



HAL
open science

Étude microrhéologique du réseau d'actine de cellules en culture en présence de facteurs biochimiques modifiant sa dynamique

Martial Balland

► **To cite this version:**

Martial Balland. Étude microrhéologique du réseau d'actine de cellules en culture en présence de facteurs biochimiques modifiant sa dynamique. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2004. Français. NNT : 2004PA077201 . tel-00009389

HAL Id: tel-00009389

<https://theses.hal.science/tel-00009389>

Submitted on 6 Jun 2005

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

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

UNIVERSITE Paris VII-Denis Diderot

U.F.R. Physique

N° attribué par la bibliothèque

|_|_|_|_|_|_|_|_|

THESE DE DOCTORAT

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS VII – DENIS-DIDEROT

Discipline : BIOMECANIQUE

présentée et soutenue publiquement par

Martial BALLAND

le 9 novembre 2004

Titre :

**Etude microrhéologique du réseau d'actine de cellules
en culture en présence de facteurs biochimiques modifiant
sa dynamique**

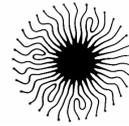
Devant le jury composé de :

Dominique Barthès-Biesel :	PRESIDENTE
Anne Renault :	RAPPORTEUR
Josef Käs :	RAPPORTEUR
Ken Sekimoto :	EXAMINATEUR
Cecile Sykes :	EXAMINATEUR
François Gallet :	DIRECTEUR DE THESE

Martial Balland

Laboratoire de Biorhéologie et d'Hydrodynamique Physico-chimique
Tour 33/34, 2^{ème} étage, case courrier 7056
2 place Jussieu
F – 75 251 Paris cedex 05, France

Fédération de recherche
Matière et système complexe FR 2438



Tél : +33 (0)1 44 27 82 90

Fax : +33 (0)1 44 27 43 35

martial.balland@wanadoo.fr

A ma mère,

Remerciements

Ce n'est pas qu'il est difficile de remercier tous ceux que ce travail touche de près ou de loin, mais il faut avouer que les formules sont nombreuses et que le choix des bons mots a toujours été pour moi difficile, en raison d'une certaine sensibilité personnelle. Entre vifs, sincères, profonds et je passe les obscures subtilités de la langue française, le choix de la formule de remerciements est difficile. Je commencerais alors classiquement mais sincèrement par remercier ceux qui ont pu officialiser la fin de cette thèse, à savoir les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir juger ce travail. Tout d'abord Madame Barthès-Biesel que j'ai pris la liberté de nommer présidente du jury car c'est en grande partie grâce à elle que ce travail a pu être réalisé. Madame Anne Renault et monsieur Josef Kas les rapporteurs qui sont allés de leurs yeux experts fouiller chaque recoin de ce manuscrit afin d'y apporter des critiques constructives. Madame Cécile Sykes, que j'ai eu la chance de rencontrer lors de l'école « *physics of the cell* » à laquelle, en tant qu'organisatrice, elle m'a gentiment invité à participer. J'en garde un cahier rempli de notes de cours allant des bases moléculaires du mouvement cellulaire à l'organisation du réseau Internet mais aussi et surtout quelques jolies notes de violon précédant des soirées enflammées. Monsieur Ken Sekimoto qui m'a montré un regard différent (celui du théoricien) sur l'aspect moléculaire de ces expériences de microrhéologie.

Merci à François Gallet pour avoir ouvert il y a 4 ans déjà les portes de son équipe à un étudiant pétrocorien qu'il a su mettre en confiance en lui disant que l'important n'est pas de venir de « la montagne » mais d'être motivé et persévérant pour ce travail. Il m'a transmis au quotidien la richesse de son savoir faire expérimental créant en moi toute la paranoïa nécessaire au physicien expérimentateur. Je le remercie aussi pour son insondable patience me ramenant au calme lors de discussions actives devant le tableau. J'adresse également mes remerciements à Patrice Flaud qui m'a initié à la rhéologie des fluides complexes tant sur le plan théorique qu'expérimental et qui a toujours gardé un regard bienveillant sur moi depuis mon entrée au laboratoire. Je salue aussi les deux directeurs du laboratoire qui ont succédé à Patrice : Jacques Dufaux et Jean Marc Dimeglio pour avoir supporté mon caractère totalement effacé et grâce à qui mon financement CNRS n'a pas duré 34 mais 36 mois. Une mention spéciale à Jean Marc qui m'a gentiment prêté sa caméra rapide pendant deux ans et sans laquelle nous aurions perdu une bonne décade. Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe de mécanique cellulaire, sorte de famille, tant ses acteurs sont pour chacun de vrais « personnages ». Benoit Ladoux grand frère modèle dit cycliste le grand, Atef dit feta, ou encore le sorcier de Boulogne pour les initiés qui a rempli les fonctions de

collègue, enseignant, confident et également entraîneur au sein de la non moins célèbre équipe du FFC. Nicolas dit dédédé la biscotte, en qui j'ai trouvé un véritable ami au-delà du partage quasi intégral de nos thèses ; la mienne ne se finira pas sans la sienne. Merci à Alain Richert pour l'écoute qu'il a su me témoigner pendant ces quelques années ainsi que son aide précieuse en biochimie. Il m'a initié à la culture cellulaire, au maniement de la trypsine et autres enzymes et m'a appris délicatement à ne pas trembler au contact des micropipettes. Merci au fascinant Philippe Dantan oulipien de son état. Sylvie Hénon m'a également accompagné tout au long de ce travail, j'ai particulièrement apprécié les séances de manip sur les macrophages que nous avons pu partager. Merci à Olivier Cardoso pour m'avoir accepté dans son bureau à mon arrivée, il a été quelque part mon premier pas dans la biophysique, je n'oublierai pas la disponibilité qu'il m'a toujours témoigné. Merci à la dream team de mécanique, Stéphane Faure, Jean Louis Counord, Henry Del Gallo pour leur sympathie, leur humour et leur capacité à déchiffrer mes « schémas » de pièces mécaniques. Je salue également Pierre Colinard pour ses conseils en chimie et sans qui la science ne serait pas une fête à Anthony. Après une expérience d'enseignement en BEP mécanique automobile avec mon confrère Guillaume Bonniaud du 7x, j'ai pu partager durant cette thèse 2 ans de la vie des enseignants en PCEM de la faculté de Paris V, j'en remercie chacun des membres. Merci également à Kristine Jursky responsable des enseignements à l'IUT de mesures physiques de Paris VII pour m'avoir accordé une confiance sans limites, elle m'a permis de concevoir un cours suivi de séance de TP en interfaçage graphique. Merci aussi à Pascal Guesdon dit « mon fillot » pour son soutien et les quelques discussions d'encouragement que nous avons échangé entre deux réglottes à « bleu ».

Ce travail est aussi le fruit de collaborations et de discussions avec différents interlocuteurs extérieurs. Merci à Daniel Isabey pour m'avoir si gentiment accueilli dans son laboratoire. Merci à Sophie Ferreol d'une patience si apaisante lorsqu'il s'agit d'effectuer un lavage broncho-pulmonaire à un rat éventré. Merci à toute l'équipe de l'IM3 qui m'a aussi permis d'accéder à leur microscope confocale et à leurs armoires de biochimie. Je salue le Professeur Jacques Ohayon, vivement la prochaine réunion éléments finis. Puisque j'ai le temps, j'en profite pour saluer Maxime Dahan et Pascal Martin, la défense centrale du FFC et plus encore. Merci à l'ensemble des membres du LBHP, si j'en ai oublié qu'ils m'en excusent mais je ne pense pas que seuls les mots restent et qu'ils soient surs de ma reconnaissance et de mon attachement.

Je tiens également à remercier mes amis, toute l'équipe du 13 Elsa Marpeau (dont il faut absolument acheter le roman « recherche au sang », béni B., Issa, Couet dit rustu gardien-géographe, aurélie, charlou, djoudjou star, milou, yo, pifouille dit le prez, jsouille, l'guitou dit

sergent Gwilem, low. Merci à mes amis biomédicaux-massilien, omar, nabs la synapse, papy jeannot, domi, tomy.

Je remercie Barbara pour ses exploits quotidiens : être elle et partager ma vie.

Merci à ma grande sœur Corinne, présente à chaque instant de ma vie, je crois que la fin de cette thèse nous a fait beaucoup de bien à tous les deux.

Enfin, je dédie cette thèse à ma mère qui n'a cessé de se sacrifier pour notre bonheur et dont les valeurs humaines sont les guides de ma vie.

Table des matières

Remerciements	5
Table des matières	9
Introduction	13
I. La cellule dans son microenvironnement, aspects biologiques et mécaniques.....	17
A. La cellule, description biomécanique	17
1. Le cytosquelette.....	18
2. Les microtubules	19
a) Structure moléculaire	19
b) Organisation cellulaire	20
c) Rôles.....	21
3. Les filaments intermédiaires	21
a) Structure moléculaire	21
b) Organisation cellulaire	22
c) Rôles.....	23
4. Microfilaments (filaments d'actine) et protéines motrices associées.....	23
a) Structure moléculaire	23
b) Superstructure d'actine, organisation cellulaire	26
c) Rôles et génération de forces	28
5. Membrane plasmique et protéines associées.....	31
6. Ordres de grandeurs et propriétés mécaniques des filaments individuels du cytosquelette.....	32
B. Outils d'étude de la micromécanique cellulaire : éléments de rhéologie.....	35
1. Définitions et outils	37
2. Quelques exemples simples	39
C. Quid du milieu intra-cellulaire ?	41
1. Introduction	41
2. Les modèles structuraux.....	43
a) Les modèles continus (cortex élastique, cytosol visqueux)	43
b) Les modèles discrets.....	43
3. Le cas du in-vitro, les modèles de percolation	47
4. Les modèles comportementaux.....	48
a) Les modèles viscoélastiques simples	48
b) Structural damping et Soft Glassy Rheology	49
5. Tableau récapitulatif des techniques utilisées pour sonder les propriétés mécaniques des cellules	54
D. Conclusion et objectifs de la thèse	57
II. Principe et mise en oeuvre des pinces optiques	61
A. Introduction	61
B. Principe des pinces optiques	63
1. Forces de gradients vs forces de pression de radiation	64
a) Description électromagnétique, Régime de Rayleigh ($2r \ll \lambda$)	65
b) Description d'optique géométrique, régime de Mie ($2r \gg \lambda$) et cas intermédiaire	68

2.	Conditions de piégeage optimales.....	70
3.	Echauffement local et choix de la longueur d'onde.....	71
C.	Dispositif expérimental et outils biologiques.....	74
1.	Schéma du montage.....	74
2.	Description des différents éléments.....	75
a)	Les éléments de piégeage.....	75
b)	Le système de déflexion du faisceau.....	75
c)	Déplacement mécanique : la plate-forme piézoélectrique.....	76
d)	Les éléments du trajet optique.....	77
e)	L'interface acquisition/visualisation.....	77
f)	La thermalisation.....	78
D.	Méthode de calibration de raideur de la pince optique.....	80
a)	Principe de l'étalonnage sur une bille de taille calibrée.....	80
b)	Mesure de la raideur du piège.....	80
E.	Conclusion.....	87
III.	Modules viscoélastiques du cytosquelette d'actine cellulaire.....	89
A.	Introduction.....	89
B.	Protocoles expérimentaux et méthodes d'analyse.....	91
1.	Préparation du matériel biologique.....	91
a)	Culture cellulaire.....	91
b)	Préparation des lamelles.....	91
c)	Revêtement des billes par un ligand spécifique des récepteurs intégrines.....	91
d)	Fixation des billes sur les cellules.....	92
2.	Protocoles de mesures.....	94
3.	Modèles mécaniques de déformation cellulaire, approche analytique.....	96
a)	Cas statique (limite basse fréquence).....	98
b)	Extension au régime dynamique.....	102
C.	Résultats en régime de déformation quasi-statique.....	103
1.	Mesure d'élasticité.....	103
2.	Coefficient de dissipation.....	106
3.	Discussion.....	107
a)	Dispersion d'origine biologique.....	108
b)	Dispersion d'origine physique.....	109
D.	Résultats en régime de déformation dynamique.....	111
1.	Introduction.....	111
2.	Mesures sur cellules épithéliales individuelles.....	112
a)	Protocole expérimental spécifique.....	112
b)	Mesure d'élasticité dynamique.....	113
c)	Discussion.....	117
3.	Influence du type cellulaire.....	119
a)	Les cellules pré-musculaires.....	120
b)	Fibroblastes et cellules épithéliales MDCK.....	123
c)	Discussion.....	124
4.	Rôle de la polymérisation de l'actine.....	127
a)	Introduction.....	127
b)	Mesures sur cellules épithéliales traitées à la cytochalasine D.....	127
c)	Discussion.....	130
5.	Rôle des moteurs moléculaires dans la réponse mécanique des cellules pré-musculaires.....	131
a)	Principe des expériences.....	131

b) Inhibition spécifique des myosines II.....	132
c) Mesures sur cellules	133
d) Discussion	135
Conclusion	139
Annexes	151

Introduction

Les cellules humaines sont organisées en tissus fonctionnels, spécialisés dans l'organisme. Ces cellules sont en interactions permanentes avec les autres cellules et avec leur environnement biochimique et biophysique. De fait, il est aujourd'hui scientifiquement reconnu que les cellules sont à même d'intégrer l'information issue de stimuli biochimiques ou biophysiques et d'y répondre spécifiquement, ceci dépendant bien sûr du type cellulaire et de sa fonction. Malgré tout, la plus grande bibliographie concernant le sujet est issue de disciplines comme la biochimie, l'histologie ou la génétique. Beaucoup moins de choses sont connues sur la façon dont les cellules répondent à une stimulation mécanique et sur la structure responsable de ce comportement. La détermination des propriétés mécaniques des cellules est d'autant plus justifiée que l'on s'intéresse à des cellules de types musculaires, alvéolaires ou sanguins, soumises à des déformations permanentes ou cycliques dues à la respiration, la contraction musculaire [Cooke, 1986] ou tout simplement à l'écoulement du sang. Ces études peuvent permettre par exemple de comprendre les bases élémentaires de certaines physiopathologies associées à des changements de propriétés mécaniques des organes ou tissus comme l'asthme.

Deux grandes catégories séparent les cellules d'un point de vue mécanique, les cellules circulantes (globule rouge, leucocyte) et les cellules adhérentes (tissus). Les cellules épithéliales et les cellules musculaires appartiennent à la dernière catégorie. Les cellules vont répondre à la déformation en fonction des propriétés mécaniques de leur structure interne et de leurs interactions [Zhu & coll., 2000], tout ceci se résumant sous le concept « d'architecture cellulaire ». Seulement, à la différence d'un matériau inerte, la cellule répond à un stimulus mécanique par une réponse biologique dirigée. Ainsi, la cellule doit développer en association avec d'autres protéines, comme les moteurs moléculaires, un champ dynamique [Butler & coll., 2002][Tseng & coll., 2002] de tension interne afin d'assurer des fonctions biologiques de base comme l'adhésion [Bershadsky & coll., 2003], la division ou la migration. Ainsi, les cellules sont capables de modifier leurs propriétés mécaniques ou encore rhéologiques pour réaliser des fonctions cellulaires nécessitant un comportement physique de transition solide-liquide, par exemple dans le cas de la migration cellulaire [Felder & coll., 1990]. Bien qu'on ne comprenne que très peu la façon dont les cellules modifient leur architecture interne pour assurer ces propriétés mécaniques si particulières, on sait que le support biophysique de celles-ci est le cytosquelette.

Le cytosquelette est un réseau tridimensionnel [Karcher & coll., 2003] de protéines filamenteuses (microfilaments d'actine, microtubules, filaments intermédiaires) et de nombreuses autres protéines associées. Le cytosquelette, dans son ensemble, est plongé dans le cytosol et est couplé mécaniquement au noyau comme à la membrane cellulaire par des ancrages bien spécifiques. Or, tout est loin d'être clair sur la façon dont les filaments du cytosquelette, les protéines associées et les autres structures intra-cellulaires interagissent pour répondre à un stimulus mécanique. Bien que les cellules aient un comportement rhéologique [Lau & coll., 2003] ou viscoélastique très complexe, leurs propriétés mécaniques sont couramment décrites par deux paramètres, le module d'élasticité noté E et la viscosité notée μ . La plupart de ces études utilisant le formalisme viscoélastique simple, définit des modèles caractérisés par deux paramètres : l'élasticité et la viscosité [Thoumine & coll., 1997][Thoumine & coll., 1999][Bausch & coll., 1998][Wu & coll., 1998]. Ces études ont permis de mettre en lumière le rôle du cytosquelette dans le maintien de la rigidité cellulaire. Cependant elles ne suffisent plus à décrire le comportement mécanique cellulaire [Yamada & coll., 2000]. Ces approches ne prennent, par exemple, pas en compte les effets non linéaires liés à la rigidification [Choquet & coll., 1997] de la cellule lorsque celle-ci est soumise à une contrainte ou à une déformation. De plus, elles ne quantifient pas dans quelles proportions la cellule se rapproche du comportement d'un liquide visqueux (migration) ou d'un solide élastique (adhésion). Ou encore quel est le ratio d'énergie dissipé par la cellule lorsque celle-ci est soumise à une contrainte.

Des expériences récentes basées sur une nouvelle approche expérimentale, la magnétocytométrie [Maksym & coll., 2000][Danowski & coll., 1992][Fabry & coll., 2001], ont permis de mesurer le module complexe de cellules en culture et d'ouvrir ainsi de nouvelles perspectives dans la caractérisation de la réponse mécanique cellulaire. Ces études ont montré que le module viscoélastique complexe (dépendant de la fréquence) cellulaire, caractérisant la façon dont la cellule emmagasine l'énergie élastique et la dissipe lorsqu'elle est soumise à des contraintes de vitesses variables, suit une loi en puissance de la fréquence, répondant à un comportement dit de Structural Damping. Le module complexe décrit dans le modèle de Structural Damping, présente un couplage entre ses deux éléments constitutifs, le module élastique et le module de perte, respectivement partie réelle et imaginaire de celui-ci. Un tel couplage n'est consistant avec aucun modèle viscoélastique simple. En effet ces derniers décrivent le cytosquelette comme un arrangement plus ou moins complexe d'amortisseurs visqueux et de ressorts élastiques. Ils ne reflètent pas par leur caractère discret la distribution continue de temps de relaxation mesurée par les expériences de magnétocytométrie [Fabry & coll., 2003]. De plus, Fabry et ses collaborateurs [Fabry & coll., 2001] ont apporté une nouvelle interprétation physique à ce comportement, en

effectuant l'analogie entre le comportement de Structural Damping et de matériaux dits vitreux mous [Fabry & coll., 2003]. La théorie rhéologique de ces matériaux a déjà été utilisée pour décrire le comportement d'émulsions, de mousses ou encore de solutions colloïdales [Sollich & coll., 1997][Sollich, 1997], mais les mécanismes élémentaires permettant de décrire cette analogie ne sont pas encore identifiés.

A ce moment du débat de nombreuses questions restent encore en suspens. Avant de pouvoir interpréter les mécanismes dissipatifs intra-cellulaires, une connaissance précise de la réponse viscoélastique d'une cellule unique doit être réalisée. Les réponses en lois de puissances ayant été établies en moyennant les réponses d'ensembles cellulaires, ces moyennes peuvent masquer des comportements individuels.

Le travail de cette thèse a consisté à mesurer en régime quasi-statique et en régime dynamique la réponse de cellules individuelles en culture. Nous levons ici les interrogations concernant le comportement mécanique de cellules uniques. Nous nous sommes également penché sur les mécanismes étant à l'origine de la dissipation d'énergie intra-cellulaire, tels que la polymérisation de l'actine [Weiner & coll., 1999] et le rôle des moteurs moléculaires. Ainsi nous tentons de rapprocher par des mesures mécaniques sur cellules uniques, dont nous modifions biochimiquement l'architecture cellulaire, les modèles structuraux et comportementaux décrivant la réponse micromécanique de cellules adhérentes.

Le premier chapitre présente brièvement l'architecture cellulaire et les principaux constituants de la forme et de la structure dynamique de la cellule : le cytosquelette. Nous discuterons ensuite l'état actuel des connaissances sur les études microrhéologiques de cellules vivantes. Enfin, nous détaillerons les objectifs poursuivis par cette thèse.

Dans le deuxième chapitre nous présentons l'outil qui a permis l'application de forces à la cellule et à son cytosquelette d'actine : les pinces optiques. La technique des pinces optiques est très bien adaptée à la mesure des propriétés mécaniques de cellules vivantes [Sheetz, 1990][Svoboda & coll., 1994]. Peu invasive, utilisant des sondes microniques bio-spécifiques et pouvant exercer des forces statiques ou dynamiques dans la gamme du piconewton, c'est la technique que nous avons utilisée pour réaliser les expériences décrites dans ce manuscrit. Ce système utilise le « point » de focalisation d'un laser par un objectif de microscope pour créer un piège stable, permettant d'exercer des forces contrôlées en fréquence et en amplitude sur une sphère micronique de verre (ou de latex). Les pinces optiques, couplées à l'analyse d'images, permettent de déterminer les propriétés mécaniques d'objets biologiques avec une très bonne

résolution spatiale (40 nm). Nous en présentons le principe dans ce chapitre, ainsi que la méthode choisie permettant de connaître avec précision l'intensité de la force appliquée.

