma_{el}$

Pour savoir dans quel régime nous nous trouvons, il faut comparer ces deux expressions en utilisant la valeur des paramètres de l'annexe A.5 (p, κ, R, A, L, σ_0, k^m), on a alors :

$$\frac{\delta A}{A} = p\frac{2\pi RL}{A} \simeq \frac{50 \cdot 6 \cdot 10^{-1} \cdot 1,3}{5000} \simeq 10^{-2} \qquad \text{et} \qquad \alpha \simeq 10^4$$

donc,

$$\frac{\sigma_{entro}}{\sigma_{el}} = 10^2 * 3 \cdot 10^{-4} * \exp(10^2) \gg 1$$

On est donc dans le régime élastique.
A noter : $\frac{\sigma_{el}}{\sigma_0} = \frac{10^{-2}}{5 \cdot 10^{-4}} \gg 1$

3.3.3.4 Longueur des doigts.

Au fur et à mesure que les *doigts* grandissent, σ augmente. La valeur de f_c est toujours donnée par la minimisation par rapport à L du Hamiltonien des *doigts*, en utilisant l'expression élastique de σ (voir eq. 3.8), on retrouve (cf. eq. 3.5) :

$$f_c = \frac{\pi\kappa}{R} + \sigma_{tot} 2\pi R$$

Or d'après l'équation 3.6 :

$$\frac{\pi\kappa}{R} = 2\pi R\sigma_0$$

Donc :

$$f_c = 2\pi R(\sigma_{tot} + \sigma_0)$$

Or, on a vu que : $\sigma_0 \ll \sigma_{el}$. On peut donc écrire :

$$f_c = 2\pi R\sigma_{el} = \frac{p(2\pi R)^2 k^m L}{A} \tag{3.9}$$

Le *doigt* atteint sa longueur maximale, lorsque $f_c = f_{tot}$. En reprenant l'expression de σ_{el} (eq. 3.8)et de f_{tot} (eq. 3.3) et en écrivant $\rho = \frac{n}{\pi R^2}$, où ρ est la densité de filaments dans un *doigt* et n le nombre de filaments dans un *doigt*, on obtient :

$$L = \frac{3Al_pkT\rho}{4p\pi k^m l^2}, \tag{3.10}$$

En prenant les valeurs données dans l'annexe A.5, pour k^m, l_p, A, l et les valeurs expérimentales de $(R, L) \approx (100\text{nm}, 1.3\mu\text{m})$, on obtient grâce aux équations 3.10 et 3.6 :

- $\sigma_0 = 8.6 \cdot 10^{-5}\text{N/m}$, cette valeur est du même ordre de grandeur que celle obtenue par Raucher *et al.* ($3 \cdot 10^{-5}\text{N/m}$) (Raucher & Sheetz, 2000).
- $\rho/p = 2.5 \cdot 10^{13}\text{m}^{-2}$. Si on prend p=50 (valeur moyenne expérimentale pour une cellule faisant des *doigts* avec toutes ses voisines), on obtient une distance moyenne entre filaments d'actine poussant la membrane à l'intérieur de chaque *doigt* de 30 nm.

3.3.4 Contractilité ?

Nous n'avons pas pris en compte la contractilité acto-myosine dans notre modèle. Deux expériences nous amenèrent à conclure qu'elle n'intervenait pas directement. Nous avons, tout d'abord, transfecté des cellules avec la caldesmone qui inhibe la contractilité cellulaire (Helfman *et al.*, 1999) : les *doigts* restaient présents(voir Fig. 3.9). Si une cellule transfectée caldesmone faisait des contacts *doigts* avec une cellule non-transfectée (donc capable de tendre ses câbles d'acto-myosine), la symétrie concernant la contractilité était brisée, et pourtant on pouvait observer des *doigts* provenant aussi bien de la cellule transfectée, que de la cellule non-transfectée. La contractilité ne semblait donc pas être le moteur de formation des *doigts*.

De même, l'ajout d'un autre inhibiteur de contractilité le BDM (voir §2.2.2) au milieu cellulaire ne changeait pas la longueur des *doigts* (voir Fig. 3.10). La contractilité n'était donc pas nécessaire au maintien de ces structures.

Nous avons de plus voulu voir si elle n'était pas non plus nécessaire à leur formation. Pour cela, nous avons pris des cellules à confluence et détruit les contacts en utilisant un réactif qui dépolymérise les filament d'actine. Puis, nous avons observé la formation de nouveaux contacts, une fois le milieu lavé et le réactif retiré. La présence de BDM tout au long de l'expérience n'a pas empêché les *doigts* de se reformer comme dans des conditions

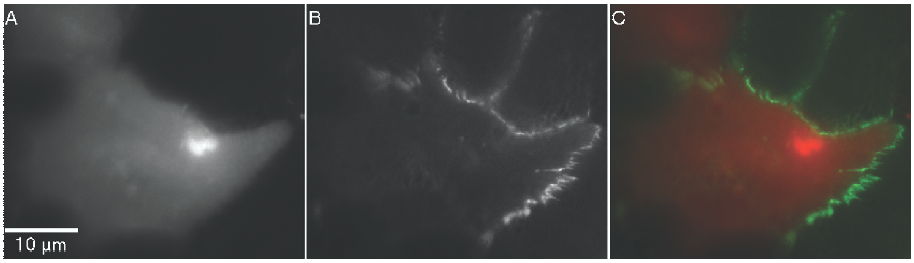

FIG. *3.9: A : Les cellules transfectées avec la caldesmone apparaissent en blanc. B : Image de fluorescence des contacts VE GFP, la transfection à la caldesmone qui bloque la contractilité cellulaire n'empêche pas la formation des doigts. C : superposition de A en rouge et de B en vert.*

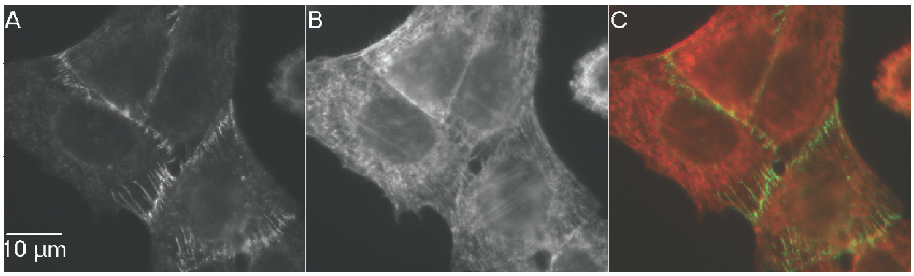

FIG. *3.10: A : Image de fluorescence de contacts CHO VE GFP en présence de 30 mM de BDM. B : Image de fluorescence des filaments d'actine de ces mêmes cellules. C : superposition de A en vert et de B en rouge.*

standards.

Cependant, récemment, des expériences ont montré qu'il fallait être prudent dans l'interprétation des résultats obtenus avec le BDM ; il ne semble pas être un inhibiteur universel de myosines (Titus, 2003). De plus, certaines expériences menées par Krendel *et al.* (1999) semblent contredire nos résultats. Ils ont eux aussi décrit 2 types de contacts, mais observés dans des lignées cellulaires différentes :

1. dans des cellules épithéliales, des contacts localisés tangentiellement aux bords des cellules adjacentes qui sont associés à un câble d'actine circulaire,
2. dans des fibroblastes, des contacts orientés radialement par rapport aux bords cellulaires et qui sont associés à des faisceaux d'actine.

Ils ont montré que l'on pouvait passer de (1) à (2) dans des cellules épithéliales IAR-2 en ajoutant par exemple du Nocodazole et que cet effet était inhibé lorsqu'ils traitaient

les cellules au préalable avec HA-1077 un inhibiteur de Rho-kinase. Ils ont interprété ces résultats en terme d'activation et d'inhibition de la contractilité. En effet, le nocodazole (qui dépolymérise les microtubules) a pour effet secondaire connu d'augmenter la contractilité (Liu *et al.*, 1998), en activant Rho (voir Fig. 3.13). Au contraire, HA-1077 inhibe, entre autre, Rho Kinase et donc la contractilité (voir Fig. 3.13). Il faut noter que leurs expériences ne sont faites qu'à partir d'une lignée épithéliale ne faisant que des *lignes*. Il n'y a donc pas d'expérience montrant directement la disparition de *doigts* formés naturellement (sans addition de réactifs) lorsque la contractilité est inhibée.

Nous avons voulu voir si nous obtenions le même genre d'effets sur nos cellules. En nocodazole, on observe en effet que les *lignes* se transforment en *doigts*, et surtout que les *doigts* s'allongent énormément dans le sens de la croissance des filopodes (voir Fig. 3.11).

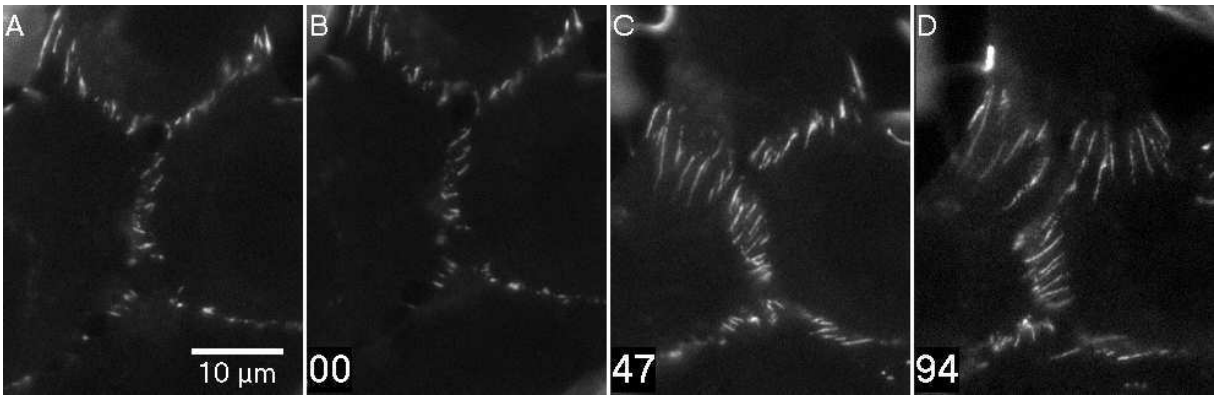

Fig. *3.11: A : Contacts doigts avant l'ajout du nocodazole; B, C, D : les contacts doigts s'allongent après ajout du nocodazole. Le temps est en min.*

Nous avons aussi utilisé H7 un inhibiteur de Rho-kinase (qui est un peu plus spécifique que HA-1077), et avons effectivement observé la disparition des *doigts* (voir Fig. 3.12).

Ces résultats semblent cohérents avec ceux de Krendel *et al.* (1999), mais ils s'opposent à ceux que nous avons obtenus en BDM et en caldesmone.

Il est en fait possible de donner d'autres interprétations que la contractilité pour le rôle du Nocodazole et de H7. En effet, si le nocodazole active bien la contractilité, il active aussi la polymérisation d'actine. En effet, la dépolymérisation des microtubules entraîne l'activation de Rho qui via la protéine mDia va activer la polymérisation (Bishop & Hall, 2000) (voir schéma 3.13).

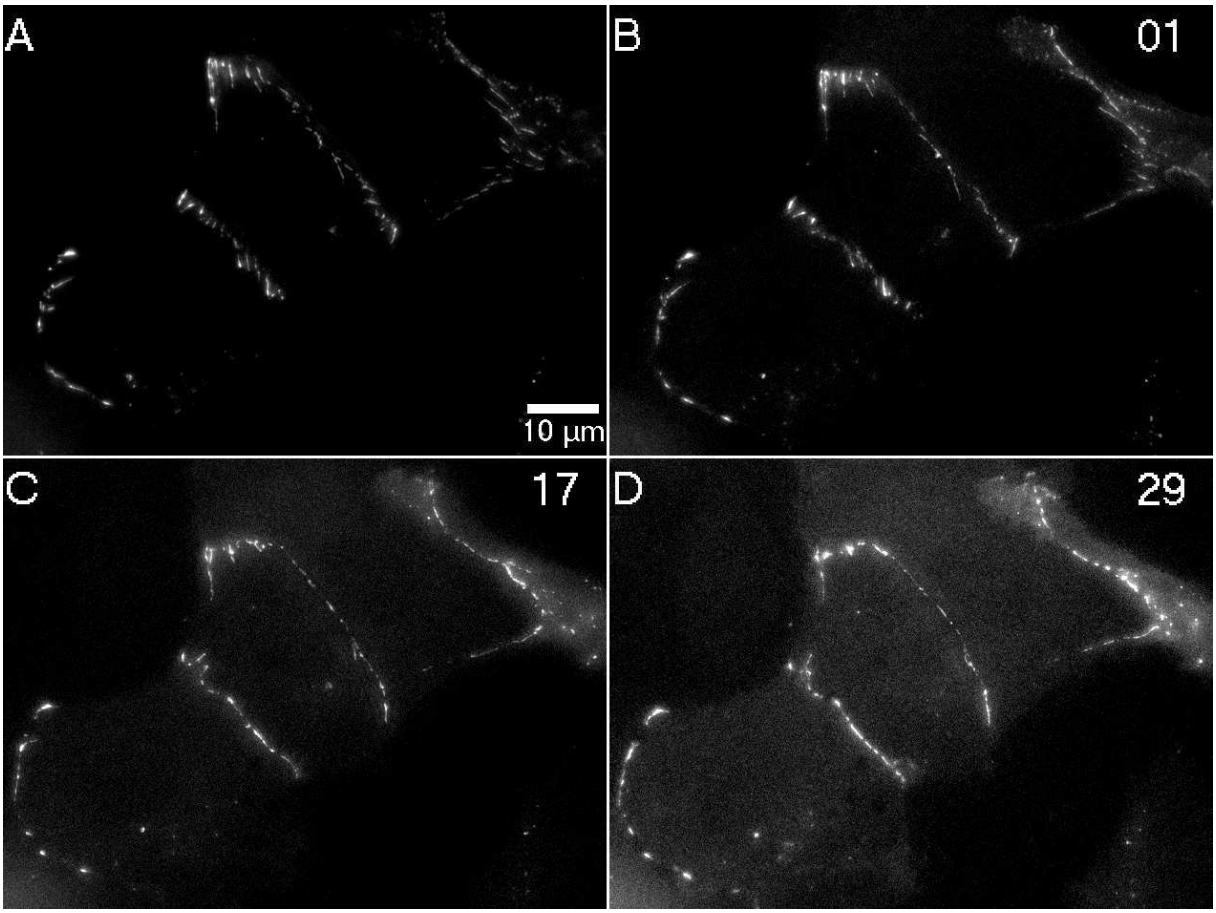

FIG. *3.12: A : Contacts doigts avant l'ajout de H7; B, C, D : les contacts doigts disparaissent après ajout de H7. Le temps est en min.*

De même, H7 est un inhibiteur de nombreuses kinases (Hidaka *et al.*, 1984), son effet ne se limite donc pas à l'inhibition de la contractilité. L'interprétation des expériences de Krendel *et al.* (1999) doit donc être faite avec prudence.

Il est possible que la contractilité contribue à l'allongement des *doigts* mais ce n'est sans doute pas l'élément clé. Outre nos résultats en BDM et caldesmone, de récentes expériences nous confortent dans cette voie. Des cellules transfectées avec des protéines altérant le réseau d'actine (cofiline, gelsoline) présentent un réseau intra-cellulaire d'acto-myosine détruit, mais des filaments d'actine intactes au contact : la contractilité n'est plus possible, mais les *doigts* restent stables.

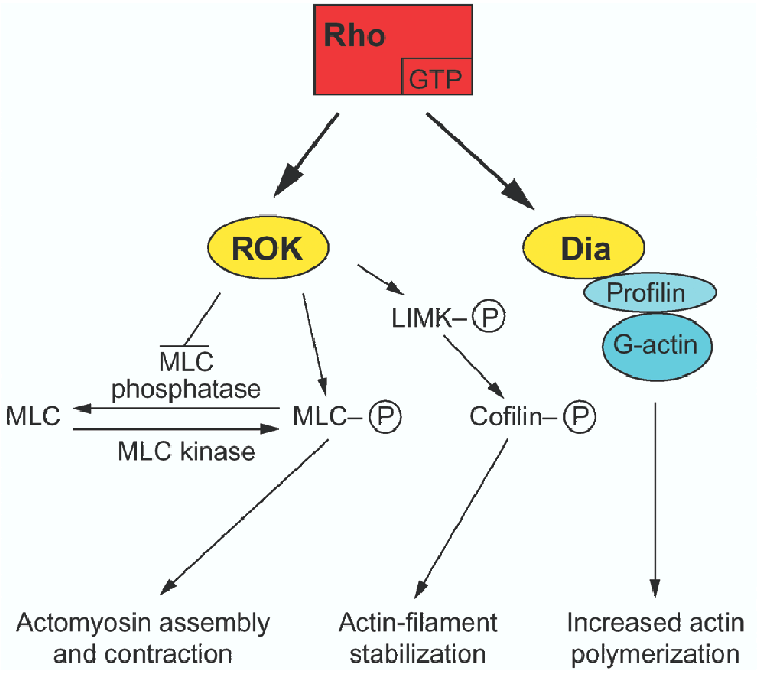

Fig. *3.13: Rho active la contractilité acto-myosine, mais aussi la polymérisation d'actine via la protéine mDia. Extrait de : Bishop & Hall (2000).*

3.4 Lignes.

Si la brisure de symétrie est une caractéristique frappante des *doigts*, l'étude de l'intensité des *lignes* donne aussi des résultats surprenants. Cette étude a été effectuée sur échantillons fixés, mais non perméabilisés (pour garder toutes les cadhérines VE GFP). Nous avons ainsi observé que l'intensité le long d'une *ligne* n'était pas uniforme (Fig. 3.14 a). La densité des cadhérines n'est pas constante au sein d'un même agrégat et le maximum de cette densité est, de plus, différente d'agrégats à agrégats. Ce résultat ne correspond pas aux modèles des transitions de phase classiques, où la densité dans les différentes phases est uniforme (excepté près du point critique). Nous avons de plus obtenu que la densité maximale qui se trouve au centre de l'agrégat dépendait linéairement de l'aire de cet agrégat (Fig. 3.14b). Cela montre que plus le noyau est de taille importante, plus il a tendance à se densifier, comme s'il existait une tension de ligne, obligeant le noyau à se compacter. Nous n'avons pas trouvé, pour l'instant, d'explications satisfaisantes pour cette distribution spatiale.