Le chapitre 3 présente les résultats quantitatifs issus de nos mesures et les protocoles expérimentaux. Notre première étude porte sur des mesures d'élasticité en régime statique du cytosquelette d'actine de cellules épithéliales alvéolaires. Nous avons déterminé leur module élastique E . La valeur trouvée est en bon accord avec celle mesurée par d'autres techniques. A partir de ce résultat, nous nous sommes intéressés à la mesure de la réponse mécanique cellulaire en régime de contraintes dynamiques. Nous avons en particulier étudié les rôles respectifs de certains partenaires biochimiques comme le rôle dissipatif de la myosine II dans l'architecture cellulaire [Jay & coll., 1995][Balland & coll., 2005].

I. La cellule dans son microenvironnement, aspects biologiques et mécaniques

Ce chapitre constitue un survol de l'état des connaissances sur la structure cellulaire et son étude mécanique. Après un rappel sur la description globale de la cellule [Alberts & coll., 1994], nous nous focaliserons sur le cytosquelette et ses trois sous réseaux protéiques dans leurs aspects morphologiques et fonctionnels. Nous les mettrons en parallèle avec quelques protéines d'interactions nécessaires à l'établissement de forces au sein de la cellule. Nous verrons dans une deuxième partie comment modèles et expériences traitent de l'aspect mécanique de la structure cellulaire. Enfin, nous présenterons les objectifs que poursuit cette thèse.

A. La cellule, description biomécanique

La cellule est l'unité de base de la vie [figure 1.1], réduite à elle-même chez les êtres unicellulaires (procaryotes, protozoaires et protophytes), elle peut être aussi associée à d'autres en structures plus complexes (organes, tissus) chez les pluricellulaires. Deux types de cellules colonisent la biosphère : les cellules procaryotes, dépourvues de noyau, et les cellules eucaryotes à noyau. Les compositions chimiques respectives de ces deux grandes classes de cellules sont proches et de nombreuses voies métaboliques leur sont communes. Les eucaryotes pluricellulaires sont formés de nombreux types cellulaires distincts, spécialisés, assurant des fonctions différentes. Chaque cellule eucaryote, d'une taille avoisinant la dizaine de microns, est délimitée par une bicouche de phospholipides couramment appelée membrane plasmique. Celle-ci délimite l'intérieur de l'extérieur de la cellule. L'extérieur est au contact d'autres cellules ou de la matrice extracellulaire [Katz & coll., 2000] composée de collagène, de protéoglycanes et d'autres composants qui assurent la résistance des tissus et des organes. Le micro-volume cellulaire peut lui encore se diviser en compartiments bien distincts appelés les organites cellulaires. Un des faits qui a marqué l'évolution des cellules nucléées, est qu'elles ont incorporé, pour leur servir de centrales énergétiques, des bactéries qui ont évolué en mitochondrie, un des compartiments fonctionnels intracellulaires. Le noyau en est un également. Il est délimité par l'enveloppe nucléaire constituée de lamines qui lui confèrent une certaine rigidité. Celles-ci arriment l'ADN,

support de l'information génétique. On peut encore citer les vésicules de Golgi, le réticulum endoplasmique rugueux, les lysosomes et bien d'autres. L'intérieur de la cellule, sans ses compartiments, est une sorte de « bain protéique », le cytosol, dans lequel se trouve un grand nombre de molécules différentes, en solution ou non, ayant des localisations et des interactions bien spécifiques. Le cytosol renferme de plus un réseau de protéines fibreuses, le cytosquelette, qui confère à la cellule sa stabilité structurale, sa motilité [Rafelski & coll., 2004] et sert également à la transmission d'informations biologiques. Tridimensionnel, ce réseau est constitué de trois types d'éléments protéiques : les micro-filaments d'actine, les filaments intermédiaires, les microtubules. Nous nous attarderons ici à la description plus détaillée de cette structure que biologie cellulaire et biochimie ont montré comme fortement impliquée dans l'architecture dynamique de la structure cellulaire et dans de nombreuses fonctions biologiques essentielles.

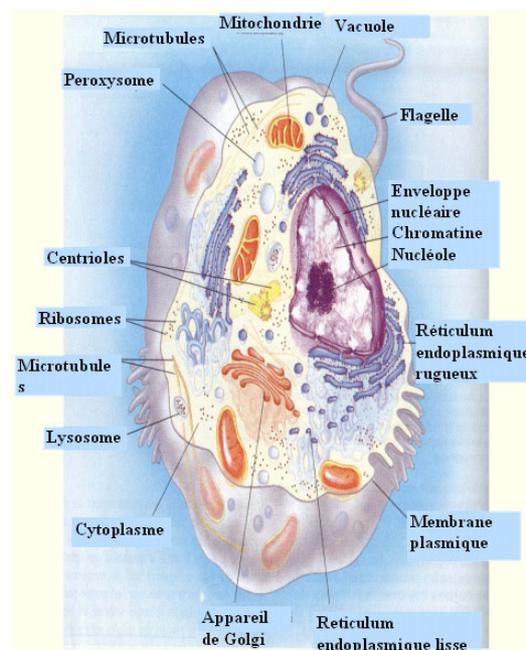


Figure 1. 1 : Vue schématique d'une cellule en coupe et de ses différents organites [<http://www.fundp.ac.be/bioscope/>]

1. Le cytosquelette

Le cytosquelette est composé d'un petit nombre de protéines (2.8% des protéines animales). C'est un réseau de fibrilles tendues à travers le cytoplasme. Comme hauban et mat soutiennent l'armature d'un bateau, le cytosquelette sert de soutien à la membrane plasmique et aux organites cellulaires ou de guide aux éléments se déplaçant dans la cellule [Glogauer & coll., 1997]. Sa versatilité vient de son aspect hautement dynamique, en réarrangement permanent. Le

cytosquelette est essentiel à la morpho-fonctionnalité cellulaire [Chen & coll., 2003]. Quand les biologistes purent scruter le cytoplasme au microscope électronique, ils furent surpris de la densité des fibres traversant le cytoplasme en tout sens. On observa par la suite que ces fibres étaient construites comme des « meccano », c'est à dire que ces protéines filamentaires sont constituées de plus petits éléments assemblés entre eux. Les trois types de filaments diffèrent par leurs diamètres, leurs propriétés mécaniques et biochimiques.

2. Les microtubules

a) Structure moléculaire

Un microtubule est un ensemble de protomères globulaires de tubuline arrangés en un tube cylindrique de 24 nm de diamètre, soit le double d'un filament intermédiaire et près de trois fois celui d'un microfilament [figure 1.2]. La tubuline est une protéine dimérique composée de deux sous unités α et β formant par leur association un dimère de tubuline G. La polymérisation de ce dimère se fait par fixation de GTP (Guanosine Tri-Phosphate). Chacune des sous-unités α ou β -tubuline possède un site de fixation au GTP. Seul le GTP de la sous unité β est hydrolysable. La polymérisation est donc fortement dépendante de la concentration en GTP. Le microtubule obtenu est un tube creux hélicoïdal, formé en général de 13 dimères de tubuline sur son diamètre. Il est orienté, *i.e.* on peut distinguer une extrémité + (terminée par des sous unités β) d'une extrémité - (terminée par des sous-unités α).

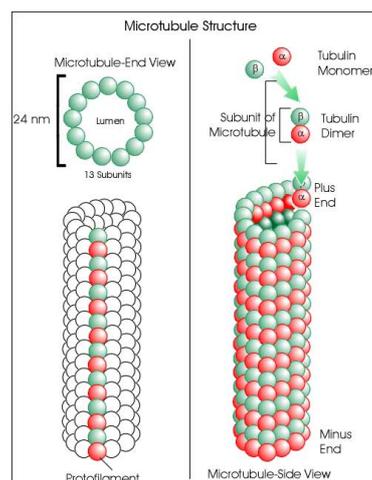


Figure 1.2 : Schéma de la structure d'un microtubule. On montre la structure des deux sous-unités de tubuline et le protofilament. [<http://www.erin.utoronto.ca/>]

La croissance des microtubules est très particulière. En effet, bien que celle-ci soit fortement dépendante de la concentration en GTP, en tubuline libre [Drechsel & coll., 1992] et

en tubuline polymérisée, pour des conditions chimiques stables, un microtubule peut passer aléatoirement entre deux états, celui de croissance à celui de dépolymérisation rapide [Belmont & coll., 1996]. Dans des conditions de croissance normales, le microtubule maintient sa structure grâce à la présence de son extrémité non hydrolysée au sein de laquelle les interactions dimères-dimères sont fortes. Lorsque l'une des deux sous-unités à l'extrémité porte un GDP, par changement conformationnel, les forces hydrophobes et stériques sont telles que le microtubule subit une dépolymérisation rapide appelée « catastrophe ». Ces propriétés particulières sont résumées sous le nom d'instabilité dynamique [Walker & coll., 1988]. La présence de calcium intracellulaire peut également favoriser la dépolymérisation d'un microtubule [Rodionov & coll., 1997]. Cependant certaines protéines appelées MAP (Microtubule Associated Proteins) régulent fortement l'état de polymérisation et sont à l'origine de la diversité des structures adoptées par les microtubules.

b) Organisation cellulaire

Les microtubules croissent à partir d'un centre organisateur appelé centrosome [Mitchison & coll., 1984], généralement situé à proximité du noyau. Ce centre organisateur a pour rôle principal la nucléation d'un aster de microtubules [Zheng & coll., 1995] qui croissent dans le cytosol. Il fixe également la polarité des microtubules. Ainsi dans la cellule interphasique, les faisceaux de microtubules courent apparemment au hasard à travers le cytosol [figure 1.3] mais en fait, ils forment comme les rayons d'une roue, ou d'une étoile plus couramment appelée aster, centré au voisinage du noyau.

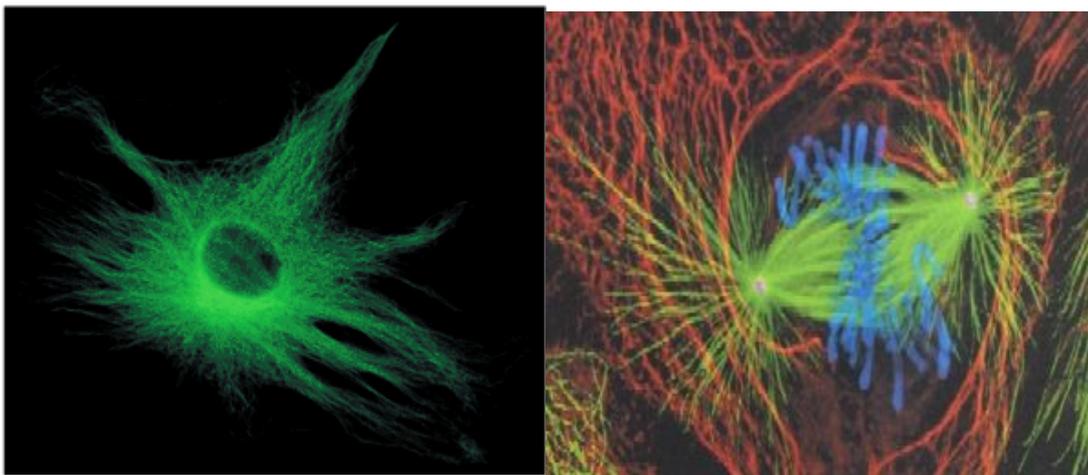


Figure 1.3 : Visualisation de l'organisation des microtubules
a) dans une cellule en culture (noyau visible)
b) dans une cellule en mitose [catalogue molecular probes].

c) Rôles

Le réseau de microtubules combiné avec son centre organisateur possède de nombreux rôles dans la vie cellulaire. Étudiés *in vivo* et *in vitro* [Wade & coll., 1998] selon différentes approches expérimentales, les microtubules ont pu laisser transparaître certaines de leurs fonctions. Ils servent de guides au va-et-vient des vésicules de Golgi et autres organites. Le déplacement de ceux-ci est rapide, de l'ordre de $2 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Il est assuré par des moteurs moléculaires protéique appelés kinésine [Yale & coll., 1985] ou dynéine selon qu'ils se déplacent vers le bout + ou – des microtubules. Associés à d'autres protéines, les microtubules constituent les axonèmes des cils et des flagelles. L'activité ATPasique des dynéines dans ces structures est essentielle à leur motilité. Le déplacement intermittent des dynéines sur les microtubules est responsable du glissement des filaments entre eux et est à l'origine des courbures de cils ou de flagelles. Les microtubules constituent également la trame principale de l'appareil mitotique. Lors de la mitose (division cellulaire), une structure bipolaire de laquelle émane des faisceaux de microtubules forme le fuseau mitotique [figure 1.3b]. Chacun des pôles est occupé par le centrosome de la future cellule fille, les microtubules quant à eux rassemblent et organisent les chromosomes au centre de la cellule et réalisent par génération de forces au kinétochore chromosomique la séparation équiparitaire du matériel génétique.

3. Les filaments intermédiaires

a) Structure moléculaire

Les filaments intermédiaires [Stewart, 1993] sont bien souvent la clé de voûte de la charpente cellulaire. D'une très grande hétérogénéité d'un point de vue biochimique, selon le type cellulaire observé, on peut cependant extraire une superstructure commune à ces protéines [figure 1.4]. Au centre de celle-ci, un domaine en bâtonnet de 40 nm de long, de séquence très bien conservée, forme une structure dimérique où les tronçons α -hélicoïdaux des deux protomères sont torsadés en superhélice. Les filaments apparaissent alors sous la forme de cylindres creux non ramifiés dont la taille varie entre 8 et 10 nm de diamètre.

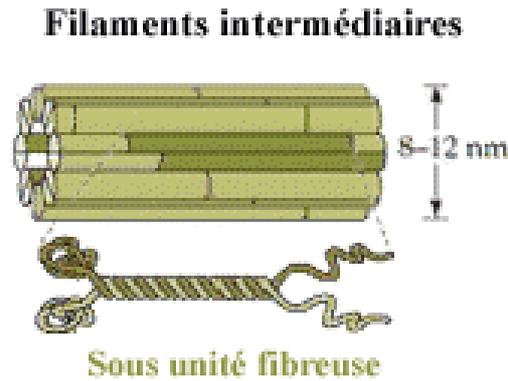


Figure 1.4 : Schéma de la structure d'un filament intermédiaire extrait de [time.arts.ucla.edu/Talks/Barcelona/Arch_Life.htm].

Les domaines N et C terminaux des protéines des filaments intermédiaires [Stewart, 1993] sont globulaires et varient fortement d'une protéine à l'autre. On peut distinguer cependant cinq catégories de filaments intermédiaires : les filaments de Desmine, de kératine, gliaux, de vimentine [Janmey & coll., 1991] et enfin les neurofilaments. Dans la plupart des cellules, la majorité de ces filaments ne sont pas dans un état d'équilibre dynamique. Leur molécules sont complètement polymérisées et seule une petite proportion d'entre elles est dans l'état libre. Certains filaments intermédiaires, comme la desmine, sont fixés à la membrane plasmique par les sites d'ancrage de la cellule à ses voisines (desmosomes) ou à la matrice extra-cellulaire (hémidesmosomes) *via* des protéines spécifiques que sont, selon le cas, les desmoplakines ou les plakoglobines.

b) Organisation cellulaire

On peut discerner deux sous structures du cytosquelette de filaments intermédiaires à l'intérieur de la cellule. Un réseau extensif de filaments de kératine entoure le noyau et s'étend jusqu'à la périphérie de la cellule. On trouve également un réseau de filaments disposé en couche mince, appuyé à la membrane nucléaire pour la soutenir ; dont le meilleur exemple est un réseau tissé et serré de filaments, appelé la lamina nucléaire [Dahl & coll. , 2004], situé sous la membrane nucléaire interne.

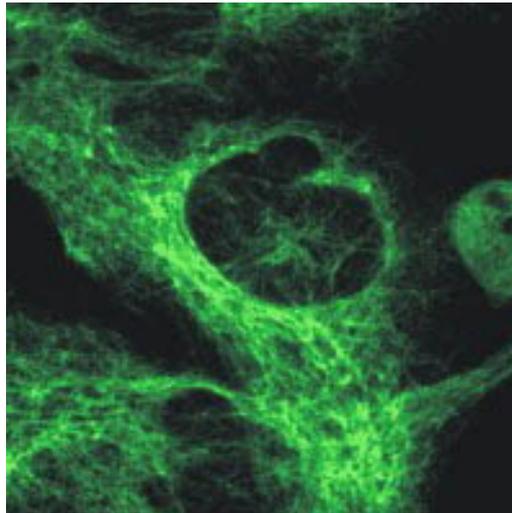


Figure 1.5 : Réseau filamenteux de kératine tendu entre la membrane plasmique et le noyau dans une cellule en culture.

c) Rôles

La grande stabilité des filaments intermédiaires [Fuchs & coll. , 1994] leur confère un rôle structural [Beil & coll., 2003]. L'étude des lésions cutanées a pu mettre en avant le rôle de ceux-ci dans la résistance mécanique de la cellule. De plus, grâce à leur ancrage aux desmosomes et hémidesmosomes, le réseau de filaments entrecroisés protège la cellule des dommages causés par l'abrasion en assurant la cohésion des tissus. Enfin, les lamines soutiennent mécaniquement l'enveloppe nucléaire.

4. Microfilaments (filaments d'actine) et protéines motrices associées

L'actine est la protéine intracellulaire prépondérante dans la cellule eucaryote. Dans les cellules musculaires, l'actine compte pour 10% des protéines et, dans les autres cellules de 1 à 5%. La concentration typique d'actine dans le cytosol est d'environ 0.5 mM et peut atteindre 5 mM dans des structures spécialisées comme les microvillosités. Une telle concentration d'actine à l'intérieur de la cellule s'accorde avec le fait que les structures formées par l'actine occupent une large proportion du volume cytoplasmique.

a) Structure moléculaire

Protéine de taille moyenne, l'actine est faite d'environ 375 acides aminés et est codée par une grande famille de gènes bien conservés dans l'évolution. On connaît au moins 6 actines

différentes chez les oiseaux et les mammifères. Trois sont les actines α , chacune étant propre à un type de muscle. Deux autres, l'actine β non-musculaire et l'une des actines γ sont présentes dans presque toutes les cellules non musculaires. La sixième actine, de la famille γ se trouve dans les muscles lisses de la paroi intestinale. C'est en séquençant l'actine de divers organismes que l'on a remarqué que c'était l'une des familles de protéines les mieux conservées dans l'évolution. Les diverses actines de la famille α , par exemple, ne diffèrent que par un petit nombre de résidus allant de quatre à six.

L'actine se présente soit sous forme d'un monomère globulaire appelé actine G [figure 1.6a] soit sous forme d'un polymère fibrillaire appelé actine F. Le protomère globulaire d'actine G est une protéine dissymétrique qui a une structure ressemblant à deux sphères (de 3.8 nm de diamètre) s'interpénétrant pour donner un objet ressemblant à une haltère de taille avoisinant les 7 nm [Kabsch & coll., 1990].

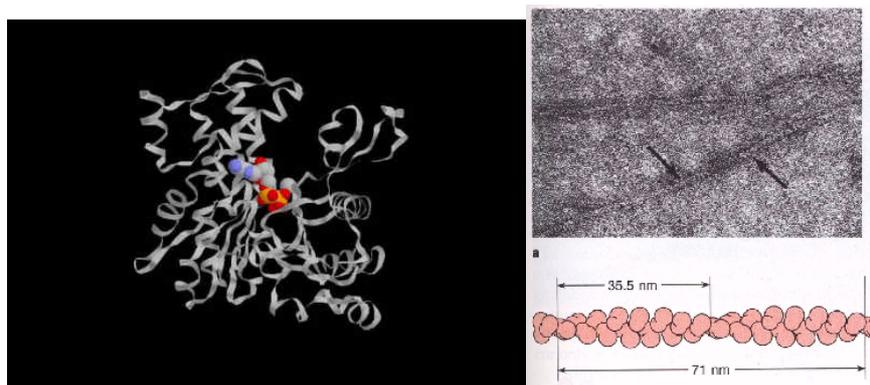


Figure 1.6

- a) Modèle de protomère d'actine G issu de l'interprétation de données cristallographiques
 b) Image en microscopie électronique d'un filament d'actine et schéma de sa structure hélicoïdale de pas 35.5 nm [Alberts & coll. , 1994].

L'actine G se polymérise en actine F par une lente hydrolyse de l'ATP en ADP pour donner des filaments de 7 à 9 nm de diamètre [figure 1.6b]. L'actine F a une structure hélicoïdale compacte. En vue latérale, tous les 36 nm, l'hélice présente successivement un rétrécissement (diamètre 7 nm) et un renflement (diamètre 9 nm) constituant le module répétitif. La polymérisation d'un filament est fortement dépendante de la présence d'ATP mais aussi d'ions magnésium, potassium et sodium. Si l'on ajoute à une solution d'actine G ces mêmes ions, on voit alors se former un réseau enchevêtré de microfilaments. Le processus est réversible en abaissant la force ionique de la solution, par exemple.

L'actine F est polaire, comme l'ont montré des expériences de marquage asymétrique avec des fragments de têtes myosiniques et comme le prouve l'inégalité de vitesse de croissance des deux extrémités de ses filaments notées + et -. La différence de vitesse de croissance entre les deux bouts du filament est due à la différence de C_c (concentration critique de monomères à partir de laquelle l'actine se polymérise) en ces extrémités. On mesure cette différence en bloquant l'un des bouts par une protéine qui coiffe l'une des extrémités du filament d'actine. Si l'on coiffe le bout + par exemple, on force le filament à grandir par le bout -. Dans tous les cas, on mesure la C_c de chaque bout du filament par des expériences de polymérisation. La C_c au bout + ($0,1 \mu\text{M}$) est moindre que la C_c au bout - ($0,8\mu\text{M}$). D'après les valeurs de C_c , on tire que la longueur du filament décroît aux deux extrémités aux concentrations d'actine G inférieures à $0,1 \mu\text{M}$, alors qu'il croît seulement au bout + aux concentrations d'actine G situées entre $0,1$ et $0,8 \mu\text{M}$ et qu'il croît aux deux extrémités pour des concentrations supérieures à $0,8 \mu\text{M}$. La différence de concentration critique entre les extrémités du filament d'actine produit l'intéressant phénomène appelé *treadmilling*: aux concentrations intermédiaires entre les C_c de chaque extrémité, les protomères quittent le bout - alors que d'autres rejoignent le bout +. Les nouveaux protomères paraissent alors avancer dans le filament, comme sur un « tapis roulant », avant d'atteindre le bout -, où ils se dissocient. Le concept de tapis roulant est intéressant, car il explique que le processus peut fournir un travail, et donc générer des forces.

L'ATP est un facteur qui commande également la polymérisation de l'actine [**Pollard, 1986**], car il influence la concentration critique et la vitesse de polymérisation. On le montre en formant des filaments d'actine à partir de protomères chargés d'ADP : les bouts du filament grandissent tous les deux au rythme lent qui caractérise le bout -. En dépit de la polarité structurale qui caractérise le filament, la C_c du bout + devient donc égale à la C_c du bout - en présence seulement de protomères d'actine-ADP. Pour résumer, les filaments d'actine sont, au sein de la cellule, en équilibre dynamique. Cependant leur longueur, ou plutôt leur taux de polymérisation, est ajusté par des protéines de régulation [**Bamburg, 1999**][**Bamburg & coll., 1999**] empêchant toute dilution du cytosol et éclatement de la cellule par voie de conséquence. La croissance des filaments doit donc être également mise en relation avec certaines protéines associées : les ABP (Actin Binding Protein).

Il faut donc aborder ces structures protéiques non pas comme des éléments structuraux fixes mais comme des systèmes hautement dynamiques.

b) *Superstructure d'actine, organisation cellulaire*

Après une description du squelette d'actine à l'échelle la plus fondamentale, nous allons explorer la façon dont les fibres d'actine s'organisent et fonctionnent dans la cellule. On distinguera deux ensembles fibreux cytosoliques : les faisceaux d'actine et les réseaux d'actine.

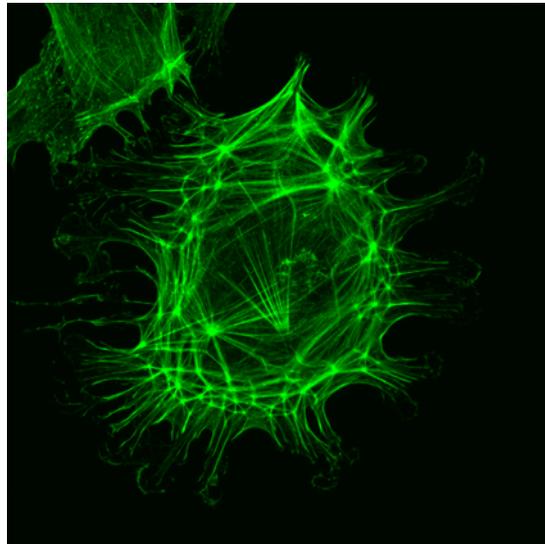


Figure 1.7 : Réseaux et faisceaux d'actine dans une cellule en culture [www.bms.ed.ac.uk/services/impact/pages/Image3.htm].

C'est grâce à la microscopie électronique et aux outils de fluorescence que des équipes ont pu découvrir la structure de l'actine au sein du cytosol cellulaire. On peut y voir des zones où les filaments sont assemblés en faisceaux, notamment aux endroits où la cellule a des replis mais également au travers du cytoplasme [figure 1.7]. Ces faisceaux sont caractérisés par un alignement serré et parallèle des filaments d'actine. Les protéines qui leurs sont associées, notamment les moteurs moléculaires, leur confèrent des propriétés contractiles. Dans le cas des réseaux, on peut distinguer deux organisations géographiques dans la cellule. Une couche mince réticulée associée à la membrane plasmique que l'on nomme le réseau cortical et, au sein de la cellule, un réseau tri-dimensionnel de filaments d'actine. Que ce soit en faisceau ou en réseau, les filaments sont maintenus entre eux (réticulés) par des protéines de pontage de l'actine (les *Actin Binding Protein*). Celles-ci, selon leur longueur, leur flexibilité, leur nature biochimique vont correspondre à la formation de structure bien déterminées au sein de la cellule. Toute protéine qui réticule deux filaments d'actine doit comporter deux sites de fixation à l'actine, un pour chaque filament. Les petites protéines de réticulation arrimeront étroitement les filaments d'actine, forçant ceux-ci à adopter un arrangement parallèle, c'est à dire un faisceau. Par contre, comme les protéines de réticulations longues et flexibles permettent aux filaments de choisir leur disposition, elles les maintiennent en réseau. Cette règle s'applique à des protéines réticulantes du

groupe III (Poids moléculaire > 68 kDa). Les plus courts membres du groupe III sont la fimbrine et l'actinine α , présentes dans les faisceaux cellulaires. Les membres les plus longs comme la filamine, la spectrine et la dystrophine, se rencontrent dans les réseaux. L'actine soutient également, par l'intermédiaire d'autres protéines réticulantes telles que la dématine ou la villine du groupe II, les prolongements membranaires digitiformes, comme par exemple la formation de microvillosités, et rend la membrane plus rigide.

De plus, cet échafaudage moléculaire est arrimé à la membrane plasmique par des complexes d'ancrage. La forme de la cellule dépend non seulement de l'arrangement de ses filaments d'actine mais aussi des protéines qui les fixent à la paroi, elles mêmes étant de véritables senseurs mécano-chimiques [Chicurel & coll., 1998]. On peut discuter brièvement de la façon dont les faisceaux contractiles sont soudés à la membrane plasmique.

Dans la majorité des cellules, la particularité d'un faisceau contractile est qu'il aboutit au point de contact de la cellule avec son support, sur des plaques d'adhérence mettant en jeu des intégrines trans-membranaires, ou avec la cellule voisine en créant des complexes de jonctions inter-cellulaires [figure 1.8] impliquant d'autres protéines transmembranaires: les cadhérines [Kovacs & coll., 2002][Perret & coll., 2002][Sako & coll., 1998]. La structure et la dynamique de ces points d'attache est complexe et se fait *via* des adaptateurs moléculaires différents mais avec les mêmes protéines membranaires intrinsèques. Les filaments d'actine contractiles sont en particulier arrimés aux intégrines [Maniotis & coll., 1997][Ingber, 2003] *via* les adaptateurs moléculaires que sont l' α actinine [Blanchard & coll., 1989][Tseng & coll., 2001] et la vinculine.

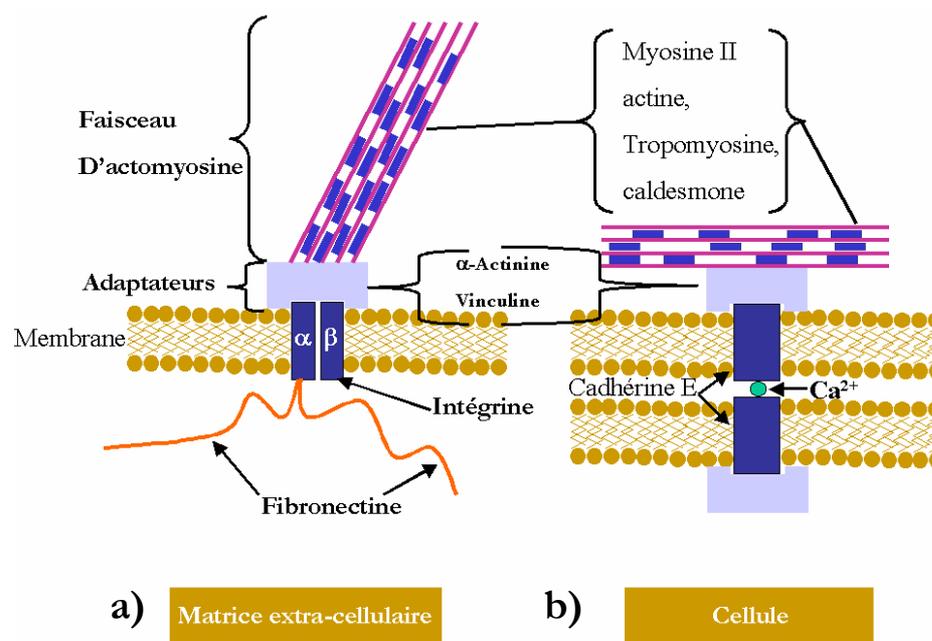


Figure 1.8 : Schéma de complexes adhésifs a) avec la matrice extra-cellulaire b) dans la jonction inter-cellulaire d'après [Alberts & coll., 1994].

c) Rôles et génération de forces

Les processus de polymérisation/dépolymérisation de l'actine et leur action combinée à celle des moteurs moléculaires sont à l'origine de forces qui sous tendent différents types de mouvements cellulaires. Quand *Listeria monocytogenes* [Welch & coll., 1998][Plastino & coll., 2003] par exemple, infecte une cellule, elle se déplace à l'intérieur de celle-ci à la vitesse de $11 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, ce mouvement est réalisé par l'assemblage de filaments d'actine à la queue de la bactérie. Cette expérience bien que non représentative de l'activité d'une cellule dite « saine » a permis de comprendre de nombreux mécanismes inhérents aux différents types de motilité basés sur l'actine [Albrecht-Buehler & coll., 1980][Rafelski & coll., 2004][Weiner & coll., 1999]. Bien que la « fusée » bactérienne paraisse un exemple exotique de la mobilité basée sur l'actine, on a pu mettre en parallèle par exemple le rôle de la profiline (protéine formant des complexes stables avec les protomères d'actine chargés d'ATP) dans le déplacement bactérien et dans la formation des filopodes et des lamellipodes cellulaires. La profiline jouerait un rôle central, car on la trouve concentrée au bord avant de la cellule, où a lieu la polymérisation. Le changement de forme de la cellule suit les modifications de positions de la membrane cellulaire fluctuante. Des expériences en vidéomicroscopie révèlent le fait crucial que l'actine se polymérise contre la membrane créant ainsi localement une tension. Il faut noter qu'à ce bord frontal, les filaments d'actine se réticulent rapidement en faisceau et réseaux visibles dans les filopodes et les lamellipodes. Le cytosquelette d'actine n'a donc pas seulement un rôle dans le soutien de la membrane plasmique et dans la

structuration du cytosol, mais sa dynamique de polymérisation et son couplage à des protéines motrices jouent un rôle déterminant dans l'établissement de forces nécessaires au déplacement, à la division et à l'adhésion cellulaire.

Moteurs moléculaires

Dans beaucoup de types de mouvements, qu'ils soient globaux, locaux ou internes à la cellule, l'actine n'intervient pas seule. Elle est en interaction avec la myosine, moteur protéique fonctionnant comme ATPase quand il se déplace le long des filaments d'actine. La myosine appartient à une famille d'enzymes mécano-chimiques qui convertissent l'énergie libre de l'ATP en des changements de conformation pour exercer un travail [Timson, 2003]. On peut la diviser en trois domaines : la tête, le cou et la queue [figure 1.9].

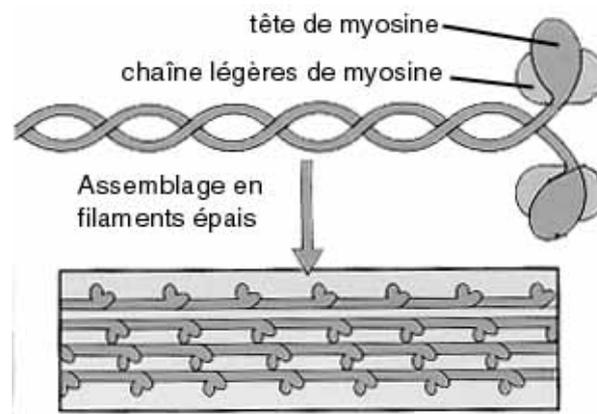


Figure 1.9 : Schéma d'une myosine II [<http://www.spieao.uhp-nancy.fr/>]

La tête de la myosine est une ATPase activée par l'actine. En présence de cette dernière l'activité enzymatique de la myosine devient optimale et passe de quatre molécules d'ATP à vingt par seconde. La structure des domaines de la queue fait que la myosine se dimérise ou non en superhélice ; c'est en fonction de cela qu'est dicté le type de fonction exercée par chaque myosine. Le cycle schématique de fonctionnement d'une myosine est présenté ci-dessous [figure 1.10] d'après Alberts [Alberts & coll., 1994].

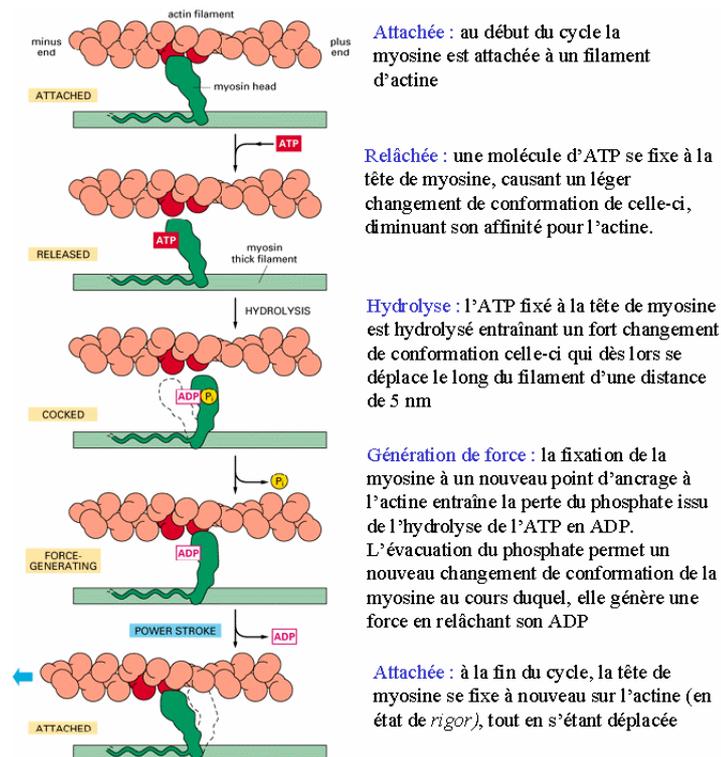


Figure 1.10 : cycle schématisé du fonctionnement d'une myosine [Alberts & coll., 1994]

Myosine I (monomère) et myosine V (dimère) se lient aux membranes phospholipidiques [Adams & coll., 1989]. Actine et myosine I génèrent les forces requises pour déplacer les vésicules vers le centre ou vers la périphérie cellulaire et dans les mouvements de la membrane plasmique. Les molécules de myosine II (dimère) s'organisent au sein des cellules musculaires en filaments épais et prennent part aux contractions des gros faisceaux d'actine [Jay & coll., 1995] (sarcomères).

Dans les cellules, autres que les myocytes, actine et myosine II s'associent en faisceaux contractiles. Ces faisceaux prennent part à l'adhérence des cellules à un support et également, par de nombreux processus coordonnés dans le temps et dans l'espace, à la migration cellulaire. La motilité [Rafelski & coll., 2004] des cellules non-musculaires se distingue par la polymérisation de l'actine [Weiner & coll., 1999] et l'assemblage des filaments d'actine en faisceaux et réseaux au niveau du front mobile, par la formation de plaques d'adhérence aux points de contacts de la cellule avec son support et par la rétraction de son train arrière [Riveline & coll., 2001]. La migration résulte donc d'un remodelage cyclique du cytosquelette en interaction avec les moteurs moléculaires.

5. Membrane plasmique et protéines associées

Toutes les membranes biologiques bien que différentes de part leurs fonctions ont en commun le rôle de définition des limites des compartiments cellulaires et se composent de la même structure phospholipidique lamellaire [figure 1.11]. La membrane plasmique, d'une épaisseur avoisinant la centaine de nanomètres, est une surface d'échange asymétrique où transitent un grand nombre d'informations. C'est son panel particulier de protéines, libres ou ancrées, qui lui permet d'effectuer ses multiples activités comme celle de capter et transmettre un signal extra-cellulaire.

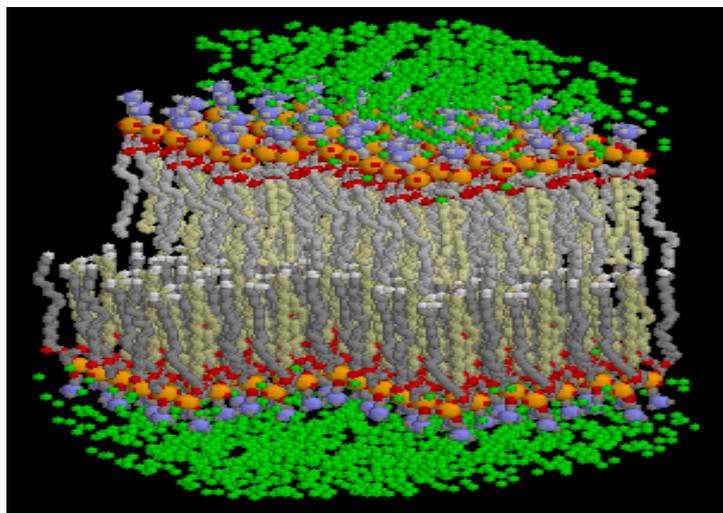


Figure 1.11 Structure schématique d'une bicouche de phospholipide [<http://membres.lycos.fr/jjww/1.htm>]

Certaines de ces protéines servent de point d'attache entre les fibres du cytosquelette et la matrice extracellulaire [Katz & coll., 2000], ou d'autres cellules. D'autres protéines jouent un rôle spécifique dans la reconnaissance de molécules d'intérêt pour la cellule. Une famille bien particulière appelée canaux procure des issues transmembranaires à des molécules « signalétiques ». Celles-ci régulent également pression osmotique et différence de potentiel transmembranaire.

Les rôles de la membrane plasmique sont donc multiples, de nombreuses informations arrivent et repartent de la cellule subissant des étapes traductionnelles assurées par celle-ci. Les stimuli chimiques ne sont pas les seuls à délivrer de l'information à la cellule. En effet, des approches différentes ont montré que des stimuli mécaniques, réalisés en des points spécifiques ou non de la membrane, permettaient l'induction de signaux biologiques [Giancotti & coll., 1999][Ingber, 2003]. Il a été montré que la tension de la membrane [Evans & coll., 1976] et son arrimage au cytosquelette étaient donc des facteurs déterminants dans des mécanismes

comme la modulation de l'expression génétique, l'exocytose et la détermination de la forme cellulaire.

6. Ordres de grandeurs et propriétés mécaniques des filaments individuels du cytosquelette

Toutes ces considérations biologiques nous révèlent d'ores et déjà que les propriétés mécaniques de la cellule vont être d'une grande complexité à sonder au regard de tous les acteurs mis en jeu. Chaque composant, membrane, cytosquelette et protéines associées, va intervenir sur des échelles spatio-temporelles pouvant couvrir de larges spectres de part leurs multiples liens et interactions. Le tableau suivant présente de manière synthétique les propriétés individuelles de chacun des éléments cités précédemment (adapté de [Alberts & coll.],[Janmey & coll., 1991]).