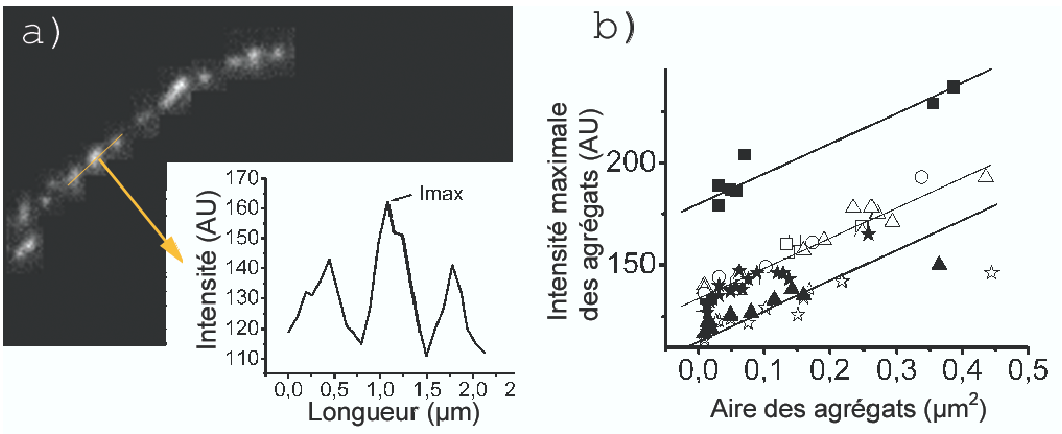

FIG. *3.14: (a) Image de fluorescence d'une ligne. Insert : Intensité le long d'une ligne de contact. (b) Maximum d'intensité des agrégats (maximum défini dans l'insert) en fonction de leur aire pour différentes lignes de contact. Les droites sont des guides pour les yeux. Chaque symbole représente un contact (n=6). Les erreurs pour l'intensité et l'aire sont estimées à 5 U.A. et 0.01 μm^2, respectivement. L'erreur sur l'aire est estimée en prenant une bille de 0.1 μm de diamètre et en mesurant les fluctuations apparentes pour son aire en fonction de l'intensité.*

3.5 Dynamique.

3.5.1 Croissance de doigts et de lignes.

Nous avons complété notre étude des contacts cellule-cellule avec des mesures de dynamique de nucléation et croissance des contacts des premiers stades aux stades les plus avancés. Dans ce but, nous avons utilisé des monocouches de cellules formant des jonctions adhérentes et nous les avons défaites en dépolymérisant l'actine à l'aide la latrunculine A (1,5 μM pendant 5 min, voir § 2.2.2). Pour obtenir des contacts cellules-cellules à peu près plans (voir §2.5), il fallait prendre des cellules juste confluentes (aire projetée par cellule de 400 à 500 μm^2). Après lavage, nous pouvions observer les cellules former de nouveaux lamellipodes et entrer en contact (voir Fig. 3.15, 3.16, 3.17). Cela nous a permis de mesurer la croissance de l'aire des *doigts* et des *lignes* en fonction du temps. On retrouve, une heure après lavage, une monocouche avec des contacts indiscernables de ceux existant en début d'expérience.

La figure 3.18 montre que l'aire totale des agrégats par facette croît linéairement en fonction du temps pour les *lignes* et les *doigts* de VE cadhérine avant d'atteindre une

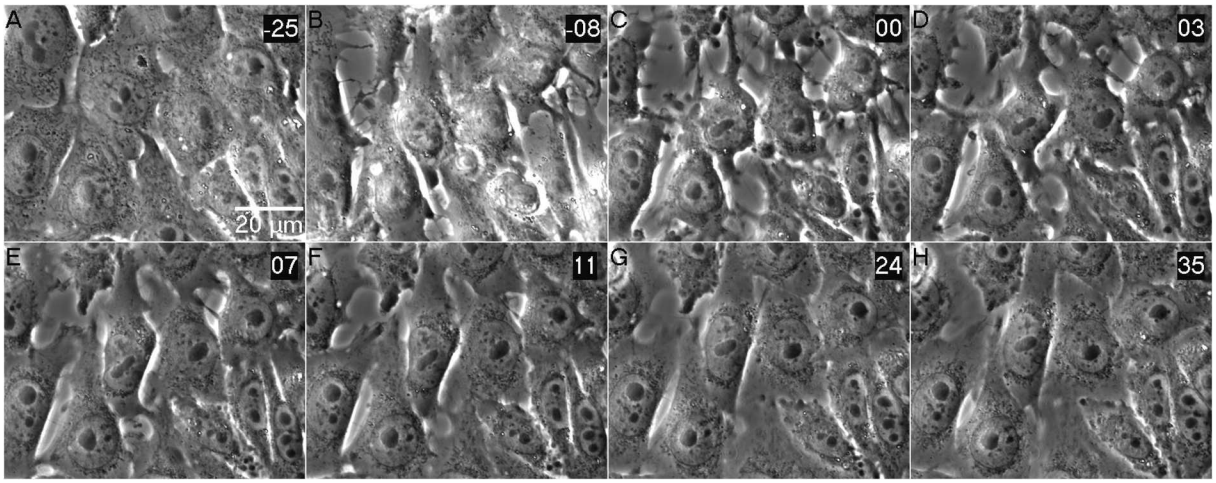

Fig. *3.15: Séquence d'images de phase d'une expérience en latrunculine A. A : avant ajout de latrunculine. B : pendant la latrunculine. C-H : après lavage ; le temps est en minutes.*

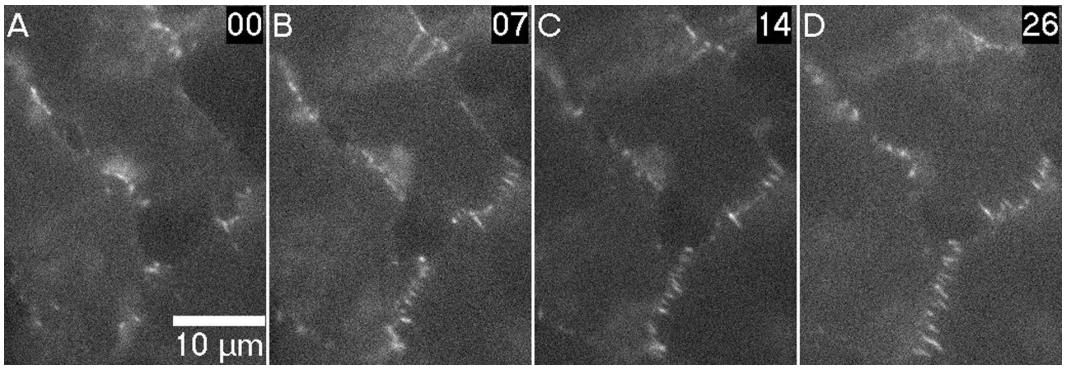

Fig. *3.16: Formation de doigts après lavage de la latrunculine A. Le temps est en minutes.*

saturation. Cependant, la pente moyenne pour les *lignes* (ronds noirs) est plus grande que celle pour les *doigts* (étoiles) : $0.009 \pm 0.003 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (moyenne sur 4 pentes, $P = 0.7$) et $0.0015 \pm 0.0007 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (moyenne sur 3 pentes, $P = 0.7$), respectivement.

3.5.2 Dynamique de formation des doigts.

D'après le modèle développé en 3.3.3, le *doigt* croît par addition de monomères d'actine. La variation de longueur du *doigt* en fonction du temps peut donc s'écrire de la façon suivante :

$$\frac{dL}{dt} = v_+ \exp\left(\frac{-f_t \delta}{k_b T}\right) - v_- \tag{3.11}$$

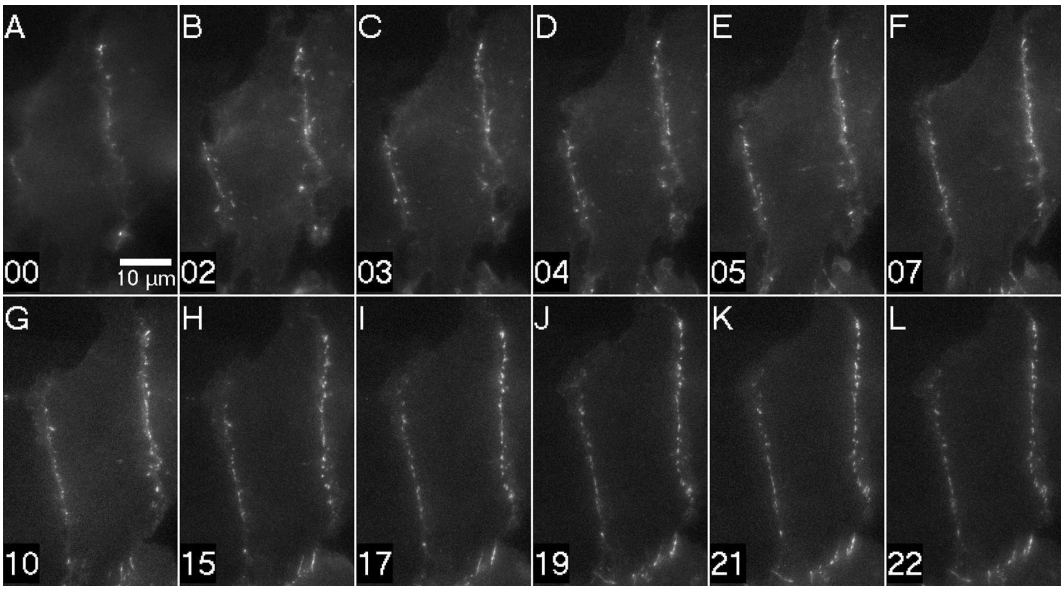

FIG. *3.17: Formation de lignes après lavage de la latrunculine A. Le temps est en minutes.*

où v_+ et v_- sont respectivement les vitesses de polymérisation, dépolymérisation de l'actine en l'absence de force f_t due à la tension de membrane, et $\exp\left(\frac{-f_t\delta}{k_bT}\right)$ représente la probabilité de créer un espace de taille δ pour insérer un monomère d'actine. On suppose que l'on est à chaque instant à l'équilibre thermodynamique, on a donc $f_t = f_c/n$ donnée par l'équation 3.9 :

$$\frac{f_t\delta}{k_bT} = \frac{(2\pi R)^2 pLk^m\delta}{nAkT} \equiv \frac{L}{\lambda},$$

où $\lambda = \frac{k_bTA\rho}{4\pi k^m p\delta}$

En intégrant l'équation 3.11, on obtient :

$$tv_+ = \int_0^L \frac{dL'}{\exp(-L'/\lambda) - \frac{v_+}{v_-}} \tag{3.12}$$

$$= \frac{\lambda}{v_-/v_+} \log\left(\frac{\exp(-L/\lambda)\left(1-\frac{v_-}{v_+}\right)}{\exp(-L/\lambda)-\frac{v_-}{v_+}}\right) = \frac{\lambda}{v_-/v_+}\log\left(\frac{1-\frac{v_-}{v_+}}{1-\frac{v_-}{v_+}\exp(L/\lambda)}\right) \tag{3.13}$$

Or à l'équilibre on a :

$$\exp(-L_{eq}/\lambda) = \frac{v_-}{v_+} \tag{3.14}$$

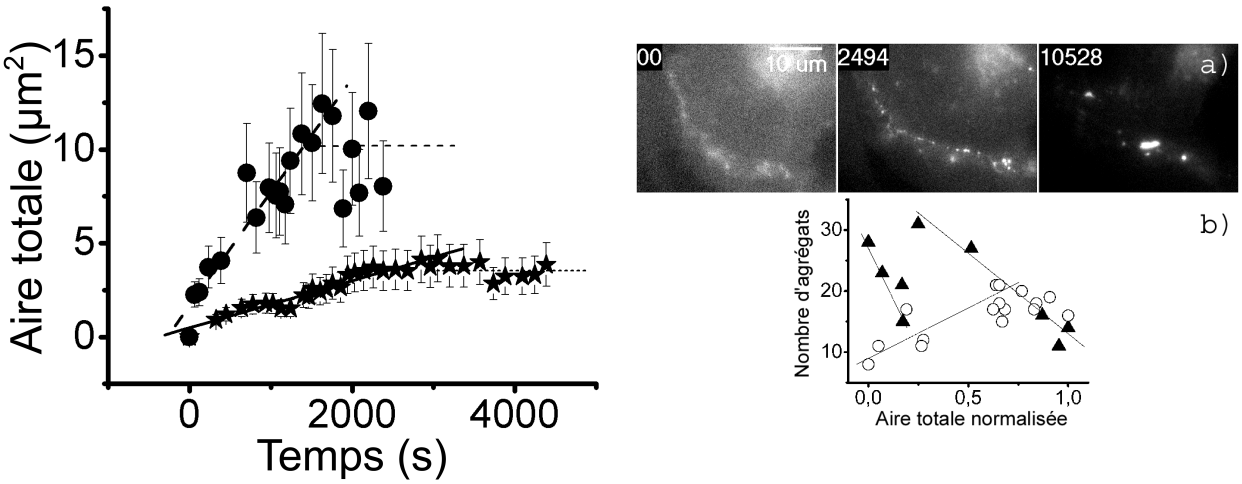

Fig. *3.18: A gauche : Evolution caractéristique de l'aire totale des agrégats de cadhérines pour une facette donnée (les étoiles représentent les doigts et les ronds les lignes). L'aire initiale est soustraite à l'aire mesurée. Le temps zéro correspond au temps du début de la croissance (moment où les membranes des cellules arrivent au contact). Les lignes sont des ajustements linéaires pour la partie croissante des courbes. Les traits en pointillé sont des guides pour les yeux dans le régime de saturation. A droite : Le réseau d'actine lié aux cadhérines empêche la fusion des agrégats. (a) Séquence temporelle d'images de fluorescence montrant la formation et l'évolution d'un contact VE tr, le temps est en secondes. Les petits agrégats fusionnent pour en former de plus gros. Cette fusion n'existe pas avec la VE cadhérine (voir Fig. 3.17). (b) Variation du nombre d'agrégats en fonction de l'aire totale normalisée du contact VE cadhérine (cercles) et du contact VE tr cadhérine (triangles). La normalisation est effectuée de telle façon que l'aire maximale est de 1. Les erreurs sont de 10 % sur le nombre d'agrégats et de 20 % sur l'aire absolue.*

L'équation 3.12 devient donc :

$$1 - \exp((L - L_{eq})/\lambda) = (1 - \exp(-L_{eq}/\lambda)) \exp(-tv_-/\lambda) \tag{3.15}$$

d'où :

$$L = L_{eq} + \lambda \ln\left(1 - (1 - \exp(-L_{eq}/\lambda)) \exp(-tv_-/\lambda)\right) \tag{3.16}$$

Si l'on prend les paramètres donnés en annexe A.5, on a : $\lambda = 0.1\mu m$. Si $v_- = 2.7 \times 10^{-3}\mu m.s^{-1}$, on obtient alors qu'en 10 secondes, le doigt croît de plus d'un μm. C'est une vitesse beaucoup plus rapide que les valeurs expérimentales observées. Mais, cette valeur de $0.1\mu m.s^{-1}$ correspond parfaitement aux vitesses de croissance de filopodes. Il faudrait

sans doute tenir compte, pour modéliser la croissance d'un *doigt* de cadhérines, d'une force de frottement, résultant de l'adhésion de ce filopode sur la cellule du dessous. Cette adhésion est absente de la croissance de filopodes libres, ce qui explique la différence de vitesse.

3.5.3 Dynamique de croissance des lignes.

La dépendance linéaire de l'aire des *lignes* en fonction du temps a une origine différente. Elle est due à l'apparition de nouveaux noyaux le long de la *ligne* (voir Fig. 3.18 droite, ronds blancs). Puisque la vitesse de fusion de ces noyaux est beaucoup plus lente que le taux de nucléation ν (sur l'échelle de temps de l'expérience nous ne voyons pas de noyaux fusionner ; par contre, nous voyons toujours de nouveaux noyaux apparaître), on trouve alors que l'aire A du contact s'écrit : $A = \nu a t$, où a est l'aire d'un noyau. En mesurant l'augmentation du nombre d'agrégats en fonction du temps, nous avons obtenu : $\nu = 0.02 s^{-1}$. Or, $a = 0.5 \mu m^2$, ce qui donne : $\nu a = 0.01 \mu m^2/s$. Ce résultat correspond bien à la pente mesurée sur la figure 3.18 gauche (ronds noirs).

L'actine joue aussi un rôle dans la formation des *lignes*. Le contact se forme au fur et à mesure que les membranes sont amenées au contact par la polymérisation d'actine. Mais, l'actine est aussi cruciale pour empêcher les agrégats de fusionner. Comme on peut le voir sur les images de la figure 3.18, quand les cadhérines ne peuvent se lier à l'actine, des noyaux se forment, mais fusionnent ensuite (voir Fig. 3.18 droite b). Là encore, l'actine apparaît comme un réseau imposant la structure du contact et donc la distribution finale des agrégats le long de la *ligne*.

3.6 Conclusion

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la croissance de deux structures de contacts cadhérines-cadhérines : les *lignes*, parallèles au plan de contacts et les *doigts*, perpendiculaires à ce même plan. Les *lignes* sont formées de petits noyaux dont la densité maximale en cadhérines est proportionnelle à leur aire. Il existe donc une tension de ligne permettant aux agrégats de se densifier au fur et à mesure qu'ils grandissent. Nous avons aussi mesuré la dynamique de croissance de ces structures. Nous avons obtenu une loi linéaire de l'aire en fonction du temps (pente : $0.009 \pm 0.003 \mu m^2/s$). Cette croissance est due à l'addition de noyaux de taille $a = 0.5 \mu m^2$. Nous avons pu mesurer un taux de nucléation

de $\nu = 0.02s^{-1}$. Nous nous sommes aussi intéressés aux *doigts*. Nous avons mesuré les tailles caractéristiques de cette structure périodique (distance entre *doigts* $d = 1.0\mu\text{m} \pm 0.1\mu\text{m}$, longueur des *doigts* $L = 1.3\mu\text{m} \pm 0.1\mu\text{m}$). Nous avons modélisé ces objets et avons expliqué leur taille finie comme le résultat de la compétition entre polymérisation d'actine et tension de membrane. Enfin, nous avons pu mesurer la loi de croissance de l'aire de contact des *doigts* en fonction du temps : nous avons obtenu une droite de pente : $0.0015 \pm 0.0007\mu\text{m}^2/\text{s}$. Cette vitesse de croissance (beaucoup plus lente que celle d'un filopode non adhérent) ne peut s'expliquer par la simple polymérisation d'actine limitée par la tension de membrane. Il faudra sans doute prendre en compte dans de futures études une force de friction résultat de l'adhésion des *doigts* sur la cellule voisine par les cadhérines.

Nous avons aussi obtenu par des expériences de récupération de fluorescence après photoblanchiment, que les cadhérines au sein d'un contact étaient sans cesse échangées, et que le transport de matière se faisait par diffusion des cadhérines dans la membrane et non par apport de matière par le cytoplasme via les microtubules. De plus, les filaments d'actine servent de charpente aux jonctions adhérentes.