Propriétés	Microfilaments (Actine)	Microtubules	Filaments intermédiaires
Sous-unités protéiques	Actine G globulaire ou forme polymérisée F, en cellule	Tubuline	Famille hétérogène de protéines (desmine, kératine, vimentine)
Ordres de grandeurs caractéristiques (filaments)	Diamètre (ϕ) \approx 5-9 nm Longueur (L) \approx 30-100 μ m Module d'Young (E) \approx 10^9 Pa (Valeur calculée à partir d'expériences mesurant la rigidité de courbure d'un filament) Longueur de persistance : $L_p=10\mu$ m	$\phi \sim$ 25 nm L > 100 μ m E \approx 10^9 Pa $L_p=1$ mm	$\phi \sim$ 10 nm L > quelques μ m Plus flexible que l'actine et les microtubules

<p>Propriétés structurales dans la cellule</p>	<p>Dispersés au travers de la cellule, en réseaux ou en filaments et très concentrés au niveau de la zone corticale</p> <p>Les filaments sont rarement isolés, ils sont majoritairement sous forme réticulée en réseaux</p>	<p>- En étoile depuis le centrosome</p> <p>- En fibre ou sous forme de fuseau mitotique dans le cytoplasme</p> <p>- En structure d'échafaudage pour les cils</p>	<p>Sous forme de coque nucléaire et sous membranaire</p> <p>Très concentrés dans le cytoplasme de cellules, devant résister à de grandes déformations, du type des cellules épithéliales</p>
<p>Propriétés mécaniques issues des expérimentations <i>in vitro</i></p>	<p>Forment des réseaux viscoélastiques enchevêtrés Ayant un module de cisaillement $\propto 0, 1-10$ kPa à des concentrations physiologiques entre 5 et 20 mg/mL</p> <p>Réponse mécanique complexe, non modélisable en éléments discrets</p>	<p>Forment des réseaux viscoélastiques enchevêtrés mais avec un module de cisaillement plus faible que l'actine dans des conditions similaires</p> <p>[Wade & coll., 1998]</p>	<p>Forment des réseaux viscoélastiques à de faibles concentrations en protéines</p> <p>Présentent des effets de renforcement sous contrainte</p>
<p>Propriétés mécaniques au sein de la cellule</p>	<p>Structure flexible</p> <p>Sous tension</p> <p>Indispensable à la génération de forces</p>	<p>Plus rigide que l'actine</p> <p>Comportement fluide dans le cytoplasme</p> <p>Résiste de façon très efficace en compression</p>	

De nombreuses informations ont pu être tirées de l'étude des filaments isolés dans l'interprétation des lois mécaniques mesurées sur des cellules vivantes. Cependant, lorsque les études micromécaniques mises en place actuellement comparent les mesures effectuées en cellules ou *in vitro* sur des gels réticulés [Gisler & coll., 1999][Mahaffy & coll., 2004][Mason & coll., 2000][Morse, 1998], de nouvelles questions apparaissent :

- Comment l'interconnexion ou l'interaction des éléments du cytosquelette entre eux, influence la réponse mécanique mesurée ? Existe-t-il un lien mécanique entre ces différents éléments ?

- Quel est le lien mécanique entre la membrane cellulaire et le noyau ? En quoi les filaments du cytosquelette jouent-ils un rôle dans la liaison membrane-noyau ?

- Comment la contribution de chaque filament se traduit-elle mécaniquement à l'échelle de la cellule ?

- Quel est le rôle du cytoplasme et comment se fait l'interaction avec la matrice extracellulaire [**Katz & coll., 2000**] ?

- Quels sont les rôles des processus actifs : *treadmilling*, moteurs moléculaires ... ?

B. Outils d'étude de la micromécanique cellulaire : éléments de rhéologie

La motilité cellulaire [Rafelski & coll., 2004] est un mécanisme biologique fascinant nécessitant l'établissement de forces mécaniques par la cellule. Les premières cellules étaient probablement non motiles mais quand elles devinrent plus volumineuses, elles développèrent des fonctions plus sophistiquées. La distribution des matériaux dans la cellule requit alors de vrais systèmes de transport. C'est pourquoi la motilité des cellules non-musculaires nécessite une structuration dynamique particulière de l'actine combinant l'effet du treadmilling et des forces développées par les moteurs moléculaires.

Bien qu'il existe une vaste bibliographie sur le sujet, la migration cellulaire est peu abordée d'un point de vue mécanique. Pourtant, beaucoup de cellules subissent des changements de formes spectaculaires : qu'il s'agisse de la contraction musculaire, de la progression des axones neuronaux, de la naissance des protrusions superficielles telles les microvillosités ou les filopodes, des déformations dues à la respiration, du cisaillement exercé par le flux sanguin sur les cellules endothéliales ou circulantes. La cellule adhérente doit donc être capable de résister à des forces extérieures via son support mécanique qu'est le cytosquelette d'actine. L'interaction de la cellule avec son micro-environnement est fondamentale dans la vie cellulaire. En l'absence de forces externes, des cellules ne peuvent adhérer normalement et tendent à s'arrondir. Un certain nombre d'entre elles activent alors un processus de mort programmée appelé *apoptose*. De nombreuses études ont montré que la cellule n'adhère efficacement à son substrat [Danowski & coll., 1992] qu'en développant de façon dynamique un champ de contraintes internes et externes supporté principalement par les différents composants du cytosquelette et par les complexes d'adhérence. Au moment de la cytokinèse, l'étranglement au niveau du sillon de clivage est dû à la réorganisation spatiale du cytosquelette d'actine formant un anneau contractile dans le plan médian de la cellule [Straight & coll., 2003]. Un autre point de vue consiste à dire que certaines cellules spécialisées, telles que les cellules ciliées de l'oreille interne, réalisent leurs fonctions en convertissant un stimulus mécanique ou chimique en signal électrique. De même, les cellules peuvent être activées dans leur processus de prolifération et de migration par l'application de contraintes. La cellule traduit donc aussi des forces externes en signaux biochimiques, c'est la mécanotransduction [Chen & coll., 2001][Ingber, 2003][Meyer & coll., 2000].

Cependant, les mouvements les plus subtils ont lieu au sein de la cellule, à savoir la séparation active des chromosomes, l'écoulement du cytosol et le trafic interne de vésicules. Tous ces mouvements ne sont pas aléatoires, ils sont régis par la cellule. Elle doit donc être capable de générer des forces bien déterminées aux différentes étapes de sa vie et d'avoir une réponse appropriée à une contrainte mécanique extérieure. Selon la nature de la contrainte, le type cellulaire, et l'état de la cellule, on observe des réponses très variées : rigidification [Choquet & coll., 1997], contraction, différenciation, migration, activation de fonctions (voir de gènes [Farge, 2003]) dépendantes de l'environnement mécanique. L'organisation spatiale et temporelle de ces processus, reposant sur des échelles de temps allant d'une fraction de secondes à plusieurs dizaines de minutes, met en jeu l'interaction de nombreuses protéines aboutissant à la nucléation de forces bien déterminées, toutes ayant une relation étroite avec le cytosquelette d'actine. Celui-ci est donc un acteur de la forme de la cellule, de sa résistance à la déformation mécanique, de la génération de force mais il est aussi un senseur mécanique permettant à la cellule de traduire une force extérieure en un signal biochimique.

Toutes ces observations expérimentales ont poussé biologistes et physiciens à étudier le lien entre biologie et mécanique dans l'élaboration de ces processus dynamiques, ainsi que le rôle des différents constituants impliqués et de leurs interactions. Les études sur la mécanique de cellules vivantes, d'éléments subcellulaires ou de molécules biologiques ont rapidement évolué dans les dernières décennies grâce aux progrès de la bio-imagerie et la capacité à générer et mesurer des forces et déplacements avec une résolution proche du piconewton et du nanomètre.

Le présent sous-chapitre, après une introduction sur les fondements de la rhéologie, traite de manière non exhaustive des propriétés viscoélastiques du réseau d'actine, soit polymérisée *in vitro*, soit *in vivo* dans la cellule. Elles sont étudiées par différentes techniques de micromanipulation et interprétées à l'aide de différents modèles théoriques. Les approches expérimentales sont identiques dans leur principe de base qui est d'exercer une contrainte (variable ou constante) sur une cellule adhérente, de mesurer les déformations résultantes et de corrélérer celles-ci aux partenaires biochimiques associés. Cependant elles sont différentes au sens où elles sondent les propriétés mécaniques du milieu intra-cellulaire à différentes échelles de longueur et de temps, en exerçant des contraintes ou des déformations sur différents ordres de grandeur. Toutes ces techniques se situent dans le cadre de la microrhéologie.

1. Définitions et outils

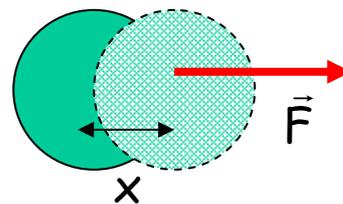
Définition : Etymologiquement, la rhéologie est une discipline qui traite des écoulements. Elle s'intéresse de manière plus générale aux écoulements et déformations des matériaux sous l'action de contraintes [Couarraze & coll., 2000]. Certains matériaux, comme les mousses, les pâtes, les émulsions, les polymères [O'Shaughnessy & coll., 2003], les suspensions, les cellules ne sont descriptibles ni par la mécanique des fluides simples ni par la théorie de l'élasticité qui voient là les limites de leur champ d'étude. La rhéologie a donc pour but de caractériser les propriétés des matériaux au comportement mal défini et intermédiaire entre le fluide newtonien et le solide élastique parfait. Cette partie présente les principales grandeurs physiques intervenant en rhéologie.

Éléments de base : Un matériau soumis à un ensemble de forces est susceptible de se déformer. Les mouvements des différents points du matériau dépendent de l'intensité des forces appliquées. Le principe est simple, par l'application d'une sollicitation mécanique connue (contrainte σ , force F , couple C) et par la mesure de la réponse mécanique induite (déformation ε , déplacement x , torsion θ), on peut accéder aux coefficients viscoélastiques du matériau nous renseignant sur ses propriétés mécaniques intrinsèques.

Dans le cas du solide purement élastique la relation est linéaire $F = kx$ où k est le module élastique. Si on prend l'exemple d'une bille sphérique de rayon a dans un milieu élastique incompressible, $F = 2\pi a E x$ où E est le module d'Young.

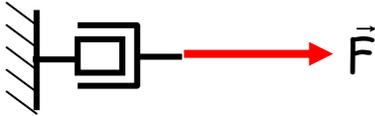


Solide purement élastique
 $F = kx$



Sphère dans un milieu élastique
 $F = 2\pi a E x$

Dans le cas du liquide purement visqueux $F = \xi \frac{dx}{dt}$ où ξ est le module de dissipation.



Liquide purement visqueux

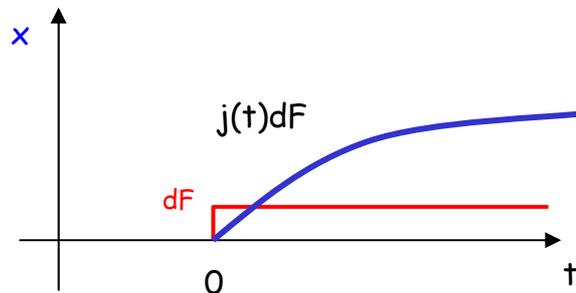
$$F = \xi \frac{dx}{dt}$$

Sphère dans un liquide visqueux

$$F = 6\pi a \mu v \quad \mu : \text{viscosité} ; v : \text{vitesse}$$

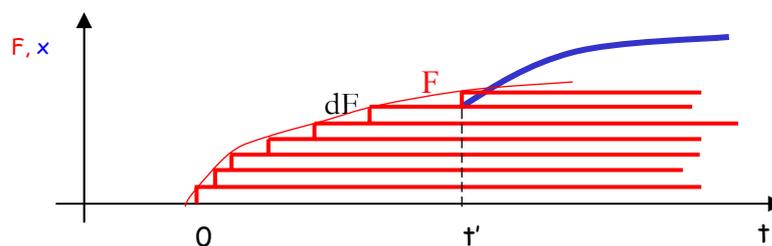
Cas du milieu viscoélastique linéaire : Par définition, la réponse d'un matériau linéaire à une contrainte est proportionnelle à l'amplitude de celle-ci. Il convient tout d'abord de donner deux définitions générales : fonction de fluage et module complexe, indispensables à l'étude de la viscoélasticité linéaire.

La fonction de fluage $J(t)$ est définie comme la déformation subie par le matériau, lorsqu'on impose à ce dernier une contrainte d'amplitude unité à l'instant initial $t=0$, contrainte qui est maintenue constante au cours du temps. Par extension nous définissons dans la suite une fonction fluage $j(t)$ donnant le déplacement $dx = j(t)dF$ en réponse à un échelon de force dF appliqué à l'instant $t=0$ ($J(t)$ et $j(t)$ sont reliées par un facteur géométrique ayant la dimension d'une longueur).



$j(t)$ fonction de fluage du milieu

Si on exerce une force variable dans le temps $F(t)$, on peut décomposer la contrainte en échelons élémentaires



On peut alors montrer en utilisant la définition de la fonction de fluage, que la déformation $dx(t)$ correspondante est donnée par la relation générale :

$$dx(t) = j(t - t') dF(t')$$

Si la réponse du milieu est linéaire et invariante dans le temps alors on peut utiliser le principe de superposition de Boltzmann :

$$x(t) = \int_{-\infty}^t j(t - t') dF(t') = \int_{-\infty}^t j(t - t') \dot{F}(t') dt'$$

$$\text{Soit : } x(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} j(t - t') \dot{F}(t') dt'$$

Car $j=0$ pour $t < t'$

Si on passe en transformée de Fourier :

$$x(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t') e^{i\omega t'} dt' \quad \text{et} \quad F(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} F(t') e^{i\omega t'} dt'$$

On fait alors la transformée de Fourier d'un produit de convolution $x(\omega) = J(\omega)F(\omega)$

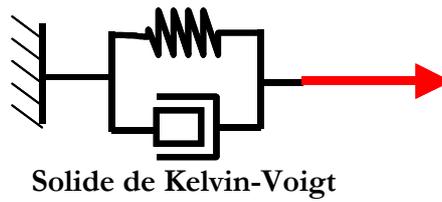
$$\text{avec : } j(\omega) = i\omega \int_0^{+\infty} j(t') e^{i\omega t'} dt'$$

On définit alors plus fréquemment la fonction de réponse $G(\omega)$, encore appelée module complexe tel que $F(\omega) = G(\omega) x(\omega)$

Ce module complexe s'écrit encore $G(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega)$, où G' et G'' sont respectivement le module élastique et le module de perte du matériau.

2. Quelques exemples simples

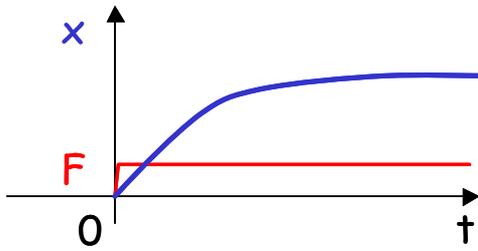
Modèle du solide de Kelvin-Voigt : il est constitué par l'association en parallèle d'un ressort, de raideur k , et d'un amortisseur de module de dissipation ξ . L'équation différentielle régissant ce système est de la forme : $F = kx + \xi \dot{x}$



Réponse à un échelon de force (fluage)

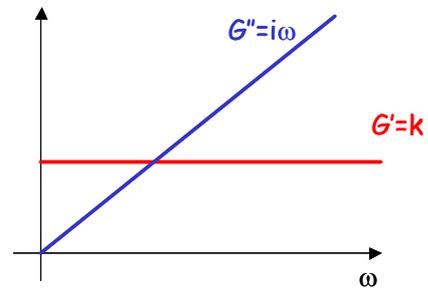
$$j(t) = j_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$$

avec $\tau = \frac{\xi}{k}$



La transformée de Fourier nous donne

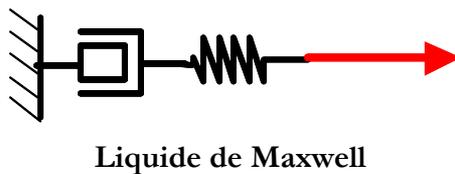
la réponse en fréquence: $G(\omega) = k+i\omega\xi$



Modèle du liquide de Maxwell : il est constitué par l'association en série d'un ressort de raideur k et d'un amortisseur de module de dissipation ξ . Les équations régissant ce système sont de la forme :

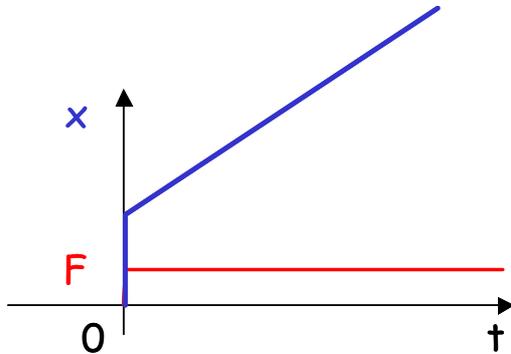
$$F = kx_1 = \xi \dot{x}_2 \text{ avec } x = x_1 + x_2$$

$$\frac{dx}{dt} = \frac{1}{k} \frac{dF}{dt} + \frac{F}{\xi}$$



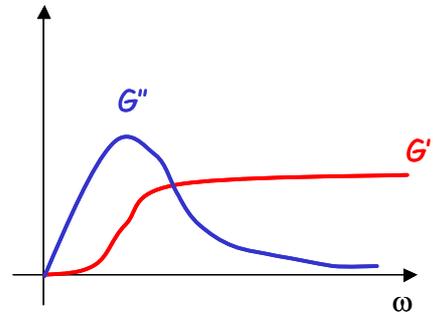
Réponse à un échelon de force

$$j(t) = \left(\frac{1}{k} + \frac{t}{\xi}\right)F$$



Réponse en fréquence : $x = \left(\frac{1}{k} + \frac{1}{i\xi\omega}\right)F$

$$G(\omega) = \frac{k\xi^2\omega^2}{k^2 + \xi^2\omega^2} + i\frac{k^2\xi\omega}{k^2 + \xi^2\omega^2}$$



Milieu viscoélastique complexe : Pour des cas plus complexes la forme des fonctions $G'(\omega)$ et $G''(\omega)$ est en général quelconque. Il est rare que l'on puisse décrire la viscoélasticité [Gittes & coll., 1997] du milieu simplement par des assemblages d'éléments purement élastiques et visqueux. Cependant, G' et G'' peuvent être prédits dans le cadre de certains modèles. Par exemple, dans le cas du réseau enchevêtré de polymères semiflexibles, G' et G'' sont prédits pour évoluer en loi puissance de la fréquence avec un exposant identique de $3/4$ [Amblard & coll., 1996][Le Goff & coll., 2002].

C. Quid du milieu intra-cellulaire ?

1. Introduction

Le comportement mécanique d'un corps est gouverné par des lois constitutives qui décrivent la relation existant entre la contrainte appliquée, la déformation et le taux de déformation résultant. Ainsi, n'importe quelle technique permettant de sonder les propriétés mécaniques de la cellule doit permettre de donner directement ou indirectement des mesures de cette relation. Le paramètre physique le plus simple à extraire de ces mesures est une estimation du module d'Young E , *i.e.* un index d'habilité de la cellule à répondre à de faibles déformations en régime statique. Mais cette description est en général insuffisante.

Au vu du nombre de techniques expérimentales développées durant les dernières années pour sonder les propriétés viscoélastiques du milieu intracellulaire, il est difficile d'effectuer un

classement de ces méthodes. En général, la plupart de ces méthodes utilisent des techniques non standardisées et non commercialisées. On peut classer ces techniques de différentes façons :

- Cellule unique ou population cellulaire : selon que la contrainte est appliquée à une cellule unique ou à un ensemble de cellules.
- Contrainte spécifique ou aspécifique : selon qu'elles utilisent ou non des sondes recouvertes d'un ligand spécifique agissant directement sur le cytosquelette.
- Locale ou globale : selon que la déformation de la cellule est globale ou que les perturbations appliquées sont locales.
- Contrainte appliquée dans le volume cellulaire ou à travers la membrane plasmique.

On peut tout de même définir deux grandes approches pour étudier la mécanique de la cellule. La première s'attache à l'observation directe de l'élasticité d'éléments individuels du cytosquelette [Maggs, 1998][Ott & coll., 1993] alors que la deuxième se focalise sur des mesures de viscoélasticité cellulaire. La première méthode a l'avantage d'isoler les éléments minimaux permettant de comprendre l'architecture du cytosquelette [Wu & coll., 1998]. Nous nous attacherons à décrire les techniques qui donnent des mesures directes de la viscoélasticité cellulaire en les classant suivant les modèles utilisés : des modèles structuraux (continus et discrets) aux modèles comportementaux (type viscoélastique simple) jusqu'aux modèles les plus récents comme les modèles dits de matériaux vitreux mous et les modèles phénoménologiques.

Bien qu'il soit plus communément accepté que les mesures mécaniques effectuées sur des cellules doivent être interprétées par des modèles structuraux, il n'existe pas de modèle unique décrivant le comportement mécanique et les propriétés viscoélastiques de celle-ci. Les modèles actuels tels que le modèle de tenségrité (*tensional integrity*, [Ingber, 2003]) sont simples au regard du fait qu'ils sont basés sur des hypothèses de structure du milieu intracellulaire qui leur conférerait leurs propriétés mécaniques mais sont soumis à controverse en raison du fait qu'ils sont uniquement basés sur des données expérimentales [Ingber, 2003]. Les modèles comportementaux interprètent quant à eux les données expérimentales en terme de purs modèles mécaniques.