Enfin, ces expériences ont permis de montrer que l'actine jouait un rôle important dans l'adhésion cellulaire mettant en jeu les cadhérines. L'actine impose la géométrie des contacts et permet la croissance de *doigts*. Elle stabilise en outre les agrégats de cadhérines et permet à de nouveaux noyaux d'apparaître en amenant les membranes au contact.

4

Membrane et contractilité acto-myosine

4.1 Introduction

De nombreux travaux ont été menés sur l'assemblage des contacts focaux (voir § 1.2.2). Les derniers résultats montraient que les protéines cytoplasmiques de ces contacts (PCCF) s'agrégeaient lorsque la contractilité acto-myosine était activée (Riveline *et al.*, 2001). La cellule peut appliquer localement une force sur le substrat grâce aux câbles d'acto-myosine reliés aux contacts focaux. Cette structure se comporte comme un ressort qui s'étend sous l'application d'une force, révélant de nouveaux sites d'adhésion pour les PCCF. L'adhésion est alors renforcée. Ces conclusions sont-elles valables pour les contacts cellule-cellule, qui sont aussi reliés à l'actine ? C'est la question que nous avons tout d'abord voulu poser. Pour cela, nous avons utilisé une géométrie plane pour que la comparaison soit plus simple avec les contacts focaux : nous avons donc greffé des cadhérines sur une surface de verre et observé l'adhésion de cellules exprimant la VE cadhérine GFP par microscopie à ondes évanescentes.

4.2 Greffage de Cadhérines : état de l'art.

Plusieurs groupes ont déjà greffé des cadhérines sur des billes ou sur des lamelles de verre. Ils ont ensuite pu observer l'effet de l'adhésion des billes sur les cellules, ou des cellules sur ces lamelles.

Les expériences sur les billes permettent de contrôler l'activation de la liaison cadhérine-cadhérine et d'en mesurer ses effets. Levenberg *et al.* (1998) ont ainsi montré que l'adhésion de billes recouvertes par simple adsorption de la partie extracellulaire de la N-cadhérine sur des cellules CHO exprimant cette même cadhérine entraînait, à distance, un recrutement important de cadhérines et de β-caténines aux jonctions cellulaires (et non autour des

billes), ainsi qu'une phosphorylation des tyrosines à ces mêmes jonctions. Lambert *et al.* (2000) ont eux montré qu'il était possible de recruter autour de billes recouvertes de Fc-N-cadhérines toutes les protéines des jonctions adhérentes : p120, β-caténine, α-caténine. La technique de greffage des protéines sur les billes permet ici une bonne orientation des cadhérines : les billes sont recouvertes d'anticorps anti-Fc, puis incubées avec la Fc-N-cadhérine. Ces billes provoquent aussi un recrutement et un réarrangement de l'actine. Enfin, leur suivi par "single particle tracking" (voir § 1.1.2) permet d'établir leur mouvement (Lambert *et al.*, 2002) : elles passent d'un mouvement brownien à un mouvement rétrograde lorsque les cadhérines se lient à l'actine. Ce mouvement peut être arrêté par l'expression du mutant négatif de Rac1.

Enfin, les billes permettent d'exercer des forces sur les contacts cadhérines-cadhérines ainsi formés, par l'utilisation de pinces optiques. Baumgartner *et al.* (2003) ont ainsi montré que l'adhésion était beaucoup moins forte lorsque les cellules exprimant la VE cadhérine étaient traitées avec des produits augmentant la perméabilité des jonctions (cytochalasine D et calcium ionophore A23187). Là encore, la technique de greffage permet une bonne orientation des cadhérines : les billes sont couvertes de protéines A, puis incubées avec la Fc-VE-cadhérine. Si les billes adhéraient correctement sur les cellules, il était impossible de les détacher quelle que soit la puissance du laser utilisée (de 20 à 200 mW). Par contre si l'adhésion était faible, elles pouvaient être détachées dès 20 mW, puissance à laquelle ils effectuèrent donc toutes leurs expériences. Ils comptabilisèrent ainsi le pourcentage de billes (normalisé par rapport à la condition contrôle) adhérant sur les cellules en présence de divers réactifs. En présence de cytochalasine D et A23187 seulement 30% des billes adhérent correctement alors qu'au contraire en présence de jasplakinolide (réactif qui stabilise l'actine) 121% de billes étaient adhérentes. L'actine joue donc un rôle sur la force de l'adhésion.

Quant à l'intérêt du greffage sur lamelle, il est très clair pour les biologistes : il permet d'étudier la séquence d'événements qu'entraîne la mise en commun de cadhérines, de décrypter les voies de signalisation liées à cette adhésion. Cela est très difficile à faire dans des conditions naturelles, car ces signaux sont associés à ceux envoyés par l'adhésion liée à d'autres types de contacts (contacts focaux, jonctions "serrées" (tight junctions)...). Voici d'abord quelques exemples des types de greffages effectués et des résultats obtenus. Nous verrons ensuite les problèmes et limites associés à ces greffages de surface.

Le premier groupe à avoir publié des résultats dans cette géométrie fut celui de Gumbi-

ner (Brieher *et al.*, 1996; Yap *et al.*, 1997, 1998). Ils travaillaient avec la partie extracellulaire de la C-cadhérine (CEC1-5) glycosylée qu'ils greffaient par adsorption sur des lamelles de verre. Ils amenaient ensuite des CHO transfectées de façon stable avec la C-cadhérine entière ou mutée sur les surfaces de CEC1-5, puis les exposaient à un flux. Les CHO non transfectées avec la cadhérine adhéraient très faiblement sur ces surfaces contrairement aux CHO transfectées avec la C-cadhérine. Ils montrèrent que l'adhésion est beaucoup plus forte quand la cadhérine exprimée par la cellule est entière que lorsqu'on lui a retiré sa partie cytoplasmique lui permettant de lier l'actine. L'actine apparaît donc comme un moyen de renforcer l'adhésion. Ils prouvèrent ensuite que l'agrégation de cadhérines par sa partie juxtamembranaire comportant le site de fixation à p120 renforçait aussi l'adhésion par rapport aux cadhérines dont toute la partie cytoplasmique avait été supprimée.

Noren *et al.* (2001) ont ensuite repris ces travaux pour s'intéresser cette fois aux niveaux d'expression des GTPases Rho, Rac et Cdc42, lorsque des cellules adhéraient sur de telles surfaces. Ils utilisèrent un nouveau greffage covalent de His-C-cadhérines, sur des surfaces recouvertes de Ni-NTA (c'est aussi le protocole que nous avons utilisé pour la préparation de nos surfaces, voir § 2.3.1.2). Ils conclurent que la liaison cadhérine-cadhérine activait Rac et inhibait Rho.

Enfin, le groupe de Yap a ensuite étudié la E-cadhérine avec le même type d'expériences. Il adsorbait sur des surfaces de verre la partie extracellulaire de la E-cadhérine liée à des fragments Fc lui permettant d'assurer la dimérisation des cadhérines. Cette dimérisation semble en effet procurer une meilleure adhésion. Ils ont ainsi montré que l'interaction cadhérine-cadhérine entraînait un recrutement de Arp2/3 aux contacts adhésifs naissants (extrémité des lamellipodes pour les auteurs) (Kovacs *et al.*, 2002b) et une activation de Rac et PI3 kinase (Kovacs *et al.*, 2002a). Ils ont enfin trouvé qu'en mutant la cadhérine pour l'empêcher de se lier à p120, Rac n'était plus activé (Goodwin *et al.*, 2003).

Bien que tous ces effets montrent le rôle de l'interaction homophilique cadhérine-cadhérine dans l'activation de voies signalétiques, il n'y a pas de preuves claires montrant que l'actine, la β-caténine et l'α-caténine colocalisent avec d'éventuels motifs de cadhérines en surface. De plus, aucune expérience n'a montré que ces agrégats quand on les distinguait étaient vraiment liés à la surface. Il est particulièrement frappant de voir que dans l'article (Goodwin *et al.*, 2003), les auteurs ont eu recours à des billes pour voir une colocalisation de protéines et ont seulement utilisé les surfaces pour des Western blots[2].

[2] A noter : le greffage des cadhérines sur les billes était un peu différent, elles étaient d'abord recouvertes

Pourquoi ne peut-on observer ces colocalisations en surface ? Les réponses signalétiques rapportées ne sont donc pas forcément les mêmes que celles liées à la formation de réelles jonctions adhérentes.

4.3 Notre greffage : résultats

Nous avons greffé des VE cad1-4 his sur des surfaces recouvertes de nickel en suivant le protocole décrit au § 2.3. Ensuite, nous resuspendions des cellules EAhy transfectées avec l'ADN de la VE cadhérine GFP ou de la VE cadhérine tronquée GFP sur ces surfaces et nous suivions l'évolution des motifs de cadhérines fluorescentes sur le plan d'adhésion par microscopie à ondes évanescentes (voir 2.4.3) pendant 24 h. Nous avons aussi mené des expériences de flux pour estimer la force d'adhésion de ces cellules, mais seulement aux temps courts (15 min), car ensuite il était impossible de détacher les cellules avec des flux engendrant des forces de cisaillement de l'ordre de 15pN/μm^2.

4.3.1 Temps courts : de 0 à 3 h après resuspension.

4.3.1.1 Effet de la densité de cadhérines en surface.

Pour savoir si nos surfaces étaient fonctionnelles, nous avons testé l'influence de la densité de cadhérines sur l'adhésion des cellules. Nous avons donc incubé les lamelles avec différentes concentration de cadhérines en solution. Nous avons montré que la densité de cadhérines greffées en surface était proportionnelle à cette concentration d'incubation (voir § 2.3.1.3). Puis, nous avons mesuré le nombre moyen de cellules étalées dans un champ optique de 0.6 mm^2 en fonction de la densité de cadhérines une heure après resuspension d'une même quantité de cellules sur chaque lamelle (Fig. 4.1). Lorsque l'incubation des cadhérines a lieu en présence d'EGTA, le nombre de cellules est d'autant plus grand que la concentration d'incubation en cadhérines (et donc de la densité de cadhérines greffées en surface) est importante.

Pour mesurer la force d'adhésion des cellules, nous les avons exposées à un flux de cisaillement en utilisant une chambre à flux laminaire (voir § 2.3.3.1). Nous laissions les cellules adhérer 15 min sur les surfaces, puis nous appliquions un flux constant de $488ml/h$,

de protéine A avant d'être incubées avec les Fc-cadhérines. L'orientation des cadhérines est théoriquement meilleure que sur les surfaces, où le greffage des cadhérines se fait directement par simple adsorption sans utilisation de protéine A.

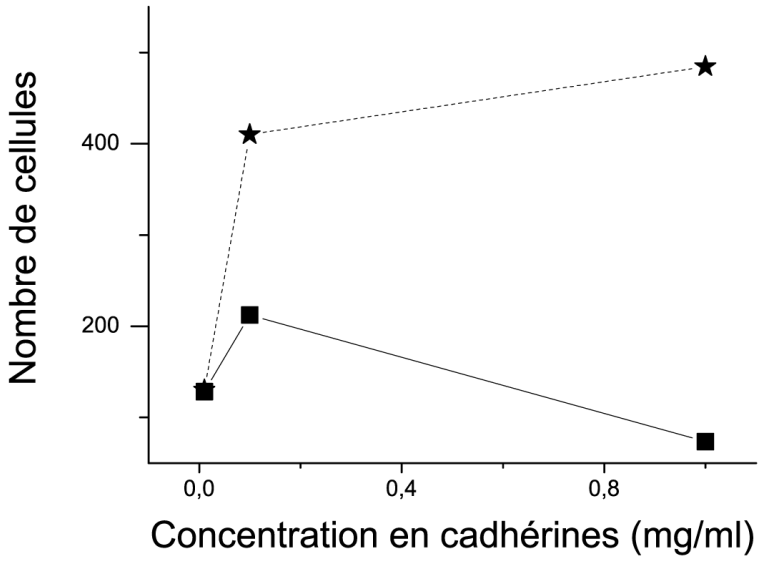

FIG. *4.1: Les cellules sont sensibles au greffage de surface. Nous avons incubé les lamelles avec différentes concentrations de cad1-4 his en présence (rectangles et lignes pleines) ou en l'absence de calcium (EGTA 5mM) (triangles et lignes pointillées). On voit que pour un même nombre de cellules resuspendues au départ, 2 à 5 fois plus de cellules adhèrent lorsque le greffage a été effectué en présence d'EGTA. En effet, comme expliqué au § 2.3, nous avons greffé dans ces conditions seulement des monomères de cadhérines capables de se lier aux cadhérines de la cellule, ce qui n'est plus le cas lorsque l'on greffe des hexamères. Le maximum observé dans le cas du greffage en présence de calcium à 0.1 mg/ml (2 μM), peut être expliqué par le fait que l'équilibre monomère-hexamère est déplacé vers les monomères quand la concentration décroît, les cellules vont donc mieux adhérer. Mais, si la concentration est trop faible, il y a sur la surface plus de BSA que de cadhérines, les cellules ont du mal à s'attacher.*

soit une force de $15pN/\mu m^2$. Cette valeur correspond au flux maximum que nous pouvions appliquer à l'aide du pousse-seringue. Il fallait en effet le flux le plus important possible pour détacher un nombre significatif de cellules aux concentrations de cadhérines les plus importantes. Nous avons mesuré la décroissance du nombre de cellules résistant à l'application du flux en fonction du temps. Nous avons pu ajuster nos résultats avec une exponentielle décroissante : $y = y_0 + A_1 \exp(-x/t_1)$, comme l'avaient proposé Cozens-Roberts *et al.* (1990a,b) (voir Fig. 4.2). t_1 caractérise l'adhésion au substrat : plus les cellules adhèrent, plus t_1 est grand. Or, la figure 4.2 montre que t_1 augmente avec la densité de cadhérines. Les cellules sont donc sensibles au recouvrement de surface.

Il est pourtant difficile d'interpréter ces résultats, étant donné la présence à ces temps courts de deux types de contacts différents : les contacts cadhérines-cadhérines et les contacts focaux (voir paragraphe suivant). Ces derniers étaient tout-à-fait inattendus, car aucune observation de ce type de contacts sur les surfaces de cadhérines n'avaient été rapportée jusqu'à présent.

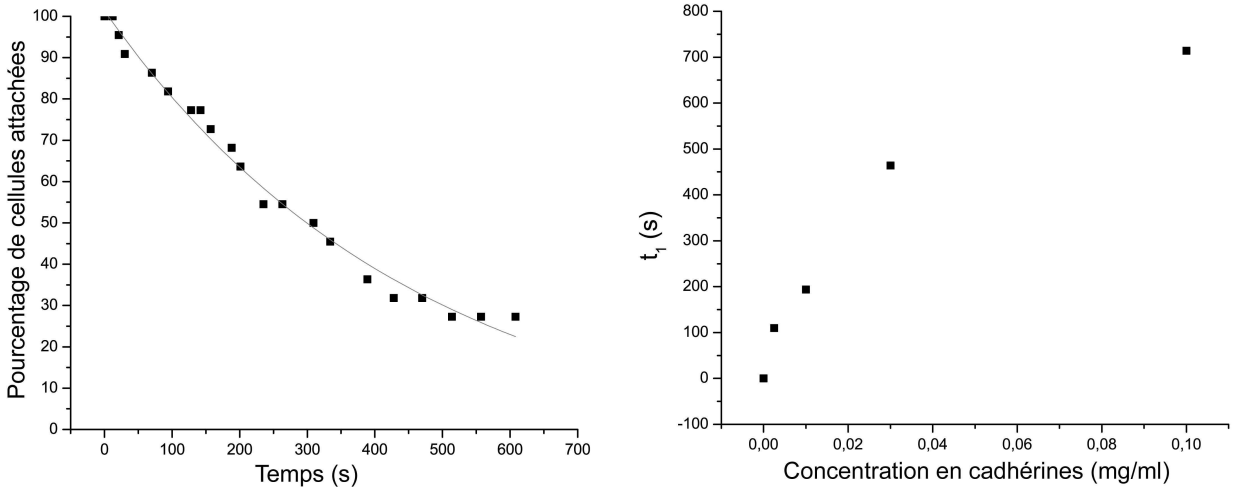

Fig. *4.2: A gauche : Pourcentage de cellules attachées au substrat de cadhérines en fonction du temps. La concentration de cadhérines est de 0.03 mg/ml (0.6 μM). Les points expérimentaux sont ajustés par une exponentielle décroissante : $y = y_0 + A_1 \exp(-x/t_1)$, avec ($y_0 = -6.6 \pm 8.9$, $A_1 = 107.9 \pm 8.3$, $t_1 = (464.1 \pm 66.4) s^{-1}$). A droite : Temps de décroissance t_1 en fonction de la concentration en cadhérines. La croissance de cette fonction montre que les cellules sont sensibles à la densité de cadhérines en surface.*

4.3.1.2 Motifs de cadhérines.

Aux temps courts (entre 0 et 3h après resuspension des cellules), on observe différents types de motifs VE GFP :

- des agrégats diffusant très légèrement avec un coefficient de diffusion de $4{\cdot}10^{-12} cm^2/s$ correspondant à celui des cadhérines liées au cytosquelette mesuré par Kusumi *et al.* (1993).
- des agrégats ayant un mouvement directionnel avec une vitesse de l'ordre de 0.4 $\mu m.s^{-1}$. Cela correspond à la vitesse de vésicules transportées par des moteurs le long de microtubules (voir Fig. 4.4).
- des tubes qui se forment sous la cellule, grandissent sur plusieurs micromètres puis disparaissent (voir Fig. 4.3). Ils mettent quelques minutes pour arriver à leur taille

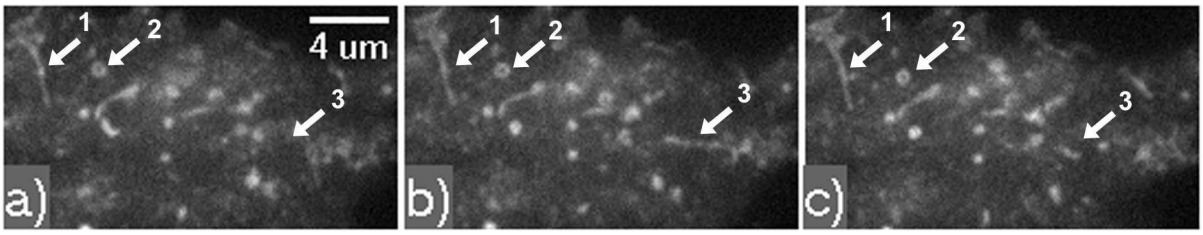

FIG. *4.3: EAhy exprimant la VE cadhérine GFP sur une surface de cadhérines. a) t=0 ; b) t=2min ; c) t=5min. On peut voir un tube stable (flèche 1), la même structure apparaissant en b) et disparaissant en c) (flèche 3) et une structure circulaire (flèche 2).*

finale. Certains peuvent parfois rester stables plus d'une heure.

– quelques vésicules qui viennent "frapper" la surface et disparaissent. Ils nous est impossible de dire si celles-ci fusionnent avec la membrane, ou bien si elles repartent vers l'intérieur de la cellule.

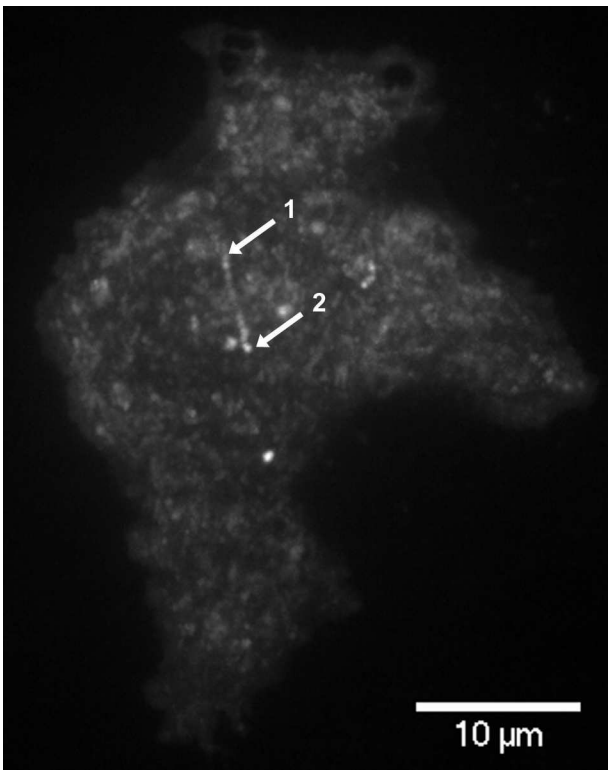

FIG. *4.4: Cette figure est le résultat de la superposition de 20 images prises à 1 seconde d'intervalle les unes des autres. On peut ainsi visualiser le mouvement directionnel d'une vésicule partant du point 1, pour aller au point 2 en 20 secondes.*

Tous ces motifs sont en général très intenses et peuvent masquer un réseau de motifs de cadhérines moins apparent et immobile qui apparaîtra plus nettement par la suite.

Outre ces motifs de cadhérines, on observe des contacts focaux riches en protéines phosphorylés (résidus tyrosines), paxilline, vinculine et actine (voir Fig. 4.6). Mais, ces contacts ne sont pas liés à la fibronectine (pas de marquage visible en immunofluorescence). Nous n'avons cependant pas fait de marquage pour la laminine ou la vitronectine. Si ces molécules s'avéraient présentes il faudrait qu'elles soient restées attachées aux cellules lors de la resuspension (ce qui est peu probable puisque nous avons utilisé de la trypsine et effectué plusieurs lavages), ou bien qu'elles aient été synthétisées par la cellule. Mais, il faut plusieurs heures pour que les cellules puissent recommencer à secréter des protéines après resuspension. Or les contacts focaux sont présents très rapidement (dès la première demi-heure). Il est donc possible que les intégrines de la cellule interagissent avec les cadhérines en surface. Une telle interaction a déjà été observée (Higgins *et al.*, 1998; Whittard *et al.*, 2002).

4.3.2 Temps longs : temps supérieurs à 5 h.

4.3.2.1 Description des motifs et comparaison avec les contacts focaux.

Cinq heures après resuspension, certaines cellules commencent à présenter des motifs VE-cadhérines GFP complètement différents de ce que l'on pouvait voir les premières heures. On observe ainsi à la périphérie des cellules des motifs allongés qui font penser à des contacts focaux par leur forme. La figure 4.5 permet de comparer ces deux structures. Les images de a à d, présentent des images d'immunofluorescence de contacts focaux d'une cellule EAhy adhérant sur une surface recouverte de protéines de la matrice extracellulaire (PMEC). Ils sont localisés à la périphérie et sont allongés (environ 4 μm). L'extrémité des fibres de tension colocalisent avec ces motifs (Fig. 4.5 d). Ils contiennent des protéines phosphorylées (résidus tyrosines), des vinculines et des paxillines, mais pas de cadhérines. En e) on peut voir le type de motifs cadhérines GFP observés sur les surfaces de cadhérines. Ils ressemblent un peu aux contacts focaux par leur position et leur élongation. Mais, le nombre de motifs par unité de surface est plus important : les cadhérines peuvent parfois complètement recouvrir un bord de cellule. De plus, des expériences d'immunofluorescence ont montré que, contrairement aux contacts focaux, ils ne sont pas associés à des fibres de tension (Fig. 4.5 d,h). D'autres marquages d'immunofluorescence ont par ailleurs montré

que les caténines étaient absentes de ces motifs.

Outre ces motifs allongés, on observe en général au centre de la cellule un réseau percolé de petits agrégats de cadhérines.

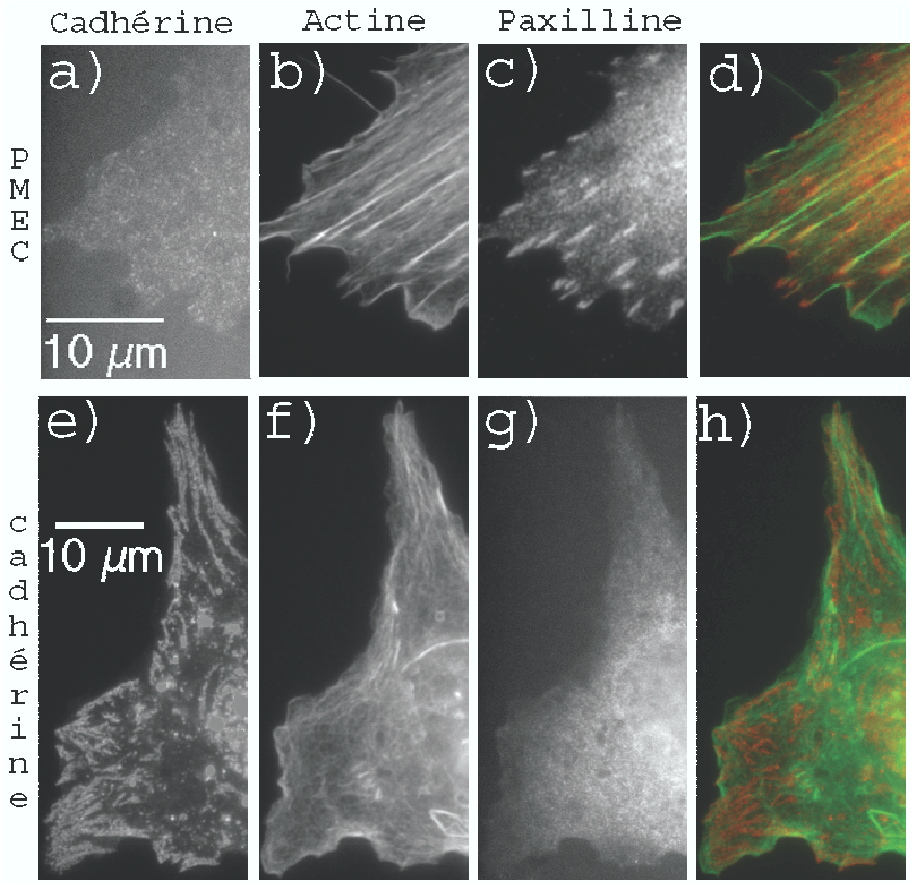

FIG. *4.5: Images d'immunofluorescence d'une cellule adhérant sur un substrat couvert de protéines de la matrice extracellulaire (PMEC) (a-d) et sur un substrat de cadhérines (e-h). a) et e) sont marqués pour la cadhérine, b) et f) pour l'actine, c) et g) pour la paxilline. d) est une image combinée de b) en vert et c) en rouge. h) est une image combinée de e) en rouge et f) en vert.*

4.3.2.2 Apparition des motifs et disparition des contacts focaux.

L'apparition des motifs cadhérines sur le bord des cellules coincide avec une disparition des contacts focaux sur les surfaces de cadhérines. Ce phénomène se passe progressivement, et n'a pas lieu pour toutes les cellules en même temps. La figure 4.6 présente des images de deux cellules prises sur une même lamelle 24 h après resuspension. La cellule en A présente des motifs cadhérines mais qui ne sont pratiquement pas situés en périphérie de la cellule,

et en B on peut voir qu'il reste alors des contacts focaux sur les bords. Par contre, sur la cellule en C, où les motifs sont localisés au bord de la cellule, les contacts focaux ont disparu (D).

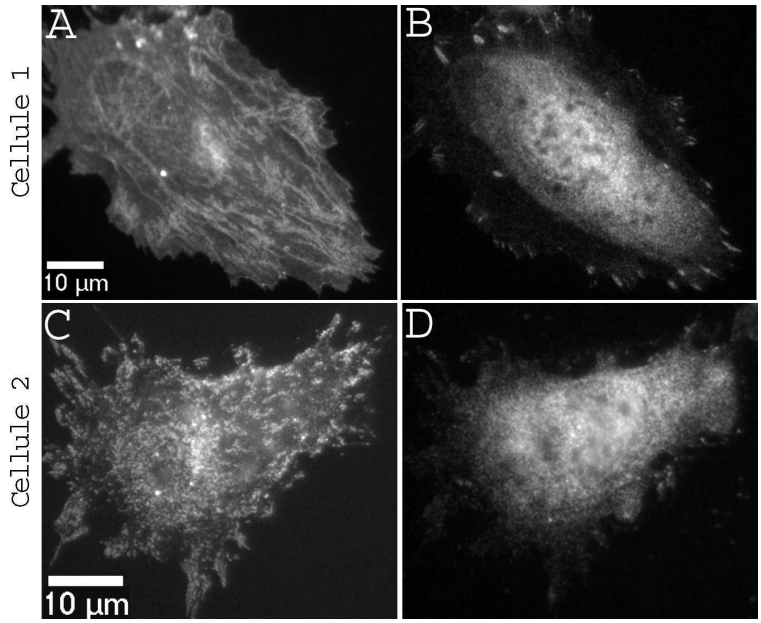

Fig. *4.6: A et C sont des images de contacts VE-cadhérines GFP. B et D sont des marquages de la paxilline de A et C respectivement.*

Nous avons observé la dynamique de ce phénomène. La figure 4.7 en donne un exemple. L'extrémité du lamellipode ne présente au départ aucun motif cadhérine visible, il est très probable que des contacts focaux sont présents, puis des cadhérines s'agrègent progressivement sur les bords, jusqu'à l'obtention d'un réseau très intense en F.

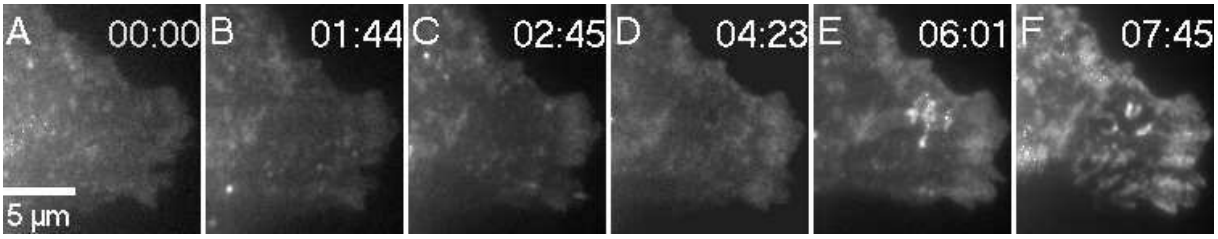

Fig. *4.7: Evolution temporelle des contacts de GFP cadhérines suivis par ondes évanescentes. Les cadhérines s'accumulent progressivement sur le bord du lamellipode. Le temps est en heure : minutes.*

Ces derniers motifs sont stables et immobiles pour au moins 24 heures, les nombreux mouvements de vésicules observés lors des premières heures disparaissent complètement.

La cellule semble s'éteindre. Il est cependant possible de la "réanimer" en ajoutant du sérum très peu de temps (quelques minutes) après la formation des motifs de cadhérines finaux ; les cellules sont alors à nouveau capables de former des lamellipodes : elles sont toujours en vie. Mais, si l'on attend trop longtemps avant d'ajouter le sérum, la cellule ne donne plus aucun signe de vie cellulaire.

4.3.2.3 De véritables motifs.

En microscopie à ondes évanescentes, l'épaisseur d'excitation est d'environ 200 nm. Le signal de fluorescence peut donc provenir de cadhérines GFP proches de la surface, mais pas forcément liées aux cadhérines de la surface. Pour savoir si les motifs obtenus correspondaient bien à des cadhérines liées, nous avons solubilisé la membrane en ajoutant 0.1% de SDS ou 1% de Triton. Les surfactants permettent de solubiliser toutes les protéines membranaires non liées à la surface et au cytosquelette. Les contacts sont restés les mêmes, au photoblanchiment près. Nous en avons donc conclu que les motifs de cadhérines GFP observés étaient réellement liés à la surface.

4.4 Rôle de l'actine.

L'actine n'est pas nécessaire à la formation des motifs de cadhérines. Deux expériences nous ont conduits à cette conclusion. Nous avons tout d'abord utilisé des cellules exprimant la VE tr cadhérine GFP qui n'est pas capable de se lier à l'actine. Nous avons observé les mêmes motifs que ceux observés avec la cadhérine entière (voir Fig. 4.8).

Nous avons d'autre part ajouté au milieu de culture de la Latrunculine A, qui dépolymérise l'actine. Cela n'a pas détruit les motifs déjà formés, et a même conduit à l'apparition de nouvelles structures dans certains cas (voir Fig. 4.9).

Nous pouvons conclure de ces deux expériences que l'actine n'est pas nécessaire à la formation et à la stabilité des motifs. De plus, nous avons aussi marqué les cellules aux temps longs pour les protéines qui normalement font partie des jonctions adhérentes : p120, β-caténine. Elles étaient absentes des motifs. Cela confirmait bien que l'actine n'était pas connectée aux cadhérines par ce complexe.

Ainsi, l'objet que nous avons étudié est complètement différent d'une jonction adhé-

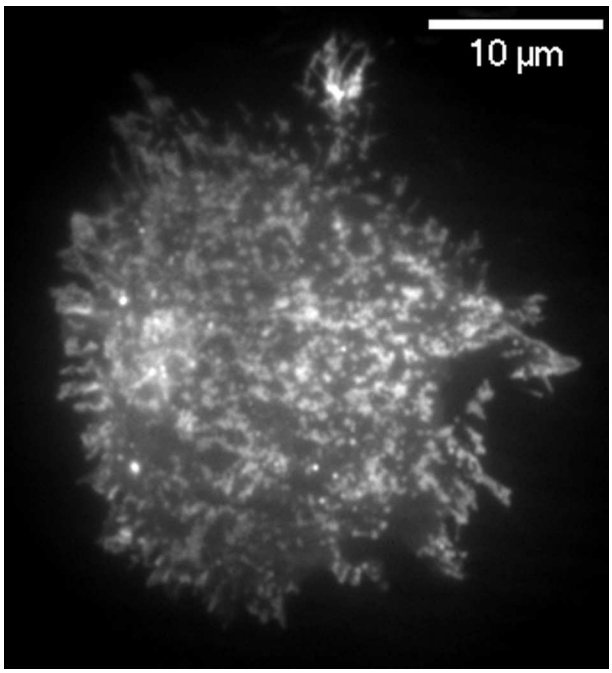

Fig. *4.8: Motifs de VE tr cadhérines GFP sur une surface de cadhérines.*

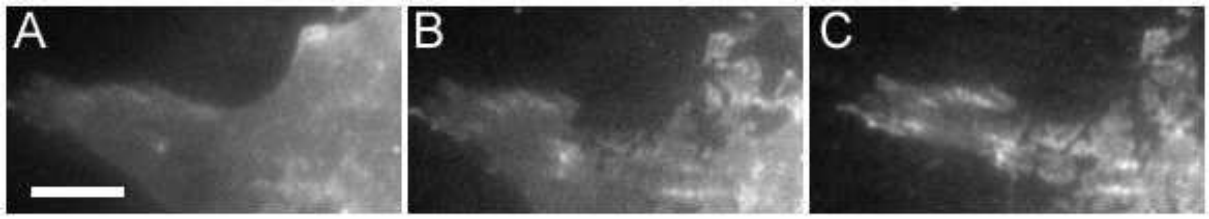

Fig. *4.9: Evolution des motifs lors de l'ajout de latrunculine (1.5 µM). A : avant ajout, B : 6 min après ; C : 16 min après. La barre représente 5 µm.*

rente. Il faut voir ces motifs comme étant le résultat de molécules clés libres de diffuser dans une membrane et interagissant avec des molécules serrures greffées sur la surface. De plus, les cadhérines dans ce système semblent se comporter comme une simple colle, échappant à toute régulation cellulaire. Ce système est en fait très intéressant, il permet, pour la première fois, l'étude d'un système passif dans une véritable cellule. En effet, les études d'agrégation de protéines clé-serrure n'ont été menées jusqu'à présent, que dans des vésicules.

4.5 Force.

Les motifs de cadhérines et vinculines présentent un caractère commun : la brisure de symétrie. Nous avons voulu vérifier si l'application d'une force extérieure pouvait aussi générer ces motifs. Il avait déjà été montré que l'application d'une force sur des contacts focaux pouvait notamment allonger les motifs en vinculine (Riveline *et al.*, 2001). Nous avons reproduit ce résultat sur les cellules EAhy transfectées avec la vinculine GFP (voir Fig. 4.10 a-c). Nous avons ensuite répété l'expérience sur les surfaces de cadhérines avec des cellules exprimant la VE cadhérine GFP et nous avons observé le même type de recrutement (voir Fig. 4.10 d-f).