2. Les modèles structuraux

Il est tout d'abord important de distinguer une structure discrète et une structure continue. On peut appliquer le formalisme des milieux continus dans le cas où la plus petite dimension accessible à l'expérience est grande devant la taille caractéristique du système, ici la taille d'enchevêtrement du réseau. Certains modèles structuraux se basent au contraire sur des structures discrètes en s'appuyant sur des expériences de nanomanipulation comme celles de microscopie à force atomique.

a) Les modèles continus (cortex élastique, cytosol visqueux)

Ils sont aussi appelés modèles de membranes corticales [Yeung & coll., 1989]. Dans ces modèles, structure et mécanique de la cellule sont organisées selon trois couches : un noyau très élastique (première couche) recouvert d'un bain cytoplasmique de microtubules enchevêtrés se comportant comme un fluide viscoélastique (deuxième couche) et d'un cortex sous-membranaire d'actine élastique (troisième couche). Cette dernière est modélisée comme étant soumise à une prétension [Albrecht-Buehler & coll., 1987][Pourati & coll., 1998]. Cette précontrainte constante est équilibrée par la pression positive qu'exerce le cytoplasme sur la membrane. Bien qu'apparemment simpliste ce modèle s'est révélé cohérent avec des expériences récentes effectuées à l'aide de microaiguilles venant déformer localement une cellule individuelle en état d'adhésion. Ce modèle a été modifié par Bausch [Bausch & coll., 1998] en y ajoutant un couplage entre l'actine corticale et la bicouche membranaire. Des mesures cohérentes ont été effectuées à l'aide de nanoparticules magnétiques injectées dans des cellules tumorales. Ces deux modèles supposent également qu'une contrainte locale n'entraîne qu'une réponse locale du cytosquelette.

b) Les modèles discrets

Il existe deux types de modèles discrets : les premiers modèles dit de *Open cell foam networks* (mousses) supposant que la déformabilité du cytosquelette repose avant tout sur la déformabilité d'éléments individuels du réseau. Les seconds se basent sur la notion de réseau de câbles précontraints [Stamenovic & coll., 1999]. Bien que ces modèles puissent avoir des rôles prédictifs dans la détermination de l'organisation architecturale de la cellule, leur caractère purement mécanique ne leur permet pas de prendre en compte les mécanismes dissipatifs mis en

jeu dans la structure : mécanismes biochimiques, facteurs génétiques intervenant dans la régulation et la génération de forces du cytosquelette [Choquet & coll., 1997].

(1) Open-cell foam networks

Ce modèle décrit la structure cellulaire comme un réseau interconnecté de barres élastiques, qui se courbent lorsque celle-ci se déforme. Satcher & Dewey ont proposé un modèle (1996) micro-structural du cytosquelette d'actine dans lequel la courbure des micro-filaments serait le mode principal de résistance à la déformation pour la cellule. Il a de plus été suggéré que les microtubules pouvaient eux aussi être modélisés par un open-cell foam network. Ainsi Satcher & Dewey ont proposé la formule suivante pour décrire le module d'Young E^* de cellules endothéliales adhérentes :

$$E^* = CE\phi$$

C étant une constante, E^* étant le module d'Young d'un filament individuel et ϕ étant la densité relative de la mousse (i.e. la fraction relative entre le volume des barres élastiques et le volume de la mousse).

En prenant des valeurs raisonnables pour chacun des paramètres, Stamenovic et Coughlin [Coughlin & coll., 2003] ont estimé que E^* devait varier entre 10^3 et 10^4 Pa. On peut voir dans le tableau 3 que ces valeurs sont cohérentes avec des résultats expérimentaux où l'on applique de grandes déformations à la cellule. Ceci est compatible avec le fait que la courbure des filaments du cytosquelette puisse contrôler la réponse cellulaire à de larges déformations.

(2) Modèles de structure discrète précontrainte, le cas particulier de la structure de tenségrité

Ces modèles considèrent la structure cytosquelettique comme un réseau réticulé de câbles soumis à une tension initiale [Stamenovic & coll., 2002][Wang & coll., 2002][Wang & coll., 2001]. Cette pré-tension est maintenue activement par les processus liés à la consommation d'ATP (complexe acto-myosine [Svitkina & coll., 1997]) et passivement, soit par l'interaction cellule-microenvironnement, soit par la pression osmotique cytoplasmique. Dans le cas particulier du cytosquelette, Stamenovic & Coughlin [Coughlin & coll., 2003] ont estimé que le module élastique de celui-ci devait vérifier la loi suivante :

$$E^* \geq \frac{F\phi}{2\pi r^2}$$

Où F est la tension appliquée à chaque câble, ϕ est la fraction volumique de filaments d'actine dans la cellule, r est le rayon caractéristique d'un filament d'actine.

En prenant des valeurs raisonnables pour chacun des paramètres, Stamenovic & Coughlin ont estimé cette fois que E^* devait varier entre 10^1 et 10^2 Pa. Ces valeurs sont en accord avec les mesures effectuées par des techniques appliquant de plus faibles contraintes.

Si l'on essaie d'effectuer une comparaison entre les valeurs prédites par les modèles et les valeurs obtenues expérimentalement, Stamenovic & Coughlin [Coughlin & coll., 2003] ont suggéré que ces deux modèles discrets correspondaient à deux gammes de déformation de la cellule. Pour eux, l'actine supporte la pré-tension [Pourati & coll., 1998], ce qui confère de la stabilité à la forme de la cellule. Ainsi, quand la cellule doit résister à de petites déformations ($< 10\%$) les filaments ne se courbent plus et ne changent pas leurs longueurs de façon significative. Ils tournent et changent de place pour atteindre une nouvelle configuration d'équilibre. Dans ce cas, le modèle de structure précontrainte est plus approprié [Coughlin & coll., 2003]. Pour de plus larges déformations (contrainte $> 10^3$ Pa, et déformation $> 50\%$), les filaments se courbent. Dans ce cas les *Open-cell foam models* sont plus appropriés [Stamenovic & coll., 1999].

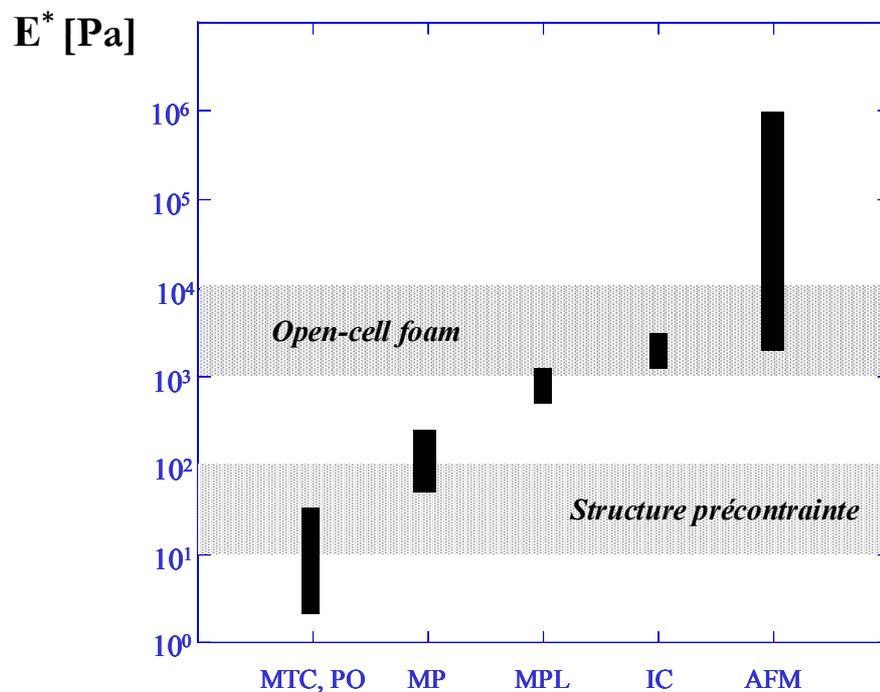


Figure 1.12 : Tableau récapitulatif des mesures de modules d'Young cellulaires obtenus selon différentes techniques (MTC-magnétocytométrie, PO-pincettes optiques, MP-micropipette, MPL-microplaques, IC-indentation cellulaire, AFM-microscopie à force atomique). On a représenté sur le graphique les plages de valeurs prédites par les différents modèles structuraux.

Le modèle de tensegrité proposé par Donald Ingber [Ingber, 2003][Ingber, 2003] [Ingber, 2003][Stamenovic & coll., 2002] (repris du concept de Fuller) en 1981 est un cas particulier de ces structures précontraintes. Dans celui-ci, le réseau protéique est constitué de barres rigides, soumises à des efforts de compression et des câbles élastiques supportant la tension mécanique [figure 1.13].

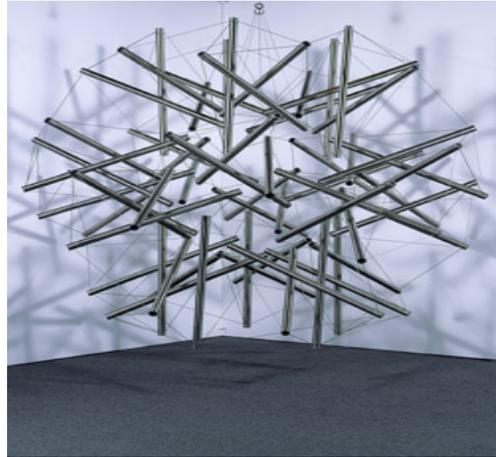


Figure 1.13 : Exemple de structure de tensegrité à 64 éléments
[<http://www.engr.wisc.edu/server/welcome/artofengineering/tensegrity.html>]

La tension interne est auto-équilibrée par la compression des barres rigides et ceci même en l'absence de force appliquée. La structure répond à une déformation par une redistribution spatiale de ces différents éléments. D'un point de vue biologique ce modèle considère que le cytosquelette interne est entouré d'une coque sous-membranaire purement élastique (actine, ankyrine, spectrine). La membrane quant à elle, selon le type d'adhésion focale considéré, jouerait un rôle dans le couplage mécanique entre microfilaments, microtubules et filaments intermédiaires.

Il existe différentes expressions pour le module d'Young dans le cadre de la tensegrité selon le type de géométrie considéré [Stamenovic & coll., 2002]. Dans tous les cas, la valeur moyenne du module d'Young se situe autour de la dizaine de pascals, ce qui est dans la gamme inférieure des valeurs expérimentales. Ce modèle possède donc des limites, comme celle de ne pas refléter la nature viscoélastique des cellules et également de ne pas trancher, dans le cadre des expériences de tractions avec les modèles du même type. De plus, ces modèles structuraux ne décrivent pas du tout la dynamique du système. Enfin, peu d'expériences ont été réalisées pour les valider, en particulier sur les effets non linéaires observés par d'autres mesures expérimentales (module d'Young dépendant de l'amplitude de la contrainte). Cependant ils peuvent amener des informations pour comprendre comment les efforts se transmettent à l'intérieur de la cellule.

3. Le cas du in-vitro, les modèles de percolation

Ces modèles se focalisent sur l'interconnectivité et la reptation des éléments du cytosquelette comme caractéristique du comportement mécanique cellulaire [O'Shaughnessy & coll., 2003].

Des mesures sur des réseaux d'actine enchevêtrés [Gittes & coll., 1998][Isambert, 1996] [Tseng & coll., 2001] ont permis de mettre en évidence le comportement complexe en loi de puissance [Amblard & coll., 1996][figure 1.14] de ces réseaux de polymères et inviter ainsi les expérimentateurs à faire évoluer les modèles structuraux viscoélastiques simples. Ainsi, le comportement complexe de ces réseaux est interprété comme une modification de la connectivité des filaments résultant d'une transition de phase. Cette transition de phase étant due à un changement de concentration des polymères. Ces modèles bien qu'utilisés pour étudier des gels d'actine [Dichtl & coll., 2002][Mahaffy & coll., 2004][Mason & coll., 2000][Ziemann & coll., 1994] ne donnent pas de prédiction quantitative quant aux index de déformabilité des cellules.

L'étude de ces modèles doit être poursuivie en intégrant les éléments actifs tels que les moteurs moléculaires par exemple.

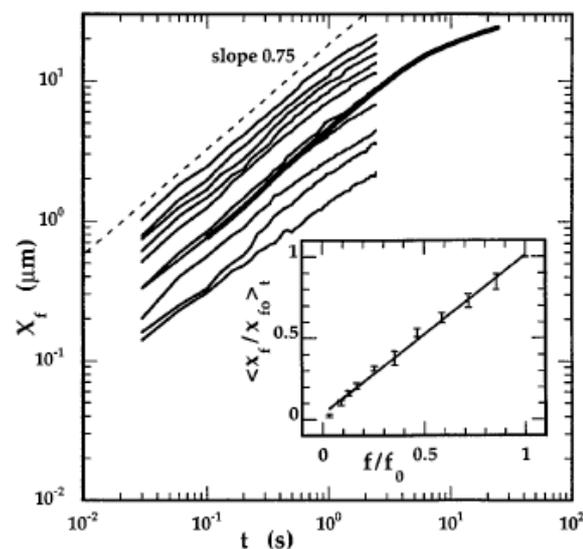


Figure 1.14 : Courbe donnant le déplacement de billes de 2.8 μm de diamètre en fonction du temps, soumises à une force oscillante et immergées dans une solution d'actine à 0.1mg/mL d'après [Amblard & coll., 1996].

4. Les modèles comportementaux

Les modèles comportementaux établissent explicitement les relations entre contrainte et déformation ainsi que leur dépendance en fonction du temps. Cette dépendance temporelle est utilisée pour ajuster les mesures expérimentales et en déduire des paramètres viscoélastiques d'intérêts [Bausch & coll., 1998][Wilhelm & coll., 2003]. Cependant, ces formules ne fournissent aucune information d'un point de vue purement structural.

a) Les modèles viscoélastiques simples

Il a été longtemps accepté que la rhéologie cellulaire repose sur l'interaction d'éléments élastiques et d'éléments visqueux. C'est de ce point de vue que de nombreux auteurs ont utilisé des relations issues du formalisme des milieux viscoélastiques simples pour ajuster leurs mesures. Les déformations sont analysées à l'aide de modèles représentant le corps viscoélastique comme une combinaison de ressorts et d'amortisseurs visqueux [Evans & coll., 1989]. Dans leur forme la plus simple ces modèles décrivent le comportement mécanique cellulaire à l'aide de deux paramètres constants (ne dépendant donc pas de l'amplitude de la contrainte ni de la déformation) : un module élastique et une viscosité [Schmid-Schonbein & coll., 1981]. Mais ces modèles ne peuvent pas prendre en compte les effets de continuum récemment observés dans le comportement mécanique des cellules [Maksym & coll., 2000][Fabry & coll. , 2001].

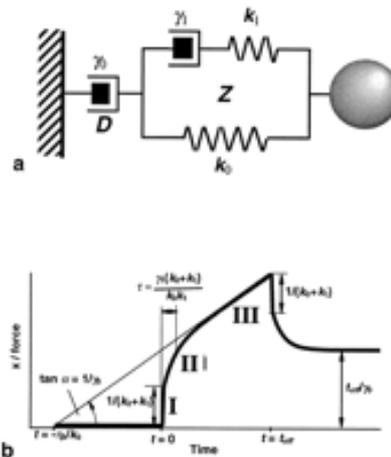


Figure 1.15 : Modèle viscoélastique simple de la réponse du cytosquelette cellulaire soumis à des contraintes exercées par pinces magnétiques[Bausch & coll. , 1998]

Ces modèles ad-hoc ne peuvent donner d'information quant à la structure et à la dynamique hautement complexe du réseau. Ils ne permettent que d'obtenir une estimation de la viscoélasticité cellulaire.

b) Structural damping et Soft Glassy Rheology

En raison des dispersions observées sur les mesures effectuées en régime statique ou quasi-statique, et en particulier sur les mesures de temps de relaxation, de récentes études micro-mécaniques du milieu cellulaire se sont penchées sur la caractérisation rhéologique de celui-ci en régime dynamique. Elles se sont attachées à mesurer un module élastique complexe G^* [Monthus & coll., 1996]. Ce module complexe est en général défini dans le domaine fréquentiel par sa partie réelle G' (module élastique) et sa partie imaginaire G'' (module de perte) par la relation :

$$G^*(f) = G'(f) + iG''(f)$$

Un modèle largement utilisé pour interpréter les mesures de G^* sur les échantillons biologiques est le modèle de *structural damping*. Ce modèle empirique a été utilisé pour décrire de nombreux matériaux biologiques [Fung, 1984]. Dans celui-ci, le coefficient de friction (module de perte) est une fraction constante du module élastique pour toutes les fréquences. Fredberg & Stamenovic ont établi que le rapport $\frac{G''}{G'}$ noté η devait être constant. Ainsi, le modèle nous donne une relation directe entre la contrainte appliquée $T(f)$ et la déformation résultante $\delta(f)$ dans le domaine fréquentiel [Maksym & coll., 2000].

$$T(f) = G'(1+i\eta) \delta(f)$$

Le modèle de structural damping a pu être validé par des mesures de magnétocytométrie effectuées sur des cellules adhérentes [Fabry & coll., 2001]. Cette approche formelle semble intéressante, car contrairement aux modèles viscoélastiques simples, le modèle de structural damping ne prévoit pas un nombre fini de temps de relaxation mais plutôt une distribution continue de temps de relaxation. La réponse de ces matériaux à une expérience de fluage sera donc de la forme t^{x-1} (obtenue par passage dans le domaine temporel de la relation ci-dessus). Or, ces comportements en loi de puissance ont été observés dans la cadre de l'étude de gels d'actine *in vitro* [Mahaffy & coll., 2004][Ziemann & coll., 1994] et ont été confirmés à l'échelle cellulaire. Bien que la différence majeure entre ces résultats soit liée à l'exposant de la loi de puissance observée, cette distribution de temps caractéristiques signe le fait que les processus de relaxation du système ne sont pas liés à un temps particulier pour la cellule. De plus, la prévision de couplage entre le module élastique et le module de perte indique que leur source vient

certainement de la même structure : le cytosquelette dans le cas de la cellule. Cependant, cette approche, bien que plus proche des mesures expérimentales effectuées en régime dynamique, ne prévoit pas d'explication sur les bases moléculaires d'un tel type de relaxation.

Soft Glassy Rheology [Lequeux & coll., 2001]

Jeffrey Fredberg a mis en parallèle les mesures d'opto-magnétocytométrie effectuées par son groupe à l'université d'Harvard et les matériaux vitreux mous [Sollich & coll., 1997][Sollich, 1997]. Ceci est dû au fait que les cellules, comme les matériaux vitreux mous répondent à la déformation par une loi puissance de la fréquence. Les matériaux vitreux mous (soft glassy materials – SGM) sont caractérisés par :

- Leur état hors équilibre : les éléments constitutifs du matériau sont en réorganisation permanente en raison de leurs interactions mutuelles [Wang & coll., 2002] [figure 1.16].

- Leur désordre structural : le système est constitué de nombreux éléments différents de par leurs nature chimique et leurs interactions

- Leur métastabilité : le diagramme énergétique de ces matériaux est caractérisé par des régions d'équilibre local séparées par de grandes barrières d'énergie (barrière d'énergie $\gg kT$)

On peut classer dans les SGM : les mousses, les émulsions, les pâtes, les coulis et les milieux granulaires... La physique de ces matériaux est inexplicée du point de vue de la viscoélasticité. Ce comportement vitreux viendrait en particulier de relaxations structurales liées à des changements de conformation.

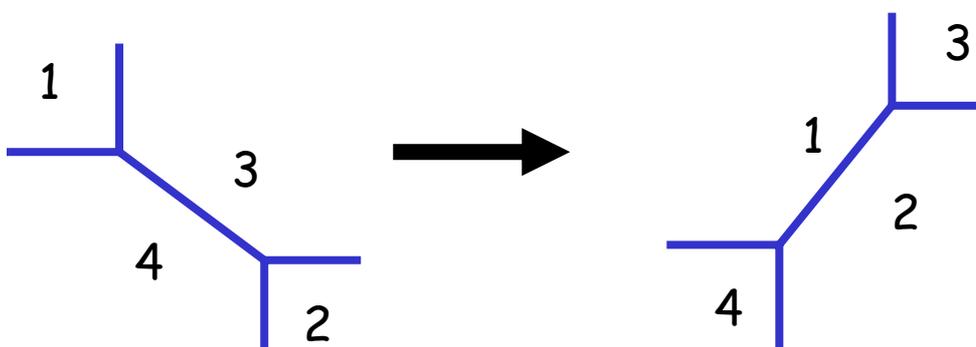


Figure 1.16 : Schéma représentant un des mécanismes élémentaires de la réorganisation structurale d'une mousse

- Un matériau vitreux n'est pas à l'équilibre, sa configuration à un instant donné est piégée dans un puits de potentiel énergétique. Les éléments doivent donc passer des barrières énergétiques qui sont grandes devant les énergies liées à l'agitation thermique [figure 1.17] afin de pouvoir changer de configuration. Il y a donc une nécessité de recevoir un apport d'énergie extérieur, autre que thermique, pour franchir ces barrières.