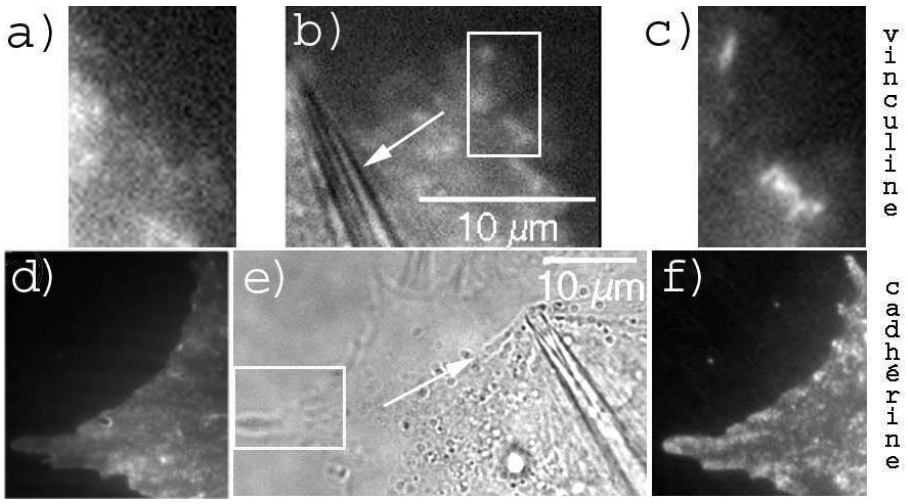

FIG. *4.10: Application d'une force sur une cellule adhérent sur une surface recouverte de PMEC (a, b, c) et sur une surface recouverte de cadhérines (d, e, f). (b) et (e) montrent l'emplacement de la pipette. La flèche blanche indique le sens et la direction de traction. Les rectangles blancs sur les images (b) et (e) encadrent les zones imagées dans les images (a), (c) et (d), (f) respectivement. (a) représente une image des contacts vinculines avant la traction et (c) 15 min après. (d) montre des contacts VE-cadhérine GFP avant la traction et (f) 30 minutes après. Remarque : les motifs étaient déjà formés quelques minutes après le début de l'application de la force.*

Mais, contrairement aux contacts focaux, il n'y pas de croissance centripète à densité constante, le motif se forme très rapidement puis se densifie (voir Fig. 4.11).

De ces deux expériences, nous pouvons conclure qu'appliquer une force sur des cellules entraîne dans les deux cas un recrutement des protéines du contact adhésif. Cependant, nous avons montré que les contacts focaux étaient associés à des fibres de tension liées

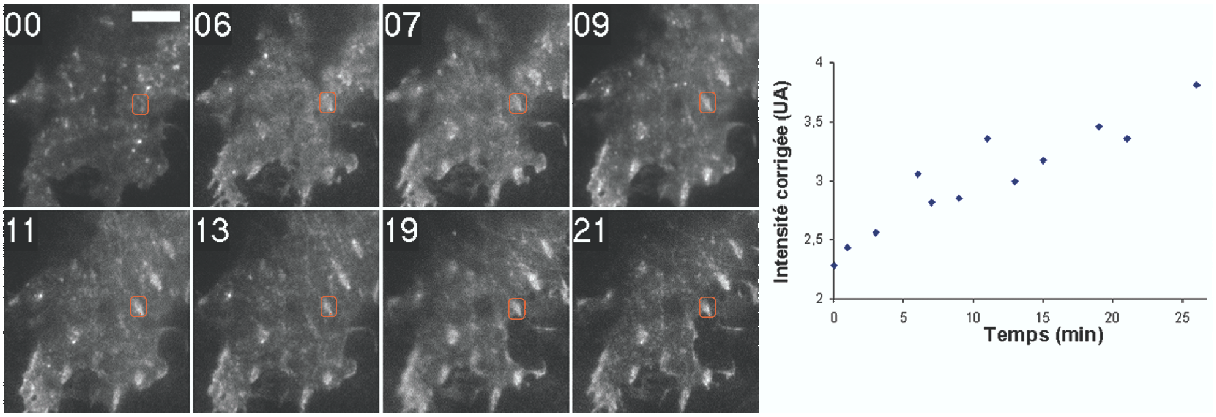

Fig. *4.11: A gauche : Série temporelle (temps en min)d'images montrant la croissance d'un motif de cadhérine GFP sur une surface de cadhérine en réponse à l'application d'une force. Dès le temps 6 min, les motifs apparaissent et ne changeront plus de forme par la suite. La barre représente 5µm. A droite : intensité normalisée par rapport à la fluorescence totale de la cellule du motif encadré en orange sur les images en fonction du temps. La densité du motif croît progressivement.*

à la contractilité des fibres d'acto-myosine, alors que les cadhérines, elles, ne sont pas liées au cytosquelette. Nous proposons donc deux mécanismes différents pour la croissance de ces contacts. Les contacts focaux croissent dans les conditions naturelles sous l'action de la contraction de l'acto-myosine. Au contraire, les motifs de cadhérines apparaissent lorsque la tension de membrane s'accroît après la disparition des contacts focaux, ou sous l'action d'une force. Cette augmentation de la tension membranaire permet de rapprocher la membrane cellulaire du substrat permettant d'accroître l'interaction ligand-récepteur. Nous avons voulu vérifié ces hypothèses en agissant spécifiquement sur la contractilité acto-myosine et sur la tension de membrane.

4.6 Contractilité acto-myosine.

Quand la contractilité est inhibée par l'ajout de BDM (voir § 2.2.2), les contacts "cadhérines" restent les mêmes (Fig. 4.12 c-d). Cela est très différent de ce qui se passe avec les motifs de vinculines sur des surfaces couvertes de PMEC : après l'addition de BDM, les contacts focaux disparaissent complètement (Fig. 4.12 a-b). Ces résultats montrent que la contractilité des câbles d'acto-myosine est nécessaire pour le maintien des contacts focaux, mais pas celui des contacts "cadhérines".

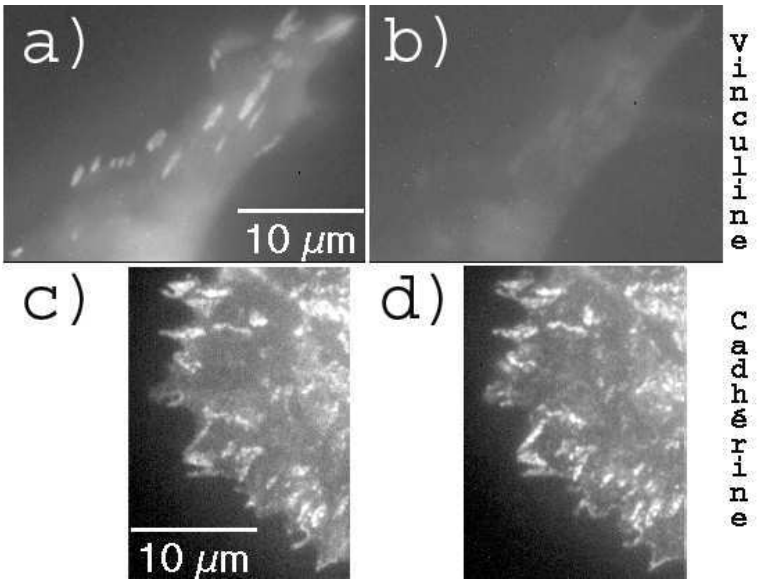

FIG. *4.12: Inhiber la contractilité en utilisant du BDM entraîne la disparition des contacts focaux, mais pas des motifs cadhérines sur les surfaces de cadhérines. a) contacts GFP vinculine avant l'addition de BDM, b) 30 min après l'ajout de BDM; c) contacts GFP cadhérine sur une surface de cadhérines avant l'ajout de BDM, d) 30 min après.*

4.7 Augmentation de la tension de membrane.

Nous avons augmenté la tension de membrane en incubant les cellules dans un milieu hypotonique (voir § 2.2.1). Nous avons vu alors l'apparition de motifs de cadhérines allongés sur les bords de la cellule (Fig. 4.13 c-d). Ces motifs étaient similaires à ceux observés aux temps longs sur les surfaces de cadhérines lorsque les contacts focaux disparaissaient. Nous avons reproduit la même expérience sur des surfaces recouvertes de PMEC : nous n'avons pas observé de recrutement de vinculine GFP, nous avons même parfois vu des contacts disparaître (Fig. 4.13 a-b).

Là encore la forme des motifs est acquise rapidement, et la densité croît ensuite progressivement (Fig. 4.14). Cette expérience a montré que la tension membranaire est un paramètre clé pour le recrutement de cadhérines.

4.8 Discussion

Nous avons comparé l'agrégation de cadhérines GFP sur des surfaces recouvertes de cadhérines recombinantes, et l'agrégation de vinculines GFP sur des surfaces recouvertes

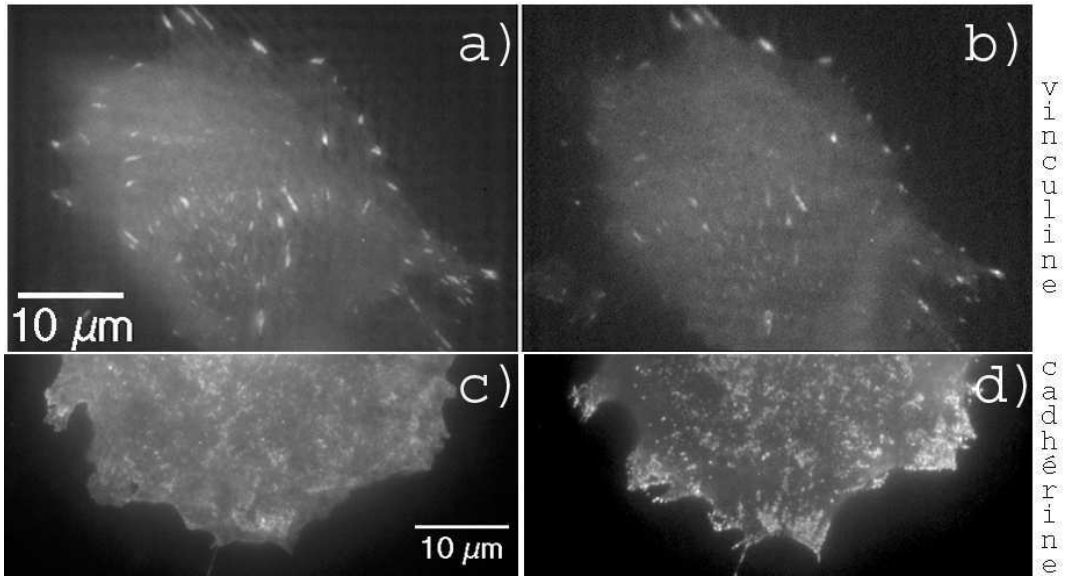

Fig. *4.13: Une augmentation de la tension membranaire par un choc hypotonique (voir § 2.2.1) entraîne un recrutement de cadhérines pour des cellules adhérant sur des surfaces de cadhérines, mais n'agit pas sur les vinculines GFP sur des surfaces recouvertes de PMEC. Images de GFP vinculine a) avant le choc b) 50 min après. Images GFP VE cadhérines c) avant le choc, d) une heure après, mais les motifs sont déjà formés quelques minutes après le choc.*

de PMEC. Nous avons observé dans les deux cas la formation de motifs allongés. La brisure de symétrie est due à l'application de forces par la cellule. Cependant, la nature de la force n'est pas la même dans les deux cas : sur les surfaces de cadhérines, l'agrégation est due à une augmentation de la tension membranaire, alors que sur les surfaces de PMEC, le recrutement de vinculine est due à la contractilité acto-myosine.

La nature du mécanisme qui mène à l'agrégation des cadhérines et des vinculines est très différent. Les motifs de cadhérines sont formés de façon irréversible (aucun traitement n'est capable de les retirer), alors que les motifs de vinculine peuvent, par exemple, être enlevés en quelques minutes par l'addition de BDM. Pour les cadhérines, on assiste à une réponse passive de la cellule. Nous pouvons faire l'hypothèse que dans cette configuration la cellule n'a aucun contrôle sur le devenir des cadhérines, parce que les cadhérines adhérant sur la surface ne se lient pas aux protéines impliquées dans la formation des jonctions adhérentes. Au contraire, dans le cas des vinculines, la cellule peut réguler l'assemblage des structures adhésives via les protéines du complexe cytoplasmique.

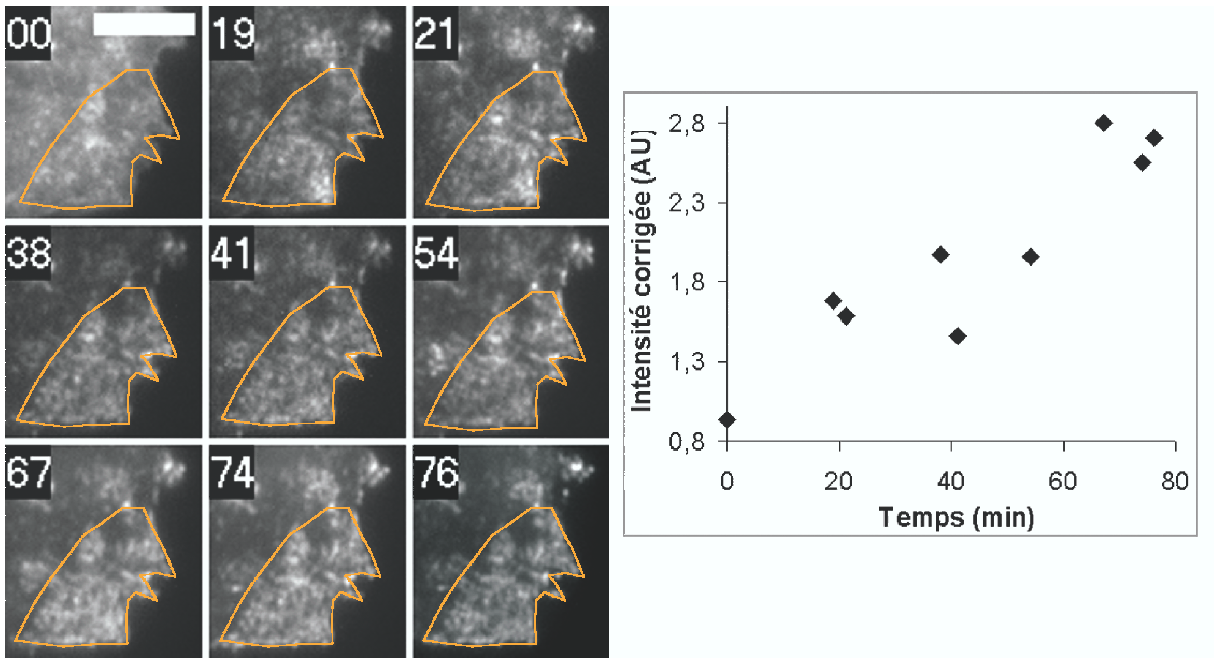

FIG. *4.14: A droite : Série temporelle (temps en min) d'images montrant la croissance d'un motif de cadhérine GFP sur une surface de cadhérine. La barre représente 5µm. A gauche, intensité normalisée par rapport à la fluorescence totale de la cellule du motif sur le bord cellulaire encadré en orange en fonction du temps. La densité du motif croît progressivement.*

Le fait que nous n'observons pas dans notre système la formation de véritables jonctions adhérentes peut avoir plusieurs origines. Dans des jonctions adhérentes formées entre deux cellules, le plan de contact est un plan de symétrie. Dans notre système, nous avons rompu cette symétrie : les cadhérines en surface ne sont pas mobiles et la surface est infiniment rigide. De plus, nous avons greffé des monomères de VE cad1-4 his sur les surfaces et la liaison aux caténines pourrait nécessiter le greffage de multimères sur la surface. Peut-être cette liaison a-t-elle besoin aussi des cinq domaines glycosylés de la VE cadhérine.

Les jonctions adhésives peuvent être divisées en trois parties : les protéines Clés-Serrures, le complexe adhésif cytoplasmique et le cytosquelette d'actine (voir Fig. 1.6). Nous avons comparé dans cette étude l'agrégation de protéines Clés-Serrures, les cadhérines, et l'agrégation d'une protéine cytoplasmique, la vinculine, dans les cas des surfaces recouvertes de PMEC. Nous avons montré que l'agrégation des ces protéines cytoplasmiques était contrôlée par la contractilité acto-myosine, alors que l'agrégation des cadhérines était imposée par la tension membranaire. Nous n'excluons pas que, dans le cas des

contacts focaux, les intégrines obéissent aux mêmes lois de recrutement que la cadhérine. Ainsi, Tsuruta *et al.* ont montré qu'une intégrine β_3 et une des protéines du complexe des contacts focaux (PCCF) ne se comportaient pas de la même façon lorsque l'on dépolymérisait l'actine (cette dépolymérisation entraîne en particulier l'inhibition de la contractilité acto-myosine) : les motifs intégrines restaient les mêmes alors que l'actinine (protéine des PCCF) disparaissait (Tsuruta *et al.*, 2002). Il faut donc faire attention à ne pas généraliser trop rapidement les propriétés des PCCF aux intégrines. Cependant, certains résultats sur les intégrines des contacts focaux semblent suggérer qu'ils ont une dynamique comparable à celles des PCCF. Ballestrem *et al.* (2001) ont suivi la dynamique d'intégrines GFP, les agrégats d'intégrines se forment et se déforment en quelques minutes. De plus, ces contacts deviennent moins denses et moins intenses quand on utilise des inhibiteurs de Rho-Kinase qui engendrent une diminution de la contractilité. De même, ceux-ci deviennent très denses et très intenses quand Rho est surexprimé. Il n'est cependant pas exclu qu'une augmentation de tension via les câbles d'acto-myosine entraîne aussi localement une augmentation de la tension de membrane, ce qui entraînerait l'agrégation des intégrines, via le même mécanisme que nous avons proposé pour les cadhérines.

La liaison intégrine-PMEC ne représente qu'une des parties du contact focal. La partie cytoplasmique des contacts focaux se comporte comme un mécanosenseur, et grandit quand elle est soumis à des forces (Choquet *et al.*, 1997; Riveline *et al.*, 2001; Balaban *et al.*, 2001). Les tensions exercées par le cytosquelette pourraient révéler de nouveaux sites de fixations pour les protéines cytoplasmiques du complexe adhésif.

Nous proposons un autre mécanisme pour le recrutement des cadhérines sur les surfaces de cadhérines. Nous avons montré qu'une augmentation de la tension membranaire provoquait l'agrégation des cadhérines. Cet accroissement provoque un "dépliage" de la membrane et l'amène plus près de la surface (voir Fig. 4.15). Puisque l'augmentation de la tension membranaire se fait en quelques secondes, une liaison rapide des cadhérines amenées à proximité est immédiate. La forme finale du motif est donc acquise très rapidement, puis celui-ci se densifie progressivement par diffusion des cadhérines dans la membrane (Fig. 4.15c). Zuckerman & Bruinsma (1998) ont aussi proposé un mécanisme d'agrégation en utilisant les mêmes arguments de diffusion et de tension membranaire (voir § 1.3.1.4). Il faut ajouter que la forme des contacts suggère fortement que même après augmentation de sa tension, la membrane reste toujours froissée le long des lignes de force (comme un film plastique que l'on étire).

On peut comparer les propriétés caractéristiques des deux types de motifs allongés : i) dans les deux cas les motifs apparaissent à la périphérie de la cellule ; ii) la symétrie est brisée ; iii) les deux motifs ont des tailles finies comparables d'environ 4 μm ; iv) la densité (nombre de motifs par unité de surface) des contacts peut être beaucoup plus importante sur les surfaces de cadhérines pouvant même conduire à des motifs continus sur les bords ; v) le temps total de croissance est plus long dans le cas des cadhérines.

Dans le cas des cadhérines, i) peut être expliqué car la périphérie est la partie de la membrane qui est réellement affectée par l'augmentation de tension membranaire. Plus à l'intérieur de la cellule, celle-ci est écrantée. La taille des contacts est déterminée par la longueur d'écrantage de la force, cela expliquerait iii). ii) est dû à la direction de la force imposée par l'augmentation de la tension membranaire. Dans le cas des surfaces de PMEC, comme nous l'avons précisé au-dessus, les intégrines peuvent être recrutées par le même mécanisme que les cadhérines, i.e. par la tension membranaire. Cependant, les expériences en BDM montrent que la contractilité acto-myosine est nécessaire pour la maturation des contacts focaux. i) et ii) peuvent être expliqués par la distribution et la direction des fibres de tension dans la cellule. De la même façon, la longueur finie des contacts focaux est déterminée par la contractilité acto-myosine, ce qui explique iii) (Balaban *et al.*, 2001). L'ordre de grandeur du temps total de croissance (v) est certainement dû à un phénomène limité par la diffusion dans les deux cas, mais cette diffusion est 2D dans le cas des cadhérines (sur la membrane) et 3D dans le cas des vinculines (dans le cytoplasme). L'explication pour iv) est en cours d'étude.

De tous ces résultats, on peut conclure que les forces ont un rôle à jouer pour l'agrégation des protéines dans la cellule. Nous avons démontré que contrairement aux contacts focaux, la force dans le cas des cadhérines n'était pas transmise par le cytosquelette mais par la membrane. Les changements dans les propriétés élastiques de la membrane sont certainement régulés par la cellule. Il a par exemple été montré que la tension membranaire pouvait être modifiée lors de l'application d'un flux de cisaillement sur les cellules (Haidekker *et al.*, 2000).

Comment la cellule régule-t-elle sa tension membranaire ? Raucher & Sheetz (2000) propose deux hypothèses :

1. Via l'endocytose et l'exocytose, la cellule contrôle le nombre de lipides à sa surface.
2. La cellule peut contrôler l'adhésion membrane-cortex d'actine et donc contrôler localement la tension de membrane. Par exemple, une activation locale de récepteur

chimiotactique peut entraîner l'activation de lipase C, qui à son tour va entraîner l'hydrolyse de la molécule PIP2 qui possède la propriété de lier la membrane au cytosquelette. Or, Raucher *et al.* (2000) ont montré que cette hydrolyse entraînait une diminution de la tension de membrane.

Il sera certainement très intéressant d'étudier dans l'avenir les voies signalétiques liées aux changements de propriétés membranaires, de façon aussi systématique que ce qui a été fait jusqu'ici pour le cytosquelette.

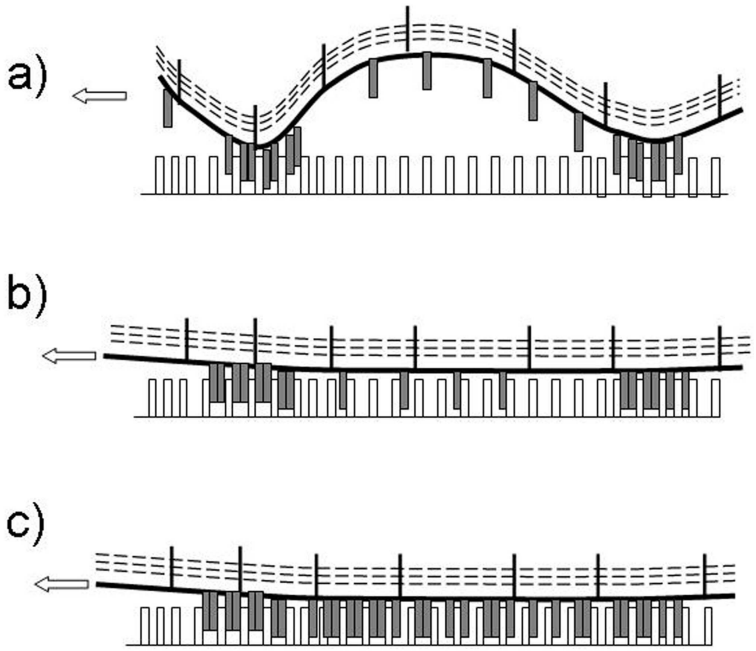

Fig. *4.15: La membrane d'une cellule adhérant sur une surface de cadhérine est froissée. Ainsi, les cadhérines localisées entre deux points de contacts ne peuvent se lier à la surface, car elles en sont trop éloignées a). Les traits en pointillés représentent le cortex d'actine lié à la membrane. Mais, lorsque l'on augmente la tension membranaire b) ces cadhérines sont amenées aux contacts de la surface. c) la densité des motifs en cadhérines augmente par diffusion libre des cadhérines dans la membrane et piégeage. La flèche représente la force résultante de l'augmentation de tension membranaire.*

Synthèse et conclusion

Avant de conclure, nous allons résumer les résultats obtenus dans les deux derniers chapitres de cette thèse.
Nous nous sommes intéressés à la nucléation et croissance de contacts cellules-cellules dans deux géométries différentes. La première consistait à étudier l'adhésion cadhérine-cadhérine "naturelle" entre deux cellules. Pour cela, nous avons utilisé une lignée cellulaire exprimant de façon stable des VE-cadhérines fluorescentes. Nous avons observé par microscopie optique la formation de deux types de contacts sur ces cellules, des *lignes*, parallèles au plan de contact et des *doigts* perpendiculaires à ce même plan. Nous avons étudié les formes et intensité de ces objets sur échantillons fixés, ainsi que leur dynamique de formation sur des cellules vivantes. L'étude de l'intensité des *lignes* sur échantillons fixés a révélé que celles-ci étaient constituées d' agrégats de densité en cadhérines proportionnelle à leur aire. Ces agrégats se densifient donc au fur et à mesure que leur taille augmente. Nous avons d'autre part étudié l'évolution de l'aire de ces contacts en fonction du temps et avons obtenu un comportement linéaire (pente :$0.009 \pm 0.003 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Nous avons montré que ces *lignes* grandissaient par augmentation du nombre de noyaux qui avait une taille moyenne de $a = 0.5\mu m^2$. Nous avons mesuré ce taux de nucléation et obtenu : $\nu = 0.02 s^{-1}$.

Les *doigts* quant à eux sont des structures périodiques (la distance moyenne entre *doigts* est de $d = 1.0\mu\text{m} \pm 0.1\mu\text{m}$). Cette période a été interprétée, comme étant le résultat d'une instabilité liée à la polymérisation d'actine et aux déformations de membrane. Ils ont, en outre, une longueur moyenne $L = 1.3\mu\text{m} \pm 0.1\mu\text{m}$. Nous les avons modélisés en supposant que ces structures de taille finie étaient le résultat d'une compétition entre des forces liées à la polymérisation d'actine poussant le *doigt* à grandir et des forces de tension de membrane limitant cette croissance. Nous avons parallèlement mesuré l'évolution de l'aire de ces objets en fonction du temps et obtenu comme pour les *lignes* une loi linéaire mais de pente inférieure ($0.0015 \pm 0.0007 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Nous avons tenté d'ajuster nos données expérimentales avec le modèle de *doigt* grandissant grâce à la polymérisation d'actine. Le modèle reproduit bien l'allure de la courbe expérimentale, mais la valeur des paramètres obtenus en ajustant les courbes expérimentales par cette théorie n'est pas satisfaisante, il aurait

sans doute fallu prendre en compte une force de frottement, due à l'adhésion, ralentissant la croissance du *doigt*.
Nous avons de plus montré grâce à des expériences de récupération après photoblanchiment que les cadhérines étaient sans cesse échangées à l'intérieur des contacts. Celles-ci ne sont pas amenées directement par transport le long de microtubules mais viennent s'assembler au contact par simple diffusion dans la membrane. Enfin, cette première partie a donné un rôle central à l'actine. Elle a dans l'adhésion cellulaire une double fonction. Tout d'abord, elle permet par des mécanismes de polymérisation, dépolymérisation d'amener les membranes au contact. Nous avons ainsi pu détruire les contacts en dépolymérisant l'actine, et observer leur reformation lorsque la polymérisation était à nouveau permise. D'autre part, elle impose la géométrie des contacts, en immobilisant les agrégats formés le long de lignes : nous avons vu que ceux-ci fusionnent si nous empêchons la liaison des cadhérines à l'actine (expérience avec la VE cadhérine tr). L'actine dicte aussi la formation et l'emplacement des doigts : l'expérience de photoblanchiment a montré que le câble d'actine dans les doigts servait de piège pour les cadhérines.

La deuxième partie de cette thèse a permis de mettre cette fois l'accent sur le rôle de la membrane dans l'agrégation des protéines. Pour cela, nous avons utilisé une géométrie différente : nous avons greffé des cadhérines sur une surface et amené des cellules exprimant des cadhérines fluorescentes à leur contact. Nous avons observé la formation de contacts cadhérines-cadhérines plans par microscopie à ondes évanescentes. Nous avons comparé les motifs obtenus aux temps longs, aux contacts focaux que l'on observe sur des surfaces recouvertes de protéines de la matrice extracellulaire. Dans les deux cas, on obtient des motifs allongés (de 1 à 4 μm) sur le bord des cellules. Par contre à la différence des contacts focaux, les motifs de cadhérines ne sont pas reliés à l'actine. Nous n'avions pas formé de véritables jonctions cellulaires dans ce sytème, toutes les protéines cytoplasmiques des jonctions adhérentes étaient en effet absentes des motifs. En revanche, nous avions obtenu un système de choix qui nous permettait d'étudier l'agrégation de protéines membranaires sur lesquelles la cellule n'avait aucun contrôle via le cytoplasme. Grâce à ce système, nous avons pu montrer que ces protéines membranaires s'agrégeaient lorsque la tension de membrane était augmentée (par choc hypotonique ou application de force à l'aide d'une pipette). Et, nous avons montré que la contractilité acto-myosine ne jouait aucun rôle dans cette agrégation (expérience BDM). Le mécanisme n'a donc rien à voir avec celui de l'agrégation des protéines cytoplasmiques des contacts focaux (PCCF).

Ainsi, grâce aux informations obtenues, il est maintenant possible de dresser une vue

d'ensemble des mécanismes d'adhésion cellulaire. Il semble que les premiers stades (formation de petits agrégats) soient gouvernés par des propriétés d'agrégation liées à la membrane. En effet, des cadhérines ne pouvant pas se lier à l'actine sont pourtant capables de nucléer des contacts. Les petits agrégats formés fusionnent ensuite comme le prédisent certains travaux de physiciens (Zuckerman & Bruinsma, 1998; Weikl *et al.*, 2002). La deuxième partie de la thèse, nous a confortés dans cette hypothèse puisque nous avons montré qu'une augmentation de tension de membrane permettait l'agrégation de protéines membranaires.
Mais, cette fusion totale des agrégats est néfaste à la cellule puisqu'elle entraîne une adhésion non uniforme. Dans des conditions naturelles, la liaison de la cadhérine à l'actine empêche cette fusion excessive. L'actine apparaît donc jouer un rôle important dans les stades de maturation du contact.

Cette thèse ouvre la porte à de nombreux travaux. Il sera en effet par exemple très intéressant de pouvoir contrôler les vitesses de polymérisation et de dépolymérisation de l'actine ainsi que la géométrie de son réseau et d'en mesurer les effets sur la formation des contacts cellules-cellules (thèse de J. Brevier). On peut par exemple s'attendre à ce qu'en augmentant la vitesse de polymérisation, on observe une croissance plus rapide des *doigts*, sans pour autant changer leur forme d'équilibre. En améliorant le modèle développé dans cette thèse pour la formation des *doigts* et en incluant par exemple des forces de frottement dues à l'adhésion, il sera possible de prédire la variation de vitesse de croissance du *doigt* en fonction de celles des vitesses de polymérisation/dépolymérisation.

Par ailleurs, il pourra être intéressant de voir si les propriétés d'agrégation des cadhérines due à la tension de membrane peuvent être généralisées à d'autres protéines transmembranaires (par exemple, les intégrines). Enfin, comprendre comment la cellule contrôle les propriétés physiques de la membrane paraît être une voie de recherche encore très peu explorée et qui semble pourtant prometteuse.

Annexe

A.1 Abréviations

Abréviation	Nom correspondant
ADN	Acide Désoxyribo Nucléique
CHO	Chinese Hamster Ovary
CHO VE	Chinese Hamster Ovary exprimant la VE cadhérine
CHO VE tr	Chinese Hamster Ovary exprimant la VE tr cadhérine
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
EAhy	Endothelial cells, A549 human hybrid
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
GFP	Green Fluorescent Protein
PCCF	Protéines cytoplasmiques des contacts focaux
PMEC	Protéines de la matrice extracellulaire
RICM	Reflection Interference Contrast Microscopy
VE	Vascular Endothelial
VE tr	Vascular Endothelial tronquée

A.2 Liste des produits chimiques et biologiques, leur provenance et leur abréviation.

Nom	Abréviation	Origine	Référence
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	DMEM	Gibco	41965-039
Phosphate Buffer Saline	PBS	Gibco	14200-067 (10X)
pénicilline-streptomycine	Antibiotiques	Gibco	15140-122
0.25% trypsin - 1 mM EDTA	trypsine	Gibco	25200-072
Dimethyl Sulfoxide	DMSO	ICN biomedicals inc.	190186
Polydimethylsiloxane	PDMS	Dow Corning	710
Fibronectine	FN	Sigma	F1145
ExGen 500		Euromedex	ET0250
Sérum de veau	BCS	HyClone	SH30072.03
Milieu L15	L15	Gibco	21083-027
Mowiol		Aldrich	32,459-0
Thimerosal		Sigma	T2299
Eau Oxygénée	H_2O_2	Aldrich	21,676-3
Inhibiteur de trypsine		Sigma	T9003
Paraformaldéhyde	PFA	Sigma	P6148
3-aminopropyltriethoxysilane	silane	Sigma	A3648
Glutaraldéhyde		Sigma	G7526

Nom	Abréviation	Origine	Référence
Sulfate de Nickel	$NiSO_4$	Sigma	N4882
Nitrilotriaceticacid	NTA	Sigma	N9877
Bovine Serum Albumine	BSA	Sigma	A8806
Polylysine		Sigma	P1274

A.3 Appareils.

Matériel	Origine	Référence
Chambre à flux laminaire	Glycotech	$2cm \times 2.5mm \times 127\mu m$
Pousse seringue	KD Scientific	KDS 100
Capillaires de verre	Clark Electromedical Instruments	GC100F-10
Etireur de pipette	Sutter Instrument	P97
Micromanipulateur	WPI	DC3001

A.4 Liste des anticorps et marqueurs fluorescents.

A.4.1 Anticorps primaires.

Anticorps	Mono/polyclonal	Origine	Référence	Dilution
Arp3	Polyclonal	Santa Cruz biotechnology	sc 15390	
α-caténine	Monoclonal	Transduction Laboratories	610193	100
β-caténine	Monoclonal	Transduction Laboratories	610153	100
β-caténine	Polyclonal	Sigma	C 2206	2000
β-caténine TRITC	Monoclonal	Transduction Laboratories	610159	2000
γ-caténine	Monoclonal	Transduction Laboratories	610253	400
E cadhérine	Monoclonal	Transduction Laboratories	610650	
Pan cadhérine	Monoclonal	Sigma	C1821	200
VE cadhérine	Polyclonal	IBS	IGg cad13	200
VE cadhérine	Monoclonal	Santa Cruz biotechnology	sc 9989	
cdc42	Monoclonal	Transduction Laboratories	610928	western
Cofilin	Polyclonal	Santa Cruz Biotechnology	sc 8441	
Connexine	Polyclonal	M. Chanson (Suisse)		30
Fibronectine	Polyclonal	Sigma	F3648	400
Flag		Sigma		
Gelsoline	Monoclonal	Transduction Laboratories	610412	
GFP	Monoclonal	Roche	1814460	
eGFP	Monoclonal	Euromedex	ref GFP-As	

Anticorps	Mono/polyclonal	Origine	Référence	Dilution
HA	Polyclonal	Sigma	H6908	50
Myc	Polyclonal	Sigma		200
Myosine (non-musculaire)	Polyclonal	Biomedical Technologies Inc	BT-561	25
p120	Monoclonal	Transduction Laboratories	610133	100
p140mDia	Polyclonal	Transduction Laboratories	610848	200
Paxilline	Monoclonal	Transduction Laboratories	610051	100
Phosphotyrosine	Monoclonal	Sigma	P 3300	200
Phosphotyrosine	Polyclonal	Transduction Laboratories	610009	
Rac	Monoclonal	Transduction Laboratories	610650	Western
Rho A	Monoclonal	Santa Cruz biotechnology	sc 418	Western
α-tubuline	Monoclonal	Sigma	T9026	2000
Vinculine	Monoclonal	Sigma	V4505	50
Vimentine	Monoclonal	Sigma	V6630	40
α-vsv	Monoclonal	Sigma		100

A.4.2 Anticorps secondaires.

Fluorophores	Mono/polyclonal	Origine	Référence	Dilution
Cy3	Monoclonal	Jackson Immunoresearch	111 166 047	500
Cy3	Polyclonal	Jackson Immunoresearch	115 165 146	500

Fluorophores	Mono/polyclonal	Origine	Référence	Dilution
Alexa488	Monoclonal	Molecular Probes	A 11029	500
Alexa488	Polyclonal	Molecular Probes	A 11034	500
Alexa350	Monoclonal	Molecular Probes	A 11045	500
Alexa350	Polyclonal	Molecular Probes	A 11046	500

A.4.3 Autres marqueurs.

Marqueur	Cible	Origine	Référence	Dilution (solution mère)	Deuxième dillution
DAPI	ADN	Sigma	D8417	0.1 mg/ml dans DDH_2O	100
Phalloïdine FITC	F-actine	Sigma	P5282	0.5 mg/ml dans méthanol	5000
Phalloïdine TRITC	F-actine	Sigma	P1951	1 mg/ml dans méthanol	1000
Phalloïdine Alexa Fluor 488	F-actine	Molecular Probes	A 12379	6.6 μM dans méthanol	200
Phalloïdine Alexa Fluor 546	F-actine	Molecular Probes	A 22283	6.6 μM dans méthanol	200

A.5 Valeurs des paramètres physiques cellulaires.