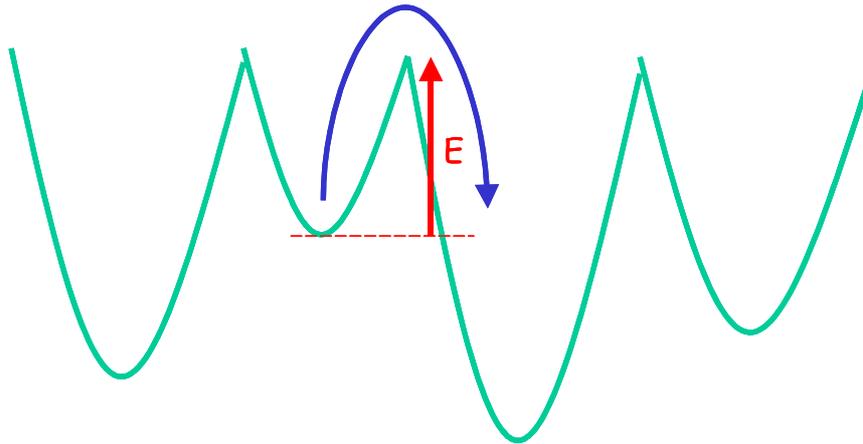


Figure 1.17 : Schéma du franchissement d'une barrière de potentiel nécessitant un apport d'énergie extérieure

Dans le cas du cytosquelette par exemple, les éléments sont vus comme étant en réorganisation permanente et se réarrangent en fonction de leurs interactions avec la matrice protéique. Un changement de configuration correspond donc à un franchissement de la barrière de potentiel de hauteur E , celui-ci se fait avec un temps caractéristique de franchissement de cette barrière :

$$\tau \propto e^{\frac{E}{k_b T_{eff}}}$$

L'origine de cette agitation, responsable des réorganisations spatiales du matériau, n'est pas encore décrite, elle est pour l'instant représentée par une température effective liée à un apport d'énergie extérieure (qui pourrait être l'hydrolyse de l'ATP dans le cas de la cellule)

$$x = k_b T_{eff}$$

- Les matériaux vitreux mous [Lequeux & coll., 2001] sont aussi des milieux désordonnés. Ceci est retranscrit dans le modèle par une distribution continue de puits de potentiels ayant des profondeurs E quelconques. On fait l'hypothèse d'une distribution de puits $P(E)$ (nombre de puits ayant la profondeur E) de la forme :

$$P(E) = e^{-\frac{E}{x_g}}$$

Les puits profonds sont donc « exponentiellement rares » mais le système y reste piégé « exponentiellement longtemps ». Il y a donc une distribution continue des temps de relaxation dans le système et on montre, en moyennant sur cette distribution des temps de relaxation, que les éléments du module complexe peuvent s'exprimer comme suit :

$$G'(\omega) \text{ et } G''(\omega) \propto \omega^{\frac{x}{x_g}-1} \propto \omega^\alpha$$

On a donc une loi puissance pour la fonction réponse du système. Une expression plus précise du module complexe de ce modèle, en accord avec les expériences de microrhéologie cellulaire, a été récemment publiée par Fabry [Fabry & coll., 2001]:

$$G(f) = G_0 \left(\frac{2\pi f}{\phi_0} \right)^{x-1} (1+i\eta) \Gamma(2-x) \cos\left(\frac{\pi}{2}(x-1)\right) + i2\pi f \mu$$

Où $\eta = \tan\left(\frac{\pi}{2}(x-1)\right)$ est le « coefficient d'hystérèse » du modèle, et f la fréquence. G_0 et ϕ_0 sont les facteurs d'échelle pour la raideur et pour la fréquence, μ un terme supplémentaire caractérisant la viscosité du cytosol, supposée newtonienne.

Cette relation décrit l'évolution de $G'(f)$ et de $G''(f)$ en loi puissance de la fréquence gouvernée par l'exposant x . Les limites de variation de x sont $x = 1$ (comportement solide) et $x = 2$ (comportement liquide). Certains critères empiriques définissent les matériaux vitreux mous [Lequeux & coll., 2001] : leur état hors équilibre, leur désordre structural et leur métastabilité. Cela se traduit sur le comportement rhéologique par des fonctions G' et G'' qui doivent varier avec le même exposant ($1.1 < x < 1.40$). De plus le facteur d'hystérésivité doit être constant et voisin de 0.32 pour $x=0,2$.

Les modèles comportementaux semblent correctement représenter le comportement mécanique du cytosquelette d'actine. Ils ont tout d'abord permis d'éliminer les modèles utilisant

des éléments discrets en révélant l'effet de continuum apparaissant dans ces structures. Cependant quelques questions restent en suspens :

- Est-ce que les moyennes obtenues à partir des expériences d'optomagnétocytométrie sont représentatives des comportements individuels ?
- Qu'en est-il de la prévision du rôle de certains mécanismes actifs tels que la polymérisation du cytosquelette, l'activité des moteurs moléculaires ou encore le remodelage dynamique des connections inter-filamenteuses ?

Cette analogie est donc attirante mais très formelle au sens où elle n'explique pas les mécanismes fondamentaux sur lesquels la réponse mécanique du cytosquelette s'appuie.

5. Tableau récapitulatif des techniques utilisées pour sonder les propriétés mécaniques des cellules

Techniques	Principales caractéristiques Plage de contrainte	Avantages	Inconvénients
Magnétocytométrie [Wang & coll., 1993] [Laurent & coll., 2002]	<ul style="list-style-type: none"> - Sonde localement un ensemble de cellules adhérentes - applique un couple et une force magnétique à des billes ferromagnétiques collées spécifiquement aux cellules, la rotation moyenne des billes est mesurées - contraintes ≈ 1 à 200 Pa - dimension caractéristique : taille d'une bille autour de quelques microns 	<ul style="list-style-type: none"> - grande statistique de mesure 	<ul style="list-style-type: none"> - non commercialisée - certains facteurs sont mal définis : aire de contact bille-cellule, estimation quantitative des liens récepteurs-ligands, interaction récepteur-structure sub-cellulaire - la mesure est issue d'une moyenne sur un grand nombre de cellules
Optomagnétocytométrie [Bausch & coll., 2001] [Fabry & coll., 2001]	<ul style="list-style-type: none"> - Sonde localement une cellule adhérente - Applique un couple magnétique à une seule bille, le déplacement de celle-ci est mesuré optiquement - contraintes ≈ 1 à 200 Pa - fréquence de sollicitation : $10^{-2} < f < 10^4$ Hz - dimension caractéristique : autour de quelques microns 	<ul style="list-style-type: none"> - grande statistique car les déplacements peuvent être mesurés simultanément sur une population de cellules - permet des mesures en régime dynamique 	<ul style="list-style-type: none"> - non commercialisée - certains facteurs sont mal définis : aire de contact bille cellule, estimation quantitative des liens récepteurs-ligands, interaction récepteur-structure sub-cellulaire

<p>Micropipette [Evans & coll. , 1989] [Sato & coll., 1987] [Thoumine & coll., 1997] [Thoumine & coll., 1999] [Yeung & coll., 1989] [Zhelev & coll., 1994]</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Sonde une cellule entière non adhérente - Déforme la cellule lors de l'aspiration dans la micropipette calibrée en taille (quelques microns de diamètre) - Force constante réglable de 1pN à 100nN - contrainte : $0.1 < \sigma < 10^5 \text{Pa}$ - Accès à la fonction de fluage 	<ul style="list-style-type: none"> - facile à mettre en place 	<ul style="list-style-type: none"> - contraintes aspécifiques - mauvaise résolution spatiale
<p>Microscopie à force atomique [Mahaffy & coll., 2004] [Goldmann & coll., 1996]. [Alcaraz & coll., 2003] [Janmey & coll., 1991] [Janmey, 1991] [Mahaffy & coll., 2004] [Radmacher & coll, 1992] [Radmacher & coll.,1996] [Shroff & coll., 1995] [Weissenhorn & coll., 1993]</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Sonde localement une cellule adhérente - Applique une force à la surface de la cellule - Etude en régime variable $50 < f < 300 \text{ Hz}$ - taille caractéristique de la pointe d'AFM : $10 < \text{rayon} < 50 \text{ nm}$ - gamme de force : $1 \text{pN} < F < \text{qq centaines de nN}$ - applique des contraintes jusqu'à 10^9Pa 	<ul style="list-style-type: none"> - Peut appliquer ou non des forces <i>via</i> des récepteurs spécifiques - grande résolution spatiale et en force - commercialisée 	<ul style="list-style-type: none"> - Contraintes très importantes - Applique des contraintes à une géométrie proche de la taille des éléments du cytosquelette
<p>Microaiguilles [Riveline & coll., 2001]</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Sonde localement une cellule adhérente - une microaiguille de verre flexible est utilisée pour déformer localement une cellule - Gamme de contraintes $10^{-11} < C < 10^{-9} \text{ N}/\mu\text{m}^2$ 		<ul style="list-style-type: none"> - Mauvaise résolution en force - non commercialisée

<p>Pinces optiques [Balland & coll., 2005] [Lambert & coll., 2000] [Henon & coll., 1999] [Laurent & coll., 2002] [Sako & coll., 1998] [Sheetz, 1990] [Svoboda & coll., 1994]</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Sonde localement une cellule adhérente - Applique une force optique à une bille collée spécifiquement à une cellule, le déplacement de la bille est suivi soit optiquement soit par un système de photodiodes - Force appliquée $\approx 100\text{pN}$ - taille caractéristique de sonde : quelques microns - $0.05 < f < \approx 100\text{Hz}$ 	<ul style="list-style-type: none"> - Grande résolution en force - permet un étude en régime statique ou dynamique 	<ul style="list-style-type: none"> - Non commercialisée - Utilisable uniquement avec des billes traitées pour un collage spécifique - certains facteurs sont mal définis : estimation quantitative des liens récepteurs-ligands, interaction récepteur-structure sub-cellulaire
<p>Microplaques [Desprat & coll., 2005] [Thoumine & coll., 1997] [Thoumine & coll., 1999]</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Sonde globalement une cellule adhérente - une cellule est tenue entre deux microplaques de verre (une rigide, une souple calibrée en raideur), la déformation est suivi optiquement par la déflexion de la lamelle souple - Force de 1 à 10 nN - dimension caractéristique : quelques μm 	<ul style="list-style-type: none"> - Accès directe à la réponse de fluage 	<ul style="list-style-type: none"> - Non commercialisée - grande force appliquée

D. Conclusion et objectifs de la thèse

Les cellules vivantes sont capables de « sentir » leur environnement mécanique et de s'y adapter par des réponses biologiques appropriées. Similairement, des signaux biologiques, ou biochimiques peuvent influencer de façon non négligeable l'aptitude d'une cellule à générer des forces nécessaires à l'accomplissement d'un certain nombre de tâches. Il est alors paru rapidement nécessaire de développer des techniques permettant de caractériser le comportement mécanique des cellules. Ces techniques ont tout d'abord permis de mesurer les propriétés viscoélastiques des cellules. On peut faire quelques remarques sur la valeurs des paramètres viscoélastiques obtenus avec les différentes techniques et sur le fait que les contraintes appliquées se fassent par des sondes ayant un lien spécifique ou non avec le cytosquelette. Il est très largement reconnu aujourd'hui que le fait d'appliquer une contrainte *via* les intégrines [Ingber, 2003] permet d'avoir un lien direct avec le cytosquelette d'actine par formation de complexes adhésifs. Les techniques n'utilisant pas de sondes spécifiques permettent quant à elles de ne pas discriminer les réponses individuelles de sous ensemble cellulaire. La conséquence de cette différence de spécificité serait que les techniques utilisant des sondes aspécifiques seraient plus à même de sonder les propriétés passives [Dong & coll., 1991][Tsai & coll., 1993] de la cellule alors que les techniques spécifiques permettraient d'induire des réponses biologiques dirigées [Meyer & coll., 2000], comme celle de formation de complexe adhésif par exemple [Riveline & coll., 2001]. En ce qui concerne les mesures de module d'Young, il a été mis en lumière récemment que les valeurs de rigidité obtenues étaient très dispersées [Maksym & coll., 2000][Danowski & coll., 1992]. Les ordres de grandeurs trouvés varient entre 10^0 et 10^5 Pa.

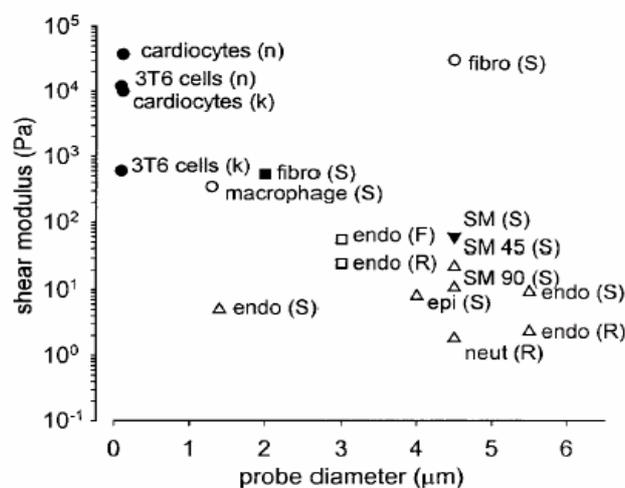


Figure 1.18 : Influence de la taille de la sonde sur les mesures des propriétés élastiques de cytosquelette pour différents types cellulaires, [Maksym et coll., 2000].

On peut expliquer cette dispersion par de nombreux facteurs donnés par la nature des différents systèmes expérimentaux (actif, passif [Dong & coll. , 1991], amplitude de la contrainte), les conditions de mesures, les modèles utilisés et enfin les différents types cellulaires utilisés. Une forte dépendance avec la taille de la sonde a été suggérée [Maksym & coll., 2000][Lu & coll., 2002]. Ceci pourrait expliquer par exemple les différences de mesures entre la magnétocytométrie et l'AFM pour lesquels les surfaces de contact sonde-cellule sont respectivement de $10 \mu\text{m}^2$ et $10^{-2} \mu\text{m}^2$ et donc les gammes de contraintes sont très différentes [Goldmann & coll., 1996][Janmey & coll., 1991][Janmey, 1991][Radmacher & coll., 1992][Radmacher & coll., 1996][Shroff & coll., 1995]. Pour des tailles de sondes et de contraintes comparables des équipes ont montré que les valeurs de rigidité trouvées sont comparables. En outre il existerait un effet non linéaire de rigidification de la cellule avec la contrainte. En effet la valeur de rigidité augmente avec l'amplitude de la contrainte ou de la déformation [Wang & coll., 1993][Stamenovic & coll., 1999]. Si l'on regarde les valeurs de rigidité trouvées en magnétocytométrie, le module d'Young est de l'ordre de 10^1Pa pour des contraintes exercées avoisinant la dizaine de pascals. Dans le cas des expériences de microscopie à force atomique les contraintes se situent autour du méga pascal pour des rigidités allant de 10^3 à 10^5Pa . Ces dispersions [Schmidt & coll., 2000] ont également encouragé les chercheurs à se pencher sur des systèmes modèles plus simples tels que les gels d'actine *in vitro* [Amblard & coll., 1996][Gardel & coll., 2003][Mahaffy & coll., 2004][Mason & coll., 2000][Morse, 1998][Palmer & coll., 1999]. Il ressort de ces mesures que le comportement mécanique de l'actine est caractérisé par un continuum de temps de relaxation et que sa réponse à la déformation varie comme une loi puissance de la fréquence. Dans le cas du milieu cellulaire, on retrouve expérimentalement les caractéristiques de désordre et de métastabilité décrits par des modèles comportementaux tels que ceux de matériaux vitreux mous [Lequeux & coll., 2001] ou ceux de réseaux de polymères enchevêtrés [O'Shaughnessy & coll., 2003]. En effet la dynamique de polymérisation/dépolymérisation de l'actine, la rupture/création de liens inter-filaments, l'activité des moteurs et les transitions possibles par apport d'énergie biologique sont autant de facteurs permettant une analogie séduisante avec ce type de modèles. Tous ces processus ayant des temps caractéristiques très variables nous orientent vers une étude mécanique en régime dynamique du réseau cellulaire d'actine.

Comme nous l'avons vu, l'étude des propriétés mécaniques du réseau d'actine cellulaire se révèle être un problème complexe. Bien que les premières études datent de quelques dizaines d'années, de nombreuses questions restent en suspens. Une de ces questions est la mesure des propriétés individuelle des cellules *via* des sondes spécifiques locales en régime

dynamique. Peut-on caractériser cette réponse ? Les moyennes obtenues par les expériences d'optomagnétocytométrie ne masquent-elles pas des comportements individuels ? Il est nécessaire pour cela de réaliser des mesures de module complexe sur des cellules individuelles et de les comparer à des mesures globales, ou sur des ensembles cellulaires. Ceci est un des objectifs de cette thèse. Peut-on observer s'il existe une dépendance de la réponse en fonction du type cellulaire étudié ? C'est la deuxième question que pose ce manuscrit. Est-il possible également, avec ce type de mesures, de caractériser l'influence d'éléments protéiques dans la réponse mécanique cellulaire ? (telle que l'activité des moteurs moléculaires par exemple ou d'autres facteurs biochimiques influençant la dynamique de polymérisation de l'actine). L'objectif de cette thèse est donc de tenter de relier les modèles comportementaux et les modèles structuraux, par une caractérisation en fréquence du comportement viscoélastique du cytosquelette. En outre, on s'est intéressé au lien entre la réponse mécanique du cytosquelette en conditions « physiologiques » et sa réponse dans des conditions biologiques perturbées afin d'extraire les mécanismes élémentaires participant au comportement mécanique à l'échelle d'une cellule. Pour cela nous avons par exemple étudié le rôle de la polymérisation de l'actine et de l'activité des myosines II dans cette réponse.

II. Principe et mise en oeuvre des pinces optiques

A. Introduction

La lumière exerce sur les objets une force qui a pour origine l'échange d'impulsion. Dès le XVII^{ème} siècle, l'astronome Johannes Kepler avait déduit que le soleil exerce une pression sur les particules échappées d'une comète leur donnant ainsi leur orientation. Ceci est une des rares manifestations macroscopiques de cet effet. En 1873, James Clerk Maxwell démontre, d'un point de vue fondamental la possibilité de nucléation de forces par la lumière. Mais il a fallu attendre l'avènement du laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation), source de lumière cohérente, intense et monochromatique, pour envisager l'application expérimentale de cette force à des objets de taille microscopique.

Dans les années 1970, Arthur Ashkin a mis en évidence, en focalisant fortement un faisceau laser, les déviations d'une bille éclairée par celui ci [Ashkin, 1997]. Il a en effet pu déplacer et faire léviter des particules de quelques microns de diamètre. Ces recherches sont à la base du piégeage et du refroidissement d'atomes, ainsi que du développement des pinces optiques [Ashkin, 1991][Lang & coll., 2002][Lang & coll., 2003].

Nous voulons étudier les propriétés mécaniques du cytosquelette de cellules eucaryotes. Il est nécessaire pour ce faire d'utiliser une sonde micronique (taille cellulaire) nous permettant d'exercer des contraintes calibrées de faible amplitude. Typiquement, nous nous attendons à mesurer des modules d'Young de l'ordre de quelques Pa pour une taille de sonde micrométrique [Lu & coll., 2002], il faut donc choisir un micromanipulateur ayant une constante de raideur du même ordre de grandeur (pN/ μm). Fonction de la puissance du faisceau laser, les pinces optiques exercent des forces allant de quelques piconewtons à quelques centaines de piconewtons ; la taille des objets piégeables varie de 300 nm à 10 μm . Cette gamme de force est donc bien adaptée à l'étude micromécanique des cellules et à la manipulation d'ensembles macromoléculaires biologiques [Sheetz, 1990].

Ce chapitre présente tout d'abord le principe général du piégeage optique. Le dispositif expérimental ainsi que le choix des différents éléments seront ensuite discutés. Nous

présenterons dans la dernière partie les méthodes d'étalonnage permettant de mesurer la force exercée par une pince sur une bille micrométrique.

Ce chapitre s'appuie sur les descriptions expérimentales détaillées du livre *Laser Tweezers in cell biology*, sur l'article de Svoboda & Block [**Svoboda & coll., 1994**] et sur la thèse de G. Lenormand [<http://guillaume.lenormand.free.fr/pdf/these.pdf>].

B. Principe des pinces optiques

Le concept des pinces optiques à gradient est simple : une pince optique est obtenue en focalisant fortement un faisceau laser à profil d'intensité gaussien, au moyen d'un objectif de microscope de grande ouverture numérique. Le gradient d'intensité lumineuse obtenu crée ainsi des gradients de champs électriques dont dérivent des forces de la forme :

$$\vec{F} \approx \vec{\nabla} I$$

Un objet diélectrique placé dans ce champ électrique va d'abord se polariser puis subir une force d'attraction due à ces forces de gradient qui vont le piéger de manière stable au point de plus forte intensité du champ. Or, le profil radial du faisceau laser étant gaussien [figure 2.1], l'intensité lumineuse dans un plan radial est maximale sur l'axe du faisceau. L'intensité maximale se trouvera donc au point de focalisation du faisceau, c'est donc en ce point que les forces de gradient vont tendre à ramener les particules diélectriques.