Paramètre	Abréviation	valeur
Aire totale de la cellule	A	5000 μm^2
Nombre de doigts par cellule	p	50
Module de courbure de la membrane cellulaire	κ	400 kT (Simson *et al.*, 1998)
Module de compression de l'aire d'une membrane	k_m	$10^{-1} N/m$ (Evans, 1987)
Tension de membrane cellulaire	σ_0	3.10^{-5} N/m (Raucher & Sheetz, 2000)
Longueur d'un monomère d'actine	δ	2.7 nm (Pollard, 1986)
Longueur de persistence de l'actine	l_p	10 μm (Van Oudenaarden & Theriot, 1999)
Longueur du bout libre d'un filament d'actine	l	100 nm (estimé à partir de (Medalia *et al.*, 2002))
Taux de polymérisation de l'actine	k_+	11 $s^{-1}.\mu M^{-1}$ (Pollard, 1986)
Taux de dépolymérisation de l'actine	k_-	1 s^{-1} (Pollard, 1986)
Concentration de l'actine monomérique cellulaire	c_{act}	10-50 μM (Cooper, 1991; Marchand *et al.*, 1995)

A.6 Autres protocoles

A.6.1 Préparation du milieu de culture.

Dans une bouteille de 500 ml de DMEM, ajouter 5 ml d'antibiotique. Puis retirer 50 ml (volume que l'on peut conserver à 4°C et utiliser pour des expériences nécessitant l'utilisation de milieu sans sérum). Ajouter 50 ml de sérum (BCS pour nos expériences) à la bouteille. Filtrer pour retirer les agrégats que pouvait contenir le BCS.

A.6.2 PDMS

Pour visualiser les forces exercées par les cellules sur un substrat, on peut utiliser des films de Polydimethylsiloxane (PDMS), dont la flexibilité est contrôlée par le temps d'exposition aux ultra-violets (Burton & Taylor, 1997). Ces films vont se "rider" lorsque la cellule appliquera des contraintes.

1. Passer la lamelle sous la flamme.
2. Appliquer le PDMS sur la lamelle à l'aide d'une pipette pasteur.
3. Passer à la flamme. Une flamme jaune apparaît.
4. Sceller les échantillons à la cire sur des boîtes de Pétri percées.
5. Exposition aux UV pendant 1h30.
6. Recouvrir les lamelles de fibronectine (cf. § 2.3.2.2, protocole *nuit*).
7. Enlever la fibronectine. Attention il ne faut jamais sécher le film, car sinon celui-ci se déchire. Donc, remplir les boîtes de Pétri à ras bord, aspirer la moitié. Répéter l'opération deux ou trois fois.
8. Resuspendre les cellules concentrées (pour la même raison que précédemment la boîte de Pétri contient déjà du milieu).

A.6.3 Fixation et marquage pour visualiser les microtubules et l'actine sur les mêmes cellules.

Pour pouvoir visualiser à la fois correctement les microtubules et l'actine sur une même cellule, il faut utiliser un protocole de fixation différent de celui décrit au §2.1.6.

Protocole de fixation (laboratoire Borisy) :

- Incuber les lamelles 1 min dans du Cytoskeleton Buffer (CB) contenant 0.25 % triton (100X) et 0.5 % de Glutaraldéhyde.

- Laver avec du CB.
- Incuber les lamelles 10 min dans du CB contenant 1 % de glutaraldéhyde.
- Rincer deux fois au CB.
- Incuber deux fois trois minutes dans du CB contenant du $NaBH_4$ préparé au dernier moment.
- Utiliser ensuite pour le marquage le protocole décrit au §2.1.6.

Composition du Cytoskeleton Buffer (CB) pH=6.1 :

- 10 mM MES
- 150 mM NaCl
- 5 mM EGTA
- 5 mM MgCl
- 5 mM Glucose

A.6.4 Préparation du Mowiol

Pour "monter" les lamelles sur les lames de verre, on utilise du Mowiol qui permet une meilleure conservation des échantillons, ainsi qu'un signal de fluorescence plus important qu'avec le montage en PBS-Glycérol. Voici le protocole de préparation du Mowiol.

Il est pratique de préparer deux tubes de 50 ml pour équilibrer le rotor pour l'étape de centrifugation. On peut retrouver le protocole sur : http ://bic.usuf1.usuhs.mil/protocols/SamplePreps/n

1. Mettre 6 mg (soit 4.75 ml) de glycerol dans un tube de 50 ml contenant une petite barre aimantée.
2. Ajouter 2.4 g de Mowiol. Agiter pour mélanger.
3. Ajouter 12 ml de 0.2 M Tris pH=8.5 et ajouter 230 μl de thimerosal (1 g pour 100 ml d'eau).
4. Incuber 10 min dans de l'eau chaude à 50°C pendant 10 min avec des agitations fréquentes pour dissoudre le Mowiol. Répéter l'opération pendant plusieurs heures, pour dissoudre la plus grande partie du Mowiol.
5. Centrifuger à 5000 g pendant 15 min. Stocker en "aliquots" de 2 ml à -20°C. Ils sont stables pendant un an.
6. Mettre le tube à température ambiante avant utilisation. Après utilisation, stocker à 4°C (stable pendant un mois).

A.6.5 Préparation PFA 3 %

Pour la fixation des échantillons on utilise de la paraformaldéhyde (PFA) 3 %. Voici le protocole de préparation.

Mettre 30g de PFA dans 600 ml d'eau pure. Chauffer et agiter pendant 3-4 heures jusqu'à ce que tout soit dissout (attention la température ne doit pas dépasser 60°C). Rajouter 100 ml de PBS 10X. Compléter jusqu'à 1 l avec de l'eau pure.

Bibliographie

Abney, J. R., Braun, J., & Owicki, J. C. Lateral interactions among membrane proteins. Implications for the organization of gap junctions. Biophys J, *52(3) :441–54, 1987.*

Adams, C. L., Chen, Y. T., Smith, S. J., & Nelson, W. J. Mechanisms of epithelial cell-cell adhesion and cell compaction revealed by high-resolution tracking of E-cadherin-green fluorescent protein. J Cell Biol, *142(4) :1105–19, 1998.*

Al-Khurdi, R., Gulino-Debrac, D., Renault, A., Hewat, E., & Vénien-Bryan, C. Two-dimensional structure of early stage interactions between VE-cadherins : Visualization of dimers upon binding to lipid monolayer. In preparation, *2003.*

Albersdorfer, A., Feder, T., & Sackmann, E. Adhesion-induced domain formation by interplay of long-range repulsion and short-range attraction force : a model membrane study. Biophysical Journal, *73(1) :245–57, 1997.*

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J. Molecular biology of the cell. *Garland Publishing, Inc., New York, 1989.*

Anastasiadis, P. Z. & Reynolds, A. B. The p120 catenin family : complex roles in adhesion, signaling and cancer. J Cell Sci, *113 :1319–34, 2000.*

Aranda Espinoza, H., Berman, A., Dan, N., Pincus, P., & Safran, S. Interaction between inclusions embedded in membranes. Biophysical Journal, *71(2) :648–56, 1996.*

Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E., & Webb, W. W. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. Biophysical Journal, *16(9) :1055–69, 1976.*

Balaban, N. Q., Schwarz, U. S., Riveline, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L., & Geiger, B. Force and focal adhesion assembly : a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. Nat Cell Biol, *3(5) :466–72, 2001.*

Ballestrem, C., Hinz, B., Imhof, B. A., & Wehrle-Haller, B. Marching at the front and dragging behind : differential alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. J Cell Biol, *155(7) :1319–32, 2001.*

Baumgartner, W. & Drenckhahn, D. Plasmalemmal concentration and affinity of mouse vascular endothelial cadherin, VE-cadherin. Eur Biophys J, *31(7) :532–8, 2002.*

Baumgartner, W., Hinterdorfer, P., Ness, W., Raab, A., Vestweber, D., Schindler, H., & Drenckhahn, D. Cadherin interaction probed by atomic force microscopy. Proc Natl Acad Sci U S A, *97(8) :4005–10, 2000.*

Baumgartner, W., Schutz, G. J., Wiegand, J., Golenhofen, N., & Drenckhahn, D. Cadherin function probed by laser tweezer and single molecule fluorescence in vascular endothelial cells. J. Cell Sci., *116(Pt 6) :1001–11, 2003.*

Bell, G. I., Dembo, M., & Bongrand, P. Cell adhesion. Competition between nonspecific repulsion and specific bonding. Biophysical Journal, *45(6) :1051–64, 1984.*

Bershadsky, A., Chausovsky, A., Becker, E., Lyubimova, A., & Geiger, B. Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction. Curr Biol, *6 (10) :1279–89, 1996.*

Bibert, S., Ayari, H., Riveline, D., Concord, E., Hermant, B., Weidenhaupt, M., Vernet, T., & Gulino-Debrac, D. Hexameric association of VE cadherin promotes the formation of mature endothelial cell-cell junctions. Submitted, *2003.*

Bibert, S., Jaquinod, M., Concord, E., Ebel, C., Hewat, E., Vanbelle, C., Legrand, P., Weidenhaupt, M., Vernet, T., & Gulino-Debrac, D. Synergy between extracellular modules of vascular endothelial cadherin promotes homotypic hexameric interactions. J Biol Chem, *277(15) :12790–801, 2002.*

Bishop, A. L. & Hall, A. Rho GTPases and their effector proteins. Biochem J, *348(Pt 2) : 241–55, 2000.*

Blander, M. Bubble nucleation in liquids. Advances in Colloid and Interface Science, *10 (1) :1–32, 1979.*

Boal, D. Mechanics of the cell, *pages 196–99. Cambridge University Press, 2002.*

Boggon, T. J., Murray, J., Chappuis-Flament, S., Wong, E., Gumbiner, B. M., & Shapiro, L. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. Science, *296(5571) :1308–13, 2002.*

Bohin, J. Pelce, P. Unstable membrane outgrowth induced by filament tip spreading. C. R. Acad. Sci. Paris IV, *2(6) :879–884, 2001.*

Bongrand, P. Ligand-receptor interactions. Reports on Progress in Physics, *62(6) :921–968, 1999.*

Boulbitch, A., Guttenberg, Z., & Sackmann, E. Kinetics of membrane adhesion mediated by ligand-receptor interaction studied with a biomimetic system. Biophysical Journal, *81(5) :2743–51, 2001.*

Braun, J., Abney, J. R., & Owicki, J. C. How a gap junction maintains its structure. Nature, *310(5975) :316–8, 1984.*

Bray, D. Cell Movements. *Taylor & Francis, Inc., 1992.*

Brieher, W. M., Yap, A. S., & Gumbiner, B. M. Lateral dimerization is required for the homophilic binding activity of C-cadherin. J Cell Biol, *135(2) :487–96, 1996.*

Bruinsma, R., Behrisch, A., & Sackmann, E. Adhesive switching of membranes : Experiment and theory. Physical Review E, *61 (4) :4253–4267, 2000.*

Bruinsma, R., Goulian, M., & Pincus, P. Self-assembly of membrane junctions. Biophysical Journal, *67(2) :746–50, 1994.*

Burton, K. & Taylor, D. L. Traction forces of cytokinesis measured with optically modified elastic substrata. Nature, *385(6615) :450–4, 1997.*

Capo, C., Garrouste, F., Benoliel, A. M., Bongrand, P., Ryter, A., & Bell, G. I. Concanavalin-A-mediated thymocyte agglutination : a model for a quantitative study of cell adhesion. J Cell Sci, *56 :21–48, 1982.*

Chakraverty, B. Metal-insulator transition ; nucleation of a conducting phase in amorphous semiconductors. Journal of Non-Crystalline Solids, *3(4) :317–326, 1970.*

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science, *263(5148) :802–5, 1994.*

Chappuis-Flament, S., Wong, E., Hicks, L. D., Kay, C. M., & Gumbiner, B. M. Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. J Cell Biol, *154(1) :231–43, 2001.*

Choquet, D., Felsenfeld, D. P., & Sheetz, M. P. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. Cell, *88(1) :39–48, 1997.*

Cooper, J. The role of actin polymerization in cell motility. Ann. Rev. Physiol., *53 : 585–605, 1991.*

Cozens-Roberts, C., Lauffenburger, D. A., & Quinn, J. A. Receptor-mediated cell attachment and detachment kinetics. I. Probabilistic model and analysis. Biophys J, *58(4) : 841–56, 1990a.*

Cozens-Roberts, C., Quinn, J. A., & Lauffenburger, D. A. Receptor-mediated cell attachment and detachment kinetics. II. Experimental model studies with the radial-flow detachment assay. Biophys J, *58(4) :857–72, 1990b.*

Cramer, L. P. Role of actin-filament disassembly in lamellipodium protrusion in motile cells revealed using the drug jasplakinolide. Curr Biol, *9(19) :1095–105, 1999.*

Cramer, L. P. & Mitchison, T. J. Myosin is involved in postmitotic cell spreading. J Cell Biol, *131(1) :179–89, 1995.*

Dan, N., Berman, A., Pincus, P., & Safran, S. Membrane-induced interactions between inclusions. Langmuir, *9 :2768–71, 1993.*

Decave, E., Garrivier, D., Brechet, Y., Bruckert, F., & Fourcade, B. Peeling process in living cell movement under shear flow. Phys Rev Lett, *89(10) :108101, 2002.*

Dejana, E., Bazzoni, G., & Lampugnani, M. G. Vascular endothelial (VE)-cadherin : only an intercellular glue ? Exp Cell Res, *252(1) :13–9, 1999.*

Edelman, G. M. Cell adhesion molecules. Science, *219(4584) :450–7, 1983.*

Edgell, C. J., McDonald, C. C., & Graham, J. B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. Proc Natl Acad Sci U S A, *80 (12) :3734–7, 1983.*

Elliot, J., Needham, D., Dilger, J., & Hayden, D. The effects of bilayer thickness and tension on gramicidin single-channel lifetime. Biochim. Biophys. Acta., *735(95-103), 1983.*

Evans, E. Needham, D. Physical properties of surfactant bilayer membranes : thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion, and colloidal interactions. J. Phys. Chem., *91 (16) :4219–4228, 1987.*

Evans, E. & Rawicz, W. Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. Physical Review Letters, *64(17) :2094–2097, 1990.*

Exerowa, D. Kashchiev, D. Hole-mediated stability and permeability of bilayers. Contemporary Physics, *27(5) :429–461, 1986.*

Fukata, M., Kuroda, S., Nakagawa, M., Kawajiri, A., Itoh, N., Shoji, I., Matsuura, Y., Yonehara, S., Fujisawa, H., Kikuchi, A., & Kaibuchi, K. Cdc42 and Rac1 regulate the interaction of IQGAP1 with beta-catenin. J Biol Chem, *274(37) :26044–50, 1999a.*

Fukata, M., Nakagawa, M., Kuroda, S., & Kaibuchi, K. Cell adhesion and Rho small GTPases. J Cell Sci, *112 :4491–500, 1999b.*

Gallin, W. J., Edelman, G. M., & Cunningham, B. A. Characterization of L-CAM, a major cell adhesion molecule from embryonic liver cells. Proc Natl Acad Sci U S A, *80 (4) :1038–42, 1983.*

Geiger, B. & Bershadsky, A. Exploring the neighborhood : adhesion-coupled cell mechanosensors. Cell, *110(2) :139–42, 2002.*

Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., & Yamada, K. M. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix–cytoskeleton crosstalk. Nat Rev Mol Cell Biol, *2(11) : 793–805, 2001.*

Geiger, B., Yehuda-Levenberg, S., & Bershadsky, A. D. Molecular interactions in the submembrane plaque of cell-cell and cell-matrix adhesions. Acta Anat (Basel), *154(1) : 46–62, 1995.*

Goodwin, M., Kovacs, E. M., Thoreson, M. A., Reynolds, A. B., & Yap, A. S. Minimal mutation of the cytoplasmic tail inhibits the ability of E-cadherin to activate Rac but not Phosphatidylinositol 3-Kinase : direct evidence of a role for cadherin-activated Rac signaling in adhesion and contact formation. J Biol Chem, *278(23) :20533–9, 2003.*

Gulino, D., Delachanal, E., Concord, E., Genoux, Y., Morand, B., Valiron, M. O., Sulpice, E., Scaife, R., Alemany, M., & Vernet, T. Alteration of endothelial cell monolayer integrity triggers resynthesis of vascular endothelium cadherin. J Biol Chem, *273(45) : 29786–93, 1998.*

Gumbiner, B. M. Cell adhesion : the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. Cell, *84(3) :345–57, 1996.*

Guttenberg, Z., Lorz, B., Sackmann, E., & Boulbitch, A. First-order transition between adhesion states in a system mimicking cell-tissue interaction. Europhysics Letters, *54 (6) :826–832, 2001.*

Haidekker, M. A., L'Heureux, N., & Frangos, J. A. Fluid shear stress increases membrane fluidity in endothelial cells : a study with 9-(Dicyanovinyl)-julolidine (DCVJ) fluorescence. Am J Physiol Heart Circ Physiol, *278(4) :H1401–6, 2000.*

Helfman, D. M., Levy, E. T., Berthier, C., Shtutman, M., Riveline, D., Grosheva, I., Lachish-Zalait, A., Elbaum, M., & Bershadsky, A. D. Caldesmon inhibits nonmuscle cell contractility and interferes with the formation of focal adhesions. Mol Biol Cell, *10 (10) :3097–112, 1999.*

Helfrich, W. Elastic properties of lipid bilayers : theory and possible experiments. Z. Naturforsch., *28(11) :693–703, 1973.*

Henon, S., Lenormand, G., Richert, A., & Gallet, F. A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers. Biophys J, *76(2) : 1145–51, 1999.*

Hermant, B., Bibert, S., Concord, E., Dublet, B., Weidenhaupt, M., Vernet, T., & Gulino-Debrac, D. Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during neutrophil transmigration. J Biol Chem, *278(16) :14002–12, 2003.*

Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S., & Sasaki, Y. Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. Biochemistry, *23(21) :5036–41, 1984.*

Higgins, J. M., Mandlebrot, D. A., Shaw, S. K., Russell, G. J., Murphy, E. A., Chen, Y. T., Nelson, W. J., Parker, C. M., & Brenner, M. B. Direct and regulated interaction of integrin alphaEbeta7 with E-cadherin. J Cell Biol, *140(1) :197–210, 1998.*

Hordijk, P. L., Anthony, E., Mul, F. P., Rientsma, R., Oomen, L. C., & Roos, D. Vascular-endothelial-cadherin modulates endothelial monolayer permeability. J Cell Sci, *112 : 1915–23, 1999.*

Huang, H. Deformation free energy of bilayer membrane and its effects on gramicidin channel lifetime. Biophys. J., *50 :1061–70, 1986.*

Hyafil, F., Babinet, C., & Jacob, F. Cell-cell interactions in early embryogenesis : a molecular approach to the role of calcium. Cell, *26(3 Pt 1) :447–54, 1981.*