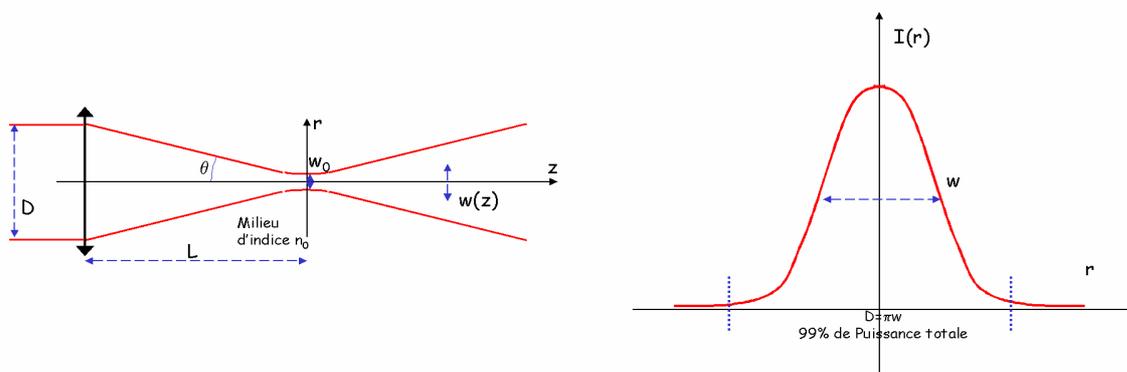


Figure 2.1 : a) Profil axial du faisceau focalisé par une lentille convergente
b) Intensité d'un faisceau gaussien en fonction de la position radiale.

Le profil radial du faisceau, pour le mode fondamental d'émission du laser (TEM₀₀), est gaussien, ce qui crée le confinement dans le plan perpendiculaire au faisceau. Dans la troisième dimension, la largeur du faisceau gaussien varie le long de l'axe [figure 2.1] et elle est minimum au point de focalisation. C'est là que les objets viendront se piéger.

Plus précisément, l'intensité lumineuse sur l'axe du faisceau est donnée par la relation suivante :

$$I(r, z) = \frac{2P_{\infty}}{\pi w(z)^2} \exp\left[-\frac{2r^2}{w(z)^2}\right]$$

$$\text{avec } w(z) = w(0) \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_0}\right)^2} \text{ et } z_0 = \frac{\pi w_0^2 n_{\text{milieu}}}{\lambda}$$

Où : P_{∞} : puissance totale du laser,

λ : longueur d'onde du laser,

n_{milieu} : indice optique du milieu,

w_0 : largeur de la tache de diffraction au point de convergence. Celle-ci est fonction de l'ouverture numérique ON de l'objectif :

$$w_0 = 1.22 \frac{\lambda}{2ON}$$

L'ouverture numérique est définie par : $ON = n_{\text{milieu}} \sin \theta$ où θ est le demi-angle du cône émergent.

1. Forces de gradients vs forces de pression de radiation

Il y a deux types de forces radiatives qui entrent en compétition dans la réalisation d'une pince optique [figure 2.2].

La première est la force de gradient, due au gradient d'intensité lumineuse au voisinage du point focal. Celle-ci tend à amener la particule à piéger dans la région de plus haute intensité lumineuse.

La seconde est due à la pression de radiation [Lebedev, 1901] qui, selon l'axe de propagation du faisceau, tend à pousser la particule hors du piège.

Est-il alors possible, en tenant compte de ces considérations, de créer un piège optique stable ?

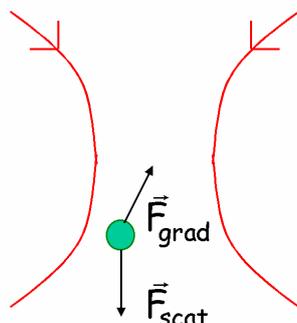


Figure 2.2 : Représentation schématique des contributions respectives des forces de gradient et des forces de pression de radiation

Pour répondre à cette question nous considérerons deux cas limites suivant la taille de l'objet piégé. Ces deux cas dépendent du rapport de taille entre le rayon r de la particule et la longueur d'onde λ du faisceau.

Le premier cas où $d = 2r \ll \lambda$ est appelé régime de Rayleigh ; dans ce cas le champ électrique est considéré comme uniforme autour de la particule. Ainsi le calcul de force s'exerçant sur l'objet piégé est calculable analytiquement par une description électromagnétique [Feynman, 2000][Pérez & coll., 1990].

Le deuxième cas où $d = 2r \gg \lambda$ est appelé régime de Mie ; dans ce cas il est possible pour décrire les forces appliquées à des particules de grande taille d'adopter un raisonnement d'optique géométrique.

En pratique, pour des particules de taille intermédiaire ($d \approx \lambda$), la connaissance des forces appliquées ne peut être obtenue analytiquement et doit donc faire l'objet, pour des expériences quantitatives, d'un étalonnage.

a) Description électromagnétique, Régime de Rayleigh ($2r \ll \lambda$)

Dans ce régime, il est raisonnable d'opter pour une description électromagnétique. En effet, la particule ayant des dimensions très inférieures à λ , le champ électrique est constant sur la

taille de la particule. Celle-ci acquiert un moment dipolaire induit \vec{p} . La particule est alors considérée comme un dipôle induit ponctuel. Son moment est donné par la relation suivante qui définit la polarisabilité α :

$$\vec{p} = \alpha \vec{E}$$

pour une sphère de rayon r on peut montrer que

$$\alpha = 4\pi\epsilon_0 n_{milieu}^2 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) r^3$$

Où

\vec{E} le champ électrique,

n_{milieu} l'indice optique du milieu environnant la particule,

ϵ_0 la permittivité diélectrique du vide,

$m = \frac{n}{n_{milieu}}$, où n est l'indice de la particule

r est le rayon de la particule piégée.

Il est à noter que la polarisabilité α de la bille est proportionnelle à la différence des carrés des indices de réfraction entre la bille et le milieu environnant (ici l'eau, $n_{milieu} = 1.3$).

(1) Force de gradient

La force de gradient \vec{F}_g qui s'exerce sur la bille est donnée par :

$$\vec{F}_g = (\vec{p} \cdot \vec{\nabla}) \vec{E} \approx \alpha \vec{\nabla} E^2 \propto \alpha \vec{\nabla} I$$

où $I = \frac{1}{2} \epsilon_0 n_{milieu}^2 c E^2$, c étant la célérité de la lumière dans le vide

Cette expression montre que i) la force de gradient est orientée dans le sens du gradient, et que le ii) le piégeage n'est possible que si m est supérieur à 1, autrement dit que si l'indice de la particule est supérieur à celui du milieu environnant.

Cette expression explique également l'origine du piégeage et montre que la particule diélectrique est attirée vers le point de plus forte intensité lumineuse, à savoir le point de focalisation du laser.

(2) Force de pression de radiation

La force due à la pression de radiation \vec{F}_{pr} est donnée par la relation suivante :

$$\vec{F}_{pr} = \frac{c}{n_{milieu}} P_{pr} \vec{u}$$

Cette force est dirigée axialement selon un vecteur unitaire \vec{u} donnant le sens de propagation de la lumière. Elle dépend de la puissance diffusée par la sphère P_{pr} , donnée par la relation suivante :

$$P_{pr} = \frac{\omega k^3}{12\pi\epsilon_0 n_{milieu}^2} \|\vec{p}\|^2 \text{ d'où}$$

$$\vec{F}_{pr} = \frac{128\pi^5 r^6}{3\lambda^4 c} n_{milieu} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 I \vec{u}$$

k est le nombre d'onde et ω la pulsation.

La puissance P_{pr} est donc proportionnelle à p^2 , d'où :

$$F_{pr} \propto E^2 \propto I$$

La pression de radiation dépend donc linéairement de l'intensité lumineuse et varie en $\frac{1}{\lambda^4}$.

Pour faire léviter une particule il faut donc lutter contre la pression de radiation et contre le poids apparent de la particule. Cette force de pression de radiation dirigée selon l'axe optique va entrer en compétition avec la partie axiale des forces de gradient. On peut alors séparer la force de gradient \vec{F}_g en ses deux composantes : radiale et axiale, dont nous comparerons la dernière avec la force de pression de radiation [**Lebedev, 1901**]. C'est là qu'apparaît l'importance

de l'ouverture numérique de l'objectif. Typiquement, pour créer un piège stable il faut que la force de gradient compense la force de pression de radiation (diffusion Rayleigh). Or la force de gradient \vec{F}_g dépend de la focalisation du faisceau et donc de l'ouverture numérique de l'objectif. Ceci signifie que le gradient d'intensité suivant l'axe z du faisceau doit être important. Il faut donc diminuer la largeur du faisceau au point de focalisation, d'où l'utilisation d'un objectif à grande ouverture numérique. La pression de radiation, dépend linéairement de l'intensité lumineuse et varie en $\frac{1}{\lambda^4}$. Pour limiter son effet, il est donc nécessaire d'utiliser un laser de grande longueur d'onde (proche infrarouge). Ainsi, la force de gradient suivant z peut compenser la force due à la pression de radiation en utilisant un objectif d'ouverture numérique assez grande ($ON > 1$) et un laser de grande longueur d'onde.

b) Description d'optique géométrique, régime de Mie ($2r \gg \lambda$) et cas intermédiaire

Dans le régime de Mie, le phénomène de piégeage peut être expliqué simplement à l'aide de l'optique géométrique [figure 2.3]. En effet, dans ce cas la taille de la particule est grande devant la longueur d'onde, les effets de la diffraction ne sont donc pas applicables à cette échelle. On peut interpréter les mêmes forces \vec{F}_g et \vec{F}_{pr} en considérant le faisceau comme une somme de i rayons, dont chacun transporte un moment lumineux qu'il va transférer à la sphère. Chaque rayon i transporte une impulsion p_i dont l'expression est :

$$p_i = n_i \bar{h} k$$

où n_i est le nombre de photons dans le rayon i sur un intervalle de temps dt ,

\bar{h} est la constante de Planck et k est le vecteur d'onde

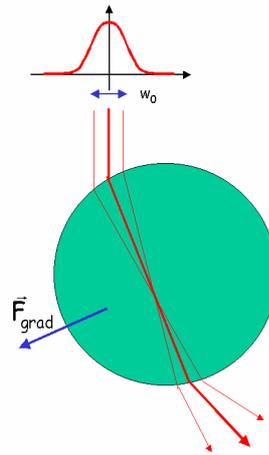


Figure 2.3 : Schéma de l'interaction d'un faisceau lumineux i avec une sphère de verre.

Lorsque le rayon traverse la sphère, il change de direction. Son moment initial P_i change après réfraction et devient P_f . Le théorème de conservation de la quantité de mouvement implique cependant la conservation du moment total du système. Lors de la réfraction le faisceau lumineux a donc transféré un moment P_s à la sphère :

$$P_s = -\Delta P \text{ où } \Delta P = P_f - P_i$$

On peut ainsi calculer la force totale exercée par un faisceau incident en sommant les contributions dues aux réflexions et réfractions successives sur la particule diélectrique.

Voyons à présent de façon qualitative ce qui se passe lorsque la particule est sur l'axe du laser et lorsqu'elle est décalée, en considérant les trajets de deux faisceaux différents.

Dans le cas centré, c'est à dire le cas où les deux rayons sont symétriques par rapport à l'axe, les composantes radiales des deux moments initiaux se compensent et le piège est stable dans cette direction. Cependant l'impulsion due à la pression de radiation le décale légèrement vers le bas.

En revanche, si la sphère est décalée par rapport à l'axe, le rayon le plus intense transmet un moment plus grand à la sphère. Ce moment tend alors à ramener la sphère vers l'axe, où l'intensité est maximale et où le piège est stable.

Un résumé de cette explication est présenté sur le schéma suivant [figure 2.4].

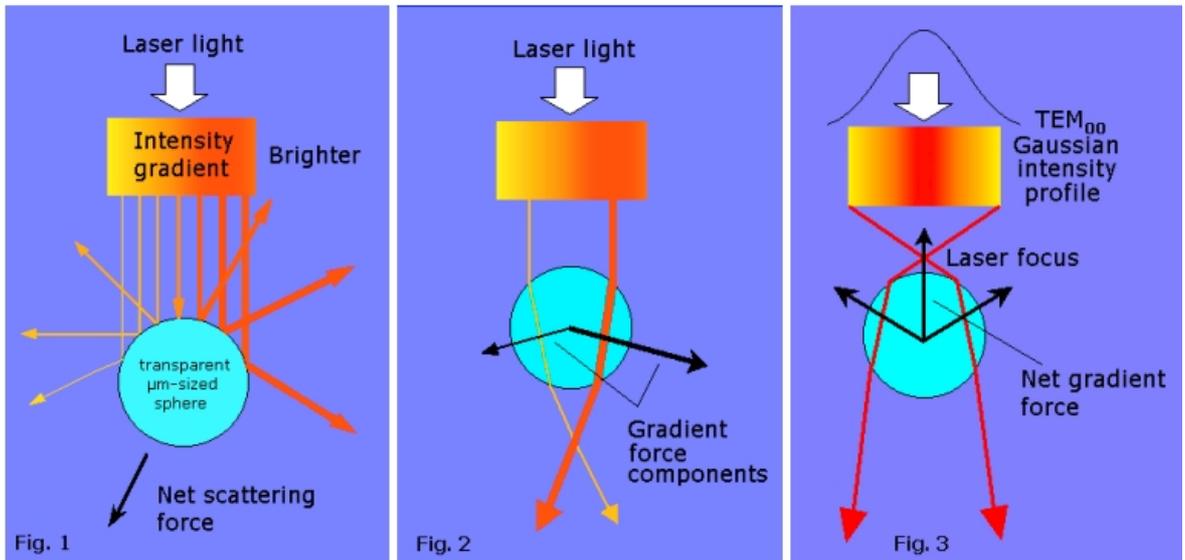


Figure 2.4 : Schéma des résultantes des forces radiatives
 1) force de pression de radiation 2) force de gradient radiale
 3) Force de gradient axial.

Il existe également un cas intermédiaire où la taille de la bille est de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde du faisceau incident (ou encore de la taille du piège), c'est à dire une particule de taille $r \approx \omega_0$. Dans le cas des expériences de biophysique effectuées par pinces optiques, les lasers utilisés ont des longueurs d'ondes avoisinant le proche infrarouge et les objets piégés sont des sphères diélectriques de silice ou de latex de taille micrométrique. Nous nous trouvons donc dans le régime de Mie intermédiaire ($d \approx \lambda$). La force de gradient s'exprime dans ce cas de la manière suivante :

$$\vec{F} = A(n_{milieu}^2 - n^2) \vec{\nabla} I$$

Dans cette expression le facteur A (dépendant entre autre de facteurs géométriques liés à l'objet piégé) est non calculable analytiquement. Pour pouvoir effectuer des mesures quantitatives il sera alors nécessaire de procéder à des étalonnages de forces.

2. Conditions de piégeage optimales

Afin de résumer les notions précédentes et pour obtenir un piégeage optimal avec les pinces optiques, il est judicieux de retenir les informations suivantes.

- Tout d'abord, il est nécessaire d'avoir une intensité de laser maximale afin d'avoir une force la plus grande possible. Il peut être très intéressant d'avoir un laser à intensité réglable de manière à explorer la plus grande gamme de forces possible.
- Tout objet diélectrique, répondant aux critères de tailles expliqués précédemment, d'indice supérieur à celui du milieu est piégeable. Il est cependant important de choisir des matériaux non ou peu absorbants en raison de problèmes éventuels d'échauffement liés à la concentration d'un grand nombre de photons sur un faible volume. On choisit alors couramment des sphères microniques de silice ou de latex ($n = 1.5$, et $n = 1.6$) que l'on utilise comme poignées pour appliquer les forces sur des objets.
- De plus, pour lutter contre les effets de la diffusion Rayleigh, l'utilisation d'un objectif de grande ouverture numérique (> 1.25) est indispensable.
- Enfin, la taille des objets piégés doit être voisine de celle de la longueur d'onde d'émission du laser créant le champ électrique.

3. Echauffement local et choix de la longueur d'onde.

Une des difficultés rencontrées lors de l'utilisation de pinces optiques en biologie est la question de l'échauffement local. Il est couramment pratiqué un greffage de molécules fonctionnelles aux microbilles afin d'étudier de manière quantitative une interaction spécifique entre deux partenaires biologiques [Lambert & coll., 2000]. Or, l'échauffement peut dénaturer les protéines ou autres ligands greffés aux billes qui deviennent ainsi infonctionnelles ou encore tout simplement élever la température du milieu dans lequel sont effectuées les expériences. La puissance nécessaire à la réalisation d'un piège et le faible volume de focalisation du faisceau sont des facteurs déterminants dans l'estimation de cette élévation de température locale. Des mesures ont été effectuées selon différentes techniques afin de mesurer les variations locales de température autour de l'objet piégé. La modification du spectre de fluorescence de cellules marquées en réponse à une irradiation continue en proche infrarouge ou encore la modification du spectre du mouvement brownien d'une bille piégée ont mené à une estimation d'échauffement

de 0.5 à 1.45K/100 mW de puissance laser. Un résultat type de mesure de spectres d'absorption est présentée ci-dessous.

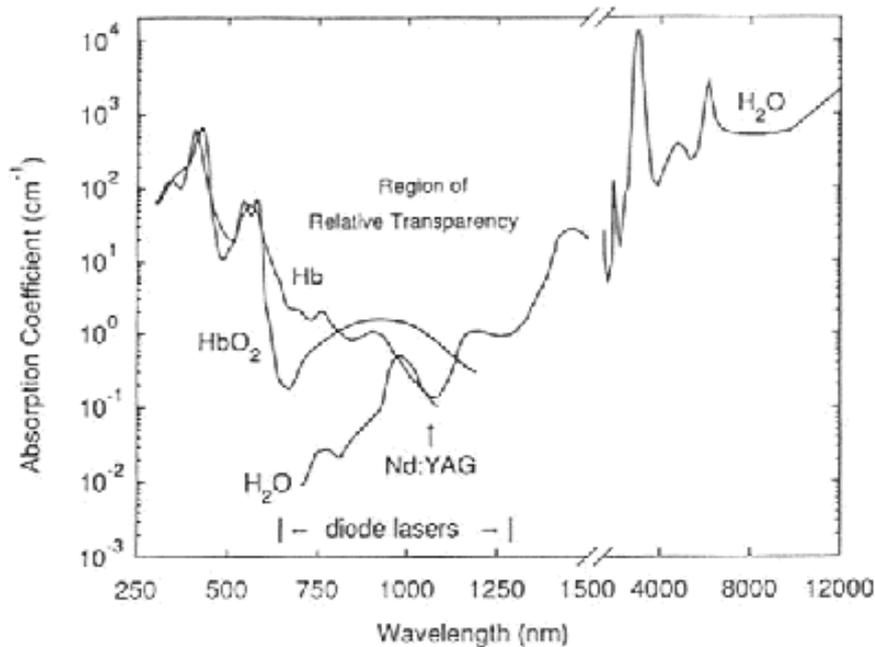


Figure 2.5 : Spectres d'absorption de différentes solutions (hémoglobine à la concentration physiologique, eau) en fonction de la longueur d'onde d'émission d'un laser. On remarque que le proche infra-rouge est un bon compromis pour minimiser l'absorption par le milieu biologique et l'eau [Svoboda & coll., 1994]

On peut cependant estimer par un rapide calcul, l'échauffement autour du point focal d'un laser dans l'eau, grâce à l'équation de diffusion de la chaleur :

$$K \nabla^2 T + C \frac{\partial T}{\partial t} = \text{terme de source locale}$$

Cette équation devient en régime permanent, pour une géométrie confinée [figure 2.6] (taille D) et pour une source de lumière, irradiant dans une géométrie d'angle solide de 2π radians :

$$K \nabla^2 T = \frac{\alpha P}{2\pi r^2}$$

Où P : puissance totale

K : conductivité thermique du milieu

α : coefficient d'absorption du milieu

$K = 0.6 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$; $\alpha = 14 \text{ m}^{-1}$ pour l'eau à 1064 nm

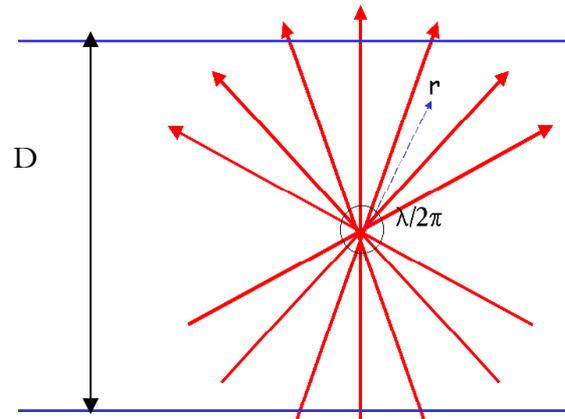


Figure 2.6 : Schéma d'une source de lumière irradiant dans une géométrie confinée d'angle solide 2π radians

En intégrant cette équation pour un objet irradiant de taille minimale de l'ordre de $r = \frac{\lambda}{2\pi}$ on obtient la relation suivante :

$$T(r) - T(\infty) = \frac{\alpha P}{2\pi K} \ln\left(\frac{D}{r}\right)$$

$$\text{soit } \frac{\Delta T}{P} = \frac{T(\lambda) - T(\infty)}{P} = \frac{\alpha}{2\pi K} \ln\left(\frac{2\pi D}{\lambda}\right)$$

On peut faire l'application numérique dans l'eau, pour une géométrie de taille $D = 10\mu\text{m}$ avec un laser émettant à 1064 nm :

$$\frac{\Delta T}{P} \approx 1.4\text{K}/100 \text{ mW}$$

Il sera donc nécessaire au regard de l'estimation d'élévation de température de travailler pour nos expériences de pinces optiques dans un milieu pour lequel α est le plus petit possible et K le plus grand possible.