Hyafil, F., Morello, D., Babinet, C., & Jacob, F. A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. Cell, *21(3) : 927–34, 1980.*

Ireton, R. C., Davis, M. A., van Hengel, J., Mariner, D. J., Barnes, K., Thoreson, M. A., Anastasiadis, P. Z., Matrisian, L., Bundy, L. M., Sealy, L., Gilbert, B., van Roy, F., & Reynolds, A. B. A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. J. Cell Biol., *159 (3) :465–76, 2002.*

Israelachvili, J. N. Intermolecular and surface forces, *pages 295–421. Academic Press, London, 1985.*

Kaplan, D. D., Meigs, T. E., & Casey, P. J. Distinct regions of the cadherin cytoplasmic domain are essential for functional interaction with Galpha 12 and beta-catenin. J Biol Chem, *276(47) :44037–43, 2001.*

Kapusta, J. Nucleation rate for black holes. Phys. Rev. D, *30 :831, 1984.*

Kashchiev, D. The kinetic approach to nucleation. Crystal Research and Technology, *19 (11) :1413–1423, 1984.*

Keldysh, L. The electron-hole liquid in semiconductors. Contemporary Physics, *27(5) : 395–428, 1986.*

Kloboucek, A., Behrisch, A., Faix, J., & Sackmann, E. Adhesion-induced receptor segregation and adhesion plaque formation : A model membrane study. Biophys. J., *77(4) : 2311–28, 1999.*

Koltover, I., Radler, J. O., & Safinya, C. R. Membrane mediated attraction and ordered aggregation of colloidal particles bound to giant phospholipid vesicles. Physical Review Letters, *82(9) :1991–4, 1999.*

Kovacs, E. M., Ali, R. G., McCormack, A. J., & Yap, A. S. E-cadherin homophilic ligation directly signals through Rac and phosphatidylinositol 3-kinase to regulate adhesive contacts. J Biol Chem, *277(8) :6708–18, 2002a.*

Kovacs, E. M., Goodwin, M., Ali, R. G., Paterson, A. D., & Yap, A. S. Cadherin-directed actin assembly : E-cadherin physically associates with the Arp2/3 complex to direct actin assembly in nascent adhesive contacts. Curr Biol, *12(5) :379–82, 2002b.*

Krendel, M., Gloushankova, N. A., Bonder, E. M., Feder, H. H., Vasiliev, J. M., & Gelfand, I. M. Myosin-dependent contractile activity of the actin cytoskeleton modulates the spatial organization of cell-cell contacts in cultured epitheliocytes. Proc Natl Acad Sci U S A, *96(17) :9666–70, 1999.*

Kuroda, S., Fukata, M., Nakagawa, M., Fujii, K., Nakamura, T., Ookubo, T., Izawa, I., Nagase, T., Nomura, N., Tani, H., Shoji, I., Matsuura, Y., Yonehara, S., & Kaibuchi, K. Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin- mediated cell-cell adhesion. Science, *281(5378) :832–5, 1998.*

Kusumi, A., Sako, Y., & Yamamoto, M. Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. Biophys J, *65(5) :2021–40, 1993.*

Lambert, M., Choquet, D., & Mege, R. M. Dynamics of ligand-induced, Rac1-dependent anchoring of cadherins to the actin cytoskeleton. J Cell Biol, *157(3) :469–79, 2002.*

Lambert, M., Padilla, F., & Mege, R. M. Immobilized dimers of N-cadherin-Fc chimera mimic cadherin-mediated cell contact formation : contribution of both outside-in and inside-out signals. J. Cell Sci., *113(Pt 12) :2207–19, 2000.*

Lampugnani, M. G., Zanetti, A., Breviario, F., Balconi, G., Orsenigo, F., Corada, M., Spagnuolo, R., Betson, M., Braga, V., & Dejana, E. VE-cadherin regulates endothelial actin activating Rac and increasing membrane association of Tiam. Mol Biol Cell, *13 (4) :1175–89, 2002.*

Le, T. L., Yap, A. S., & Stow, J. L. Recycling of E-cadherin : a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. J Cell Biol, *146(1) :219–32, 1999.*

Levenberg, S., Katz, B. Z., Yamada, K. M., & Geiger, B. Long-range and selective autoregulation of cell-cell or cell-matrix adhesions by cadherin or integrin ligands. J Cell Sci, *111 :347–57, 1998.*

Li, Z., Kim, S. H., Higgins, J. M., Brenner, M. B., & Sacks, D. B. IQGAP1 and calmodulin modulate E-cadherin function. J Biol Chem, *274(53) :37885–92, 1999.*

Liu, B. P., Chrzanowska-Wodnicka, M., & Burridge, K. Microtubule depolymerization induces stress fibers, focal adhesions, and DNA synthesis via the GTP-binding protein Rho. Cell Adhes Commun, *5(4) :249–55, 1998.*

Marcelja, S. Lipid-mediated protein interaction in membranes. Biochim. Biophys. Acta., *455 :1–7, 1976.*

Marchand, J. B., Moreau, P., Paoletti, A., Cossart, P., Carlier, M. F., & Pantaloni, D. Actin-based movement of Listeria monocytogenes : actin assembly results from the local

maintenance of uncapped filament barbed ends at the bacterium surface. J. Cell Biol., *130(2) :331–43, 1995.*

Mary, S., Charrasse, S., Meriane, M., Comunale, F., Travo, P., Blangy, A., & Gauthier-Rouviere, C. Biogenesis of N-cadherin-dependent cell-cell contacts in living fibroblasts is a microtubule-dependent kinesin-driven mechanism. Mol Biol Cell, *13(1) :285–301, 2002.*

Medalia, O., Weber, I., Frangakis, A. S., Nicastro, D., Gerisch, G., & Baumeister, W. Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. Science, *298(5596) :1209–13, 2002.*

Meigs, T. E., Fedor-Chaiken, M., Kaplan, D. D., Brackenbury, R., & Casey, P. J. Galpha12 and Galpha13 negatively regulate the adhesive functions of cadherin. J Biol Chem, *277 (27) :24594–600, 2002.*

Meigs, T. E., Fields, T. A., McKee, D. D., & Casey, P. J. Interaction of Galpha 12 and Galpha 13 with the cytoplasmic domain of cadherin provides a mechanism for beta -catenin release. Proc Natl Acad Sci U S A, *98(2) :519–24, 2001.*

Menes, R. & Safran, S. A. Nonlinear response of membranes to pinning sites. Physical Review E, *56(2) :1891–9, 1997.*

Mogilner, A. & Oster, G. Cell motility driven by actin polymerization. Biophys J, *71(6) : 3030–45, 1996.*

Mogilner, A. & Oster, G. Force Generation by Actin Polymerization II : The Elastic Ratchet and Tethered Filaments. Biophys J, *84(3) :1591–605, 2003.*

Nagar, B., Overduin, M., Ikura, M., & Rini, J. M. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. Nature, *380(6572) :360–4, 1996.*

Nakagawa, M., Fukata, M., Yamaga, M., Itoh, N., & Kaibuchi, K. Recruitment and activation of Rac1 by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion sites. J Cell Sci, *114(Pt 10) :1829–38, 2001.*

Navarro, P., Caveda, L., Breviario, F., Mandoteanu, I., Lampugnani, M. G., & Dejana, E. Catenin-dependent and -independent functions of vascular endothelial cadherin. J. Biol. Chem., *270(52) :30965–72, 1995.*

Noren, N. K., Niessen, C. M., Gumbiner, B. M., & Burridge, K. Cadherin engagement regulates Rho family GTPases. J. Biol. Chem., *276(36) :33305–8, 2001.*

Ogou, S., Okada, T. S., & Takeichi, M. Cleavage stage mouse embryos share a common cell adhesion system with teratocarcinoma cells. Dev Biol, *92(2) :521–8, 1982.*

Owicki, J. C. & McConnel, H. Theory of protein-lipid and protein-protein interactions in bilayer membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, *76 :4750–54, 1979.*

Pantaloni, D., Le Clainche, C., & Carlier, M. F. Mechanism of actin-based motility. Science, *292(5521) :1502–6, 2001.*

Perez-Moreno, M., Jamora, C., & Fuchs, E. Sticky business : orchestrating cellular signals at adherens junctions. Cell, *112(4) :535–48., 2003.*

Pertz, O., Bozic, D., Koch, A. W., Fauser, C., Brancaccio, A., & Engel, J. A new crystal structure, Ca2+ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. Embo J, *18(7) :1738–47, 1999.*

Pierres, A., Feracci, H., Delmas, V., Benoliel, A. M., Thiery, J. P., & Bongrand, P. Experimental study of the interaction range and association rate of surface-attached cadherin 11. Proc Natl Acad Sci U S A, *95(16) :9256–61, 1998.*

Pollard, T. Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. J. Cell Biol., *103 :2747–2754, 1986.*

Pollard, T. D. & Borisy, G. G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. Cell, *112(4) :453–65, 2003.*

Protassov, K. Analyse statistique des données expérimentales. *EDP Sciences, 2002.*

Raucher, D. & Sheetz, M. P. Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. J Cell Biol, *148(1) :127–36, 2000.*

Raucher, D., Stauffer, T., Chen, W., Shen, K., Guo, S., York, J. D., Sheetz, M. P., & Meyer, T. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. Cell, *100(2) :221–8, 2000.*

Renaud-Young, M. & Gallin, W. J. In the first extracellular domain of E-cadherin, heterophilic interactions, but not the conserved His-Ala-Val motif, are required for adhesion. J Biol Chem, *277(42) :39609–16, 2002.*

Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N. Q., Schwarz, U. S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B., & Bershadsky, A. D. Focal contacts as mechanosensors : externally

applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. J Cell Biol, *153(6) :1175–86, 2001.*

Rossi, S.C.F. Maciel, W. Molecular abundances and nucleation in protostellar envelopes. Astrophysics and Space Science, *103(1) :153–154, 1984.*

Rundle, J. A physical model for earthquakes. 3. Thermodynamical approach and its relation to nonclassical theories of nucleation. Journal of Geophysical Research, *94 (B3) :2839–2855, 1989.*

Safran, S. Thermodynamics of surfaces, interfaces and membranes. *Addison-Wesley, 1994.*

Sako, Y., Nagafuchi, A., Tsukita, S., Takeichi, M., & Kusumi, A. Cytoplasmic regulation of the movement of E-cadherin on the free cell surface as studied by optical tweezers and single particle tracking : Corralling and tethering by the membrane skeleton. Journal of Cell Biology, *140(5) :1227–1240, 1998.*

Sawada, Y. & Sheetz, M. P. Force transduction by Triton cytoskeletons. J Cell Biol, *156 (4) :609–15, 2002.*

Shapiro, L., Fannon, A. M., Kwong, P. D., Thompson, A., Lehmann, M. S., Grubel, G., Legrand, J. F., Als-Nielsen, J., Colman, D. R., & Hendrickson, W. A. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. Nature, *374(6520) :327–37, 1995.*

Shaw, S. K., Bamba, P. S., Perkins, B. N., & Luscinskas, F. W. Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. J Immunol, *167(4) :2323–30, 2001.*

Sheppard, C. Axial resolution of confocal fluorescence microscopy. J. Microsc., *154 : 237–42, 1989.*

Simson, R., Wallraff, E., Faix, J., Niewohner, J., Gerisch, G., & Sackmann, E. Membrane bending modulus and adhesion energy of wild-type and mutant cells of Dictyostelium lacking talin or cortexillins. Biophysical Journal, *74(1) :514–22, 1998.*

Sivasankar, S., Brieher, W., Lavrik, N., Gumbiner, B., & Leckband, D. Direct molecular force measurements of multiple adhesive interactions between cadherin ectodomains. Proc Natl Acad Sci U S A, *96(21) :11820–4, 1999.*

Sivasankar, S., Gumbiner, B., & Leckband, D. Direct measurements of multiple adhesive alignments and unbinding trajectories between cadherin extracellular domains. Biophys J, *80(4) :1758–68, 2001.*

Soumpasis, D. M. Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. Biophysical Journal, *41(1) :95–7, 1983.*

Springer, W. R. & Barondes, S. H. Evidence for another cell-adhesion molecule in Dictyostelium discoideum. Proc Natl Acad Sci U S A, *79(21) :6561–5, 1982.*

Steinberg, M. Reconstruction of tissues by dissociated Cells. Science, *141 :401–8, 1963.*

Svitkina, T. M., Bulanova, E. A., Chaga, O. Y., Vignjevic, D. M., Kojima, S., Vasiliev, J. M., & Borisy, G. G. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. J Cell Biol, *160(3) :409–21, 2003.*

Svitkina, T. M., Verkhovsky, A. B., & Borisy, G. G. Improved procedures for electron microscopic visualization of the cytoskeleton of cultured cells. J Struct Biol, *115(3) : 290–303, 1995.*

Tan, J. L., Tien, J., Pirone, D. M., Gray, D. S., Bhadriraju, K., & Chen, C. S. Cells lying on a bed of microneedles : an approach to isolate mechanical force. Proc Natl Acad Sci U S A, *100(4) :1484–9, 2003.*

Theriot, J. A., Mitchison, T. J., Tilney, L. G., & Portnoy, D. A. The rate of actin-based motility of intracellular Listeria monocytogenes equals the rate of actin polymerization. Nature, *357(6375) :257–60, 1992.*

Thoumine, O. & Meister, J. J. Dynamics of adhesive rupture between fibroblasts and fibronectin : microplate manipulations and deterministic model. Eur Biophys J, *29(6) : 409–19, 2000.*

Thoumine, O., Ott, A., Cardoso, O., & Meister, J. J. Microplates : a new tool for manipulation and mechanical perturbation of individual cells. J Biochem Biophys Methods, *39(1-2) :47–62, 1999.*

Titus, M. A. Caveat experimentor–is your myosin really inhibited ? Nat Cell Biol, *5(2) : 95, 2003.*

Tokunaga, M., Kitamura, K., Saito, K., Iwane, A. H., & Yanagida, T. Single molecule imaging of fluorophores and enzymatic reactions achieved by objective-type total internal reflection fluorescence microscopy. Biochem. Biophys. Res. Commun., *235(1) :47–53, 1997.*

Townes, P. & Holtfreter, J. Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. J. Exp. Zool., *128 :53–120, 1955.*

Tozeren, A., Sung, K. L., & Chien, S. Theoretical and experimental studies on cross-bridge migration during cell disaggregation. Biophys J, *55(3) :479–87, 1989.*

Tsuruta, D., Gonzales, M., Hopkinson, S. B., Otey, C., Khuon, S., Goldman, R. D., & Jones, J. C. Microfilament-dependent movement of the beta3 integrin subunit within focal contacts of endothelial cells. Faseb J, *16(8) :866–8, 2002.*

Van Oudenaarden, A. & Theriot, J. A. Cooperative symmetry-breaking by actin polymerization in a model for cell motility. Nat. Cell Biol., *1(8) :493–9, 1999.*

Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M., & Fuchs, E. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. Cell, *100(2) :209–19, 2000.*

Vasioukhin, V. & Fuchs, E. Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia. Curr Opin Cell Biol, *13(1) :76–84, 2001.*

Wang, Y. L. Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts : possible role of treadmilling. J Cell Biol, *101(2) :597–602, 1985.*

Weikl, T. R., Andelman, D., Komura, S., & Lipowsky, R. Adhesion of membranes with competing specific and generic interactions. European Physical Journal E, *8(1) :59–66, 2002.*

Weikl, T. R. & Lipowsky, R. Adhesion-induced phase behavior of multicomponent membranes. Physical Review E, *64(1) :1–13, 2001.*

Weikl, T. R., Netz, R. R., & Lipowsky, R. Unbinding transitions and phase separation of multicomponent membranes. Physical Review E, *62 (1) Part A :R45–R48, 2000.*

Whittard, J. D., Craig, S. E., Mould, A. P., Koch, A., Pertz, O., Engel, J., & Humphries, M. J. E-cadherin is a ligand for integrin alpha2beta1. Matrix. Biol., *21(6) :525–32, 2002.*

Wilson, H. On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. J. Exp. Zool., *5 :245–58, 1907.*

Yap, A. S., Brieher, W. M., Pruschy, M., & Gumbiner, B. M. Lateral clustering of the adhesive ectodomain : a fundamental determinant of cadherin function. Curr. Biol., *7 (5) :308–15, 1997.*

Yap, A. S., Niessen, C. M., & Gumbiner, B. M. The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. J. Cell Biol., *141(3) :779–89, 1998.*

Zuckerman, D. & Bruinsma, R. Statistical mechanics of membrane adhesion by reversible molecular bonds. Phys. Rev. Lett., *74(19) :3900–3, 1995.*

Zuckerman, D. M. & Bruinsma, R. F. Vesicle-vesicle adhesion by mobile lock-and-key molecules : Debye-Hückel theory and Monte Carlo simulation. Physical Review E, *57 (1) :964–77, 1998.*

Résumé : "Nucléation et croissance de contacts entre cellules biologiques."

Nous avons étudié l'agrégation de protéines adhésives (les cadhérines) lors de la formation de contacts intercellulaires. Les cadhérines sont liées au cytosquelette d'actine par un complexe protéique. Nous avons déterminé des rôles respectifs pour la membrane et pour l'actine dans la formation des jonctions adhérentes : les lois de nucléation et croissance d'agrégats de cadhérines fluorescentes entre cellules ont été acquises et confrontées à des modèles faisant intervenir les propriétés de membrane et la polymérisation d'actine. On a pu ainsi montré le rôle structurant de l'actine qui impose la forme des contacts. Nous avons aussi mis au point un montage dans lequel une cellule adhère sur une surface recouverte de cadhérines. L'apparition de motifs cadhérines allongés a été observée par microscopie à ondes évanescentes. Nous avons montré, comme l'avaient prédit les physiciens, que ces agrégats se forment à la suite d'une augmentation de la tension membranaire.

Mots clefs : adhésion, cadhérine, actine, membrane, ondes évanescentes.

Abstract : "Nucleation and growth of contacts between biological cells."

We have studied aggregation of adhesive proteins (cadherins) during cell-cell contact formation. Cadherins are linked to the actin cytoskeleton through a proteic complex. The aim of this thesis was to determine the respective roles for membrane and the actin cytoskeleton : nucleation and growth laws of fluorescent cadherin aggregates were acquired and compared with a theoretical model based on a competition between actin polymerization and membrane tension. We thus supported the structural role of actin which imposes the contact geometry. We also developped a planar adhesion set-up in which a cell expressing fluorescent cadherins adheres on a surface covered with recombinant cadherins. We observed the formation of streak-like adhesive motives by evanescent wave microscopy. As was predicted by physicists, we showed that these aggregates formation was due to an increase in membrane tension.

Key words : adhesion, cadherin, actin, membrane, evanescent waves.