C. Dispositif expérimental et outils biologiques

Dans un premier temps, nous allons décrire le dispositif expérimental [figure 2.7] et, dans un deuxième temps, les outils biologiques mis en place pour effectuer nos expériences.

Les pinces optiques sont construites autour d'un microscope Leica inversé. La plateforme peut être divisée en deux parties : les éléments réalisant le piège et la partie acquisition/visualisation.

1. Schéma du montage

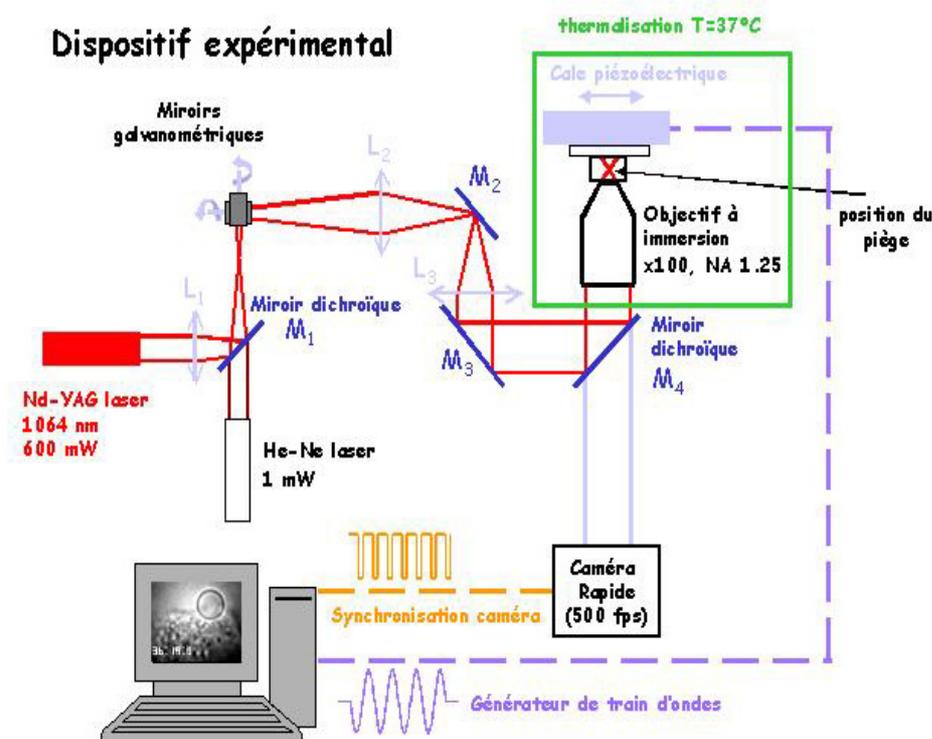


Figure 2.7 : Pinces optiques : dispositif expérimental.

Un miroir (M_1) permet de superposer les deux faisceaux lasers (le laser de piégeage, infrarouge et le laser visible, d'alignement), qui sont ensuite guidés vers le microscope par les miroirs M_2 et M_3 suivants. La première lentille convergente, L_1 , de focale 250 mm, permet de limiter la divergence du faisceau. Les deux autres, L_2 et L_3 , de focales respectives 200 et 500 mm, sont placées de façon à ajuster le diamètre du faisceau à celui de la pupille d'entrée de l'objectif, et à réaliser l'image des miroirs galvanométriques (système de déflection du faisceau) sur cette pupille

d'entrée. Ainsi, quand on bouge les miroirs galvanométriques, la tache laser image sur la pupille ne sort pas de l'entrée de l'objectif. On peut également observer sur ce schéma la présence d'une cale piézoélectrique permettant de déplacer de manière contrôlée la position de la chambre expérimentale. Enfin, le système d'acquisition de données est un ordinateur équipé de cartes d'acquisitions vidéo et électronique. Nous commentons les rôles et choix de ces différents éléments dans le paragraphe suivant.

2. Description des différents éléments

a) Les éléments de piégeage

Les lasers

Pour le piégeage, on utilise un laser infrarouge continu Nd :YAG (modèle R2-E-106C, Spectra Physics). Ce laser a une longueur d'onde d'émission de 1064 nm, il émet un faisceau à profil radial gaussien dans le mode fondamental TEM₀₀. Sa puissance en émission est ajustable de 50 à 621 mW et la divergence du faisceau est estimée à $\Delta\theta \approx 2.10^{-3}$ rad. Rappelons qu'un des intérêts de l'utilisation d'un laser infrarouge vient du fait que les matériaux biologiques ont en général une faible absorption dans le proche infrarouge, l'échauffement est donc minimisé. Dans sa présentation, il s'agit d'un laser à deux étages. Des diodes lasers font office de pompe (1^{er} étage) puis une fibre optique guide la lumière pour exciter le cristal Nd :YAG (neodymium – yttrium aluminum garnet) qui réémet par inversion de population des photons à 1064 nm. La puissance de pompe varie entre 0 et 2 watts. Le choix du laser prend en compte sa puissance et les qualités du faisceau. La puissance du laser nous permet d'obtenir des forces (*cf.* étalonnage des forces) allant jusqu'à plusieurs centaines de piconewtons.

On utilise également un laser rouge Hélium-Néon. Le faisceau du laser de piégeage n'étant pas visible, afin d'effectuer les alignements on superpose optiquement au laser infrarouge le faisceau rouge de manière à effectuer les réglages optiques et à pouvoir visualiser la position « virtuelle » du piège à l'écran de contrôle. Ce laser délivre une puissance d'environ 1 mW de manière à ne pas interagir avec le matériel biologique et il est éteint au cours des expériences pour ne pas parasiter l'acquisition vidéo.

b) Le système de déflexion du faisceau

On utilise des microbilles comme poignées à l'aide des pinces optiques, pour exercer une force il est cependant nécessaire de déplacer le piège, donc la position du faisceau. Il existe

différents moyens de contrôler la position du faisceau laser et donc la position du piège. Dans le cas de manipulations nécessitant des pièges multiples, on utilise un seul laser, dont le point de focalisation doit changer de position assez rapidement pour créer plusieurs pièges. Pour cela on utilise couramment des modulateurs acousto-optiques en raison de leur efficacité en fréquence. Néanmoins ce type de déflecteurs entraîne une perte non négligeable de puissance. L'équipe a donc opté pour l'utilisation de miroirs galvanométriques (modèle 6800 HP, Cambridge Technology). Les deux miroirs, d'axes perpendiculaires l'un de l'autre, permettent de contrôler la position du faisceau dans le plan xy de focalisation jusqu'à des fréquences de l'ordre de la centaine de hertz. Ils sont montés sur des moteurs dont la tension est réglée par deux générateurs indépendants. L'utilisation d'un piège unique ne nécessite pas d'exigence particulière en matière de fréquence. Ce montage nous permet de conserver le maximum de puissance, et donc le maximum de force pour nos expériences.

c) Déplacement mécanique : la plate-forme piézoélectrique

Pour exercer une force, on peut également choisir de laisser le piège fixe et déplacer l'objet étudié. Cela peut être réalisé en utilisant une côle piézoélectrique fixée sur la platine du microscope [Gittes & coll., 1998]. Une cale piézoélectrique (E622-LR, Physik Instrumente), permettant des déplacements sub-micrométriques contrôlés en amplitude et en fréquence, a été fixée sur la platine du microscope et permet de recevoir un porte échantillon.

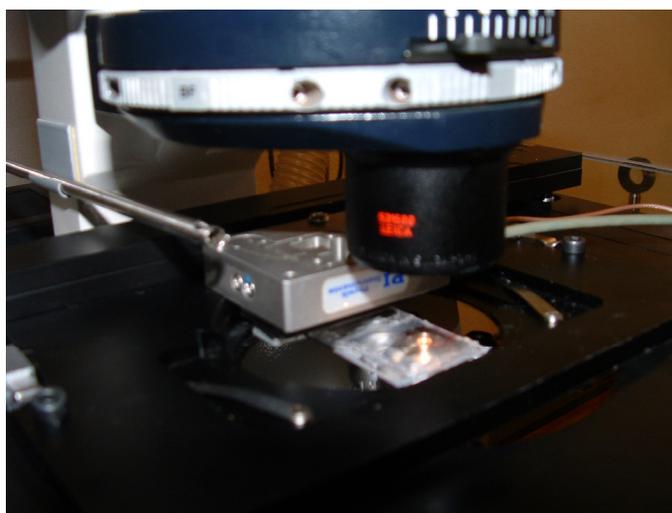


Figure 2.8 : Cale piézoélectrique fixée sur la platine du microscope inversé

d) Les éléments du trajet optique

L'utilisation du miroir dichroïque M1 (dit miroirs « chaud ») permet la superposition des deux faisceaux lasers. Ce type de miroir laisse passer la lumière du spectre visible mais réfléchit l'infrarouge. Ainsi le miroir M1 permet la superposition du laser d'alignement et de celui de piégeage. Les miroirs M2 et M3 dévient les deux faisceaux alors que le dichroïque d'entrée du microscope M4 réfléchit la totalité de l'infrarouge mais permet la transmission totale du faisceau visible d'éclairage vers les oculaires ou la caméra.

La lentille L1, convergente de focale +250 mm, réduit la divergence du faisceau. Le télescope constitué des deux lentille L₂ et L₃, (convergentes de focales respectives $f = +200$ mm et $f = 500$ mm) a deux rôles. Il permet premièrement, d'ajuster le diamètre du faisceau à la pupille d'entrée du microscope, ce qui nous fait profiter au maximum de l'ouverture numérique de l'objectif. Ainsi, on maximise le gradient d'intensité lors de la focalisation du faisceau. Deuxièmement, ce télescope sert à conjuguer l'image des miroirs galvanométriques avec la pupille d'entrée de l'objectif, pour que le faisceau pivote autour de ce point (et donc continue à entrer dans l'objectif lorsque l'on tourne les miroirs galvanométriques).

Enfin, un objectif à immersion est utilisé pour le piégeage et l'observation. Celui-ci a une ouverture numérique de 1.25 et un grossissement de $\times 100$. L'échantillon est observé directement en fond clair. Le nom d'objectif à immersion vient du fait que l'on utilise une huile adaptatrice (Cargille Laboratories, INC) d'indice optique $n = 1.5$ afin de supprimer les effets réfractant des interfaces verre-air entre objectif et lamelle.

e) L'interface acquisition/visualisation

Les expériences peuvent être suivies par différents systèmes vidéo. Une caméra vidéo ou une caméra numérique CCD ultra-rapide est montée sur le microscope pour les expériences de microrhéologie cellulaire. Nous avons développé une interface de programmation des pinces à l'aide du logiciel Labview. Ce programme nous permet de façon contrôlée, en amplitude et en fréquence, de déplacer la cale piézoélectrique. En effet, il est possible selon le type d'expérience choisie (étalonnage, microrhéologie en régime quasi-statique ou dynamique) d'engendrer *via* la carte de génération de signaux n'importe quel type de déplacement. Pour les expériences en régime quasi-statique, une rampe basse fréquence sera envoyée. Dans le cadre des manipulations dynamiques, une succession de trains d'ondes à différentes fréquences est réalisable. Il est à noter que cette séquence de signaux est envoyée en parallèle et de façon synchronisée avec une séquence de signaux TTL commandant la prise d'images sur la caméra ultra-rapide. Les

enregistrements sont faits sur support numérique et les images sont traitées ultérieurement grâce à un logiciel de traitement d'image, Imaq Vision Builder (National Instrument).

f) La thermalisation

Les expériences étant effectuées sur du matériel biologique, nous avons décidé de réaliser les mesures dans une enceinte contrôlée en température [figure 2.9]. Une boîte de thermalisation est fixée au microscope afin de pouvoir thermaliser les différents éléments du montage (objectif, microscope), les cellules et tout le matériel de biologie cellulaire associé (<http://www.lis.ch>). Cette régulation en température se fait sans contrôle d'atmosphère mais est ajustée à une température de $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

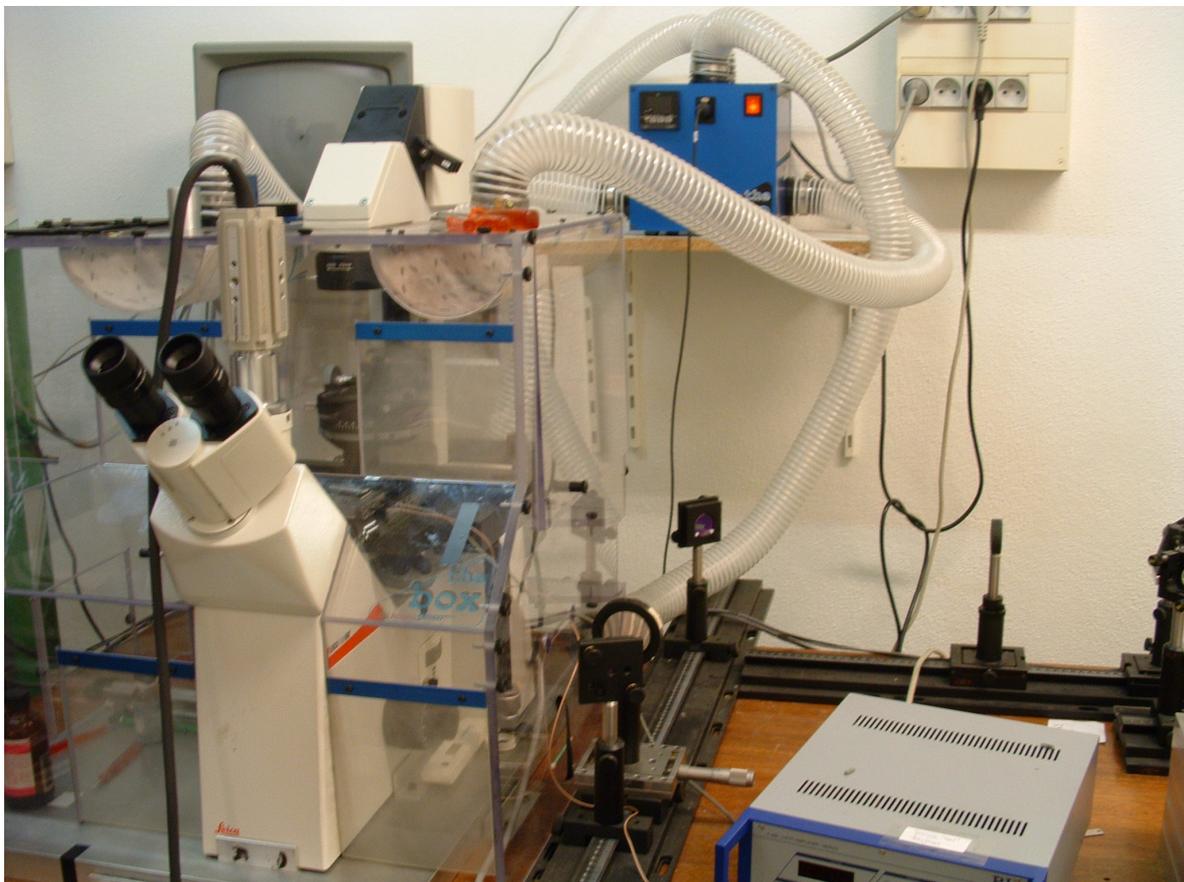


Figure 2.9 : Pinces optiques : dispositif expérimental.

D. Méthode de calibration de raideur de la pince optique.

a) Principe de l'étalonnage sur une bille de taille calibrée

Il s'agit de déterminer la force de piégeage en fonction de la position de la bille par rapport au piège [Henon & coll., 1999][Simmons & coll., 1996]. Le piège est un puits de potentiel créé lors de la focalisation, dans lequel une bille vient se piéger. Réaliser un étalonnage des forces revient à déterminer la forme de ce puits de potentiel. La force exercée par le piège sur la bille dépend de la distance r entre le centre de celle-ci et le centre du piège. On peut considérer dans une bonne approximation que le potentiel ($U(r)$) est un potentiel quadratique au voisinage du centre de la pince [figure 2.10], donc de la forme $U(r) = \frac{1}{2}kr^2$ où k est la raideur de la pince. La pince exerce alors sur la bille une force de rappel :

$$\vec{F}(r) = -\vec{\nabla}_r U(\vec{r}) = -k\vec{r}$$

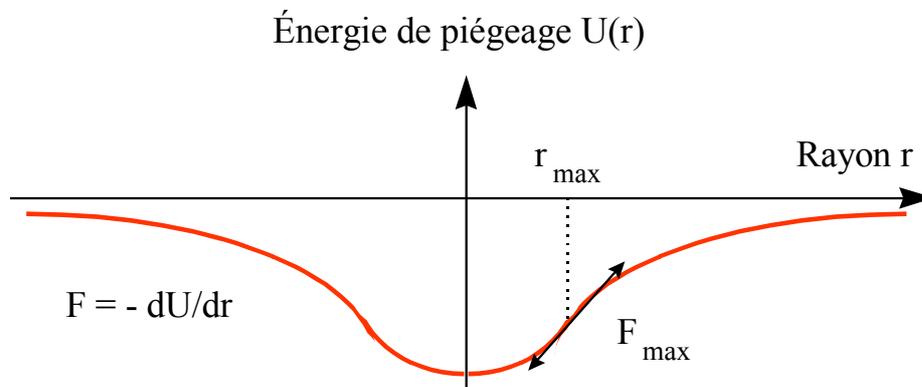


Figure 2. 10 : Energie de piégeage en fonction de la position radiale de la bille.

b) Mesure de la raideur du piège

On prépare une suspension de billes de silice (Bangs Laboratories Inc., IN USA) de $3,47 \mu\text{m}$ de diamètre à 0.025% en volume que l'on injecte dans une chambre d'observation. Celle-ci se compose d'une lame et d'une lamelle dont la distance de séparation est fixée par un film plastique d'une épaisseur calibrée de $50 \mu\text{m}$.



Figure 2.11 Cuve expérimentale

Pour l'étalonnage, on monte la cuve expérimentale sur une cale piézoélectrique. On piège alors une bille dans la pince optique et on déplace la cuve par rapport au piège à une vitesse donnée. On applique au cristal piézoélectrique un signal triangulaire d'amplitude fixée arbitrairement à $0.6 V_{\text{RMS}}$ (excursion $\approx 10 \mu\text{m}$) et de fréquence variant entre 10 et 100 Hz *via* notre interface Labview. La bille se déplace dans le champ d'observation, en adoptant alternativement deux positions d'équilibre (séparées d'une distance $2DX$) en fonction du sens de déplacement de la chambre d'observation, tout en étant retenue par le piège. On mesure alors par traitement d'image la demi-excursion que l'on notera DX .

A chaque instant, la bille est soumise à deux forces : la force de la pince (\vec{F}_{pince}) et à la force de frottement visqueux. L'équilibre entre ces deux forces décale la bille d'une distance DX du centre du piège [figure 2.12]. Le nombre de Reynolds étant petit devant 1, l'inertie est négligeable et la force de frottement visqueux est donnée par la formule de Stokes (sphère soumise à l'écoulement d'un fluide visqueux) :

$$\vec{F}_s = -6\pi\eta R\vec{V}$$

Où : η est la viscosité de l'eau pure prise à 25°C ($\eta = 0,9 \text{ mPa}\cdot\text{s}$)

R est le rayon de la bille ($R = 1,735 \mu\text{m}$)

V sa vitesse

La vitesse constante de la bille par rapport au fluide est :

$$V = 4 x_0 f$$

Où : x_0 est l'amplitude du mouvement

f la fréquence des oscillations.

A tout moment la force de piégeage est égale à la force de Stokes. Lorsque la bille échappe du piège, la force maximale est donnée par :

$$F_{\max} = 6 \pi \eta R V_{\max}$$

Nous avons mesuré comment la force de piégeage varie en fonction de la position relative de la bille par rapport au piège.

$$\text{On a donc : } \vec{F}_s = 6\pi\eta R \vec{V} = \vec{F}_{\text{pince}}(DX)$$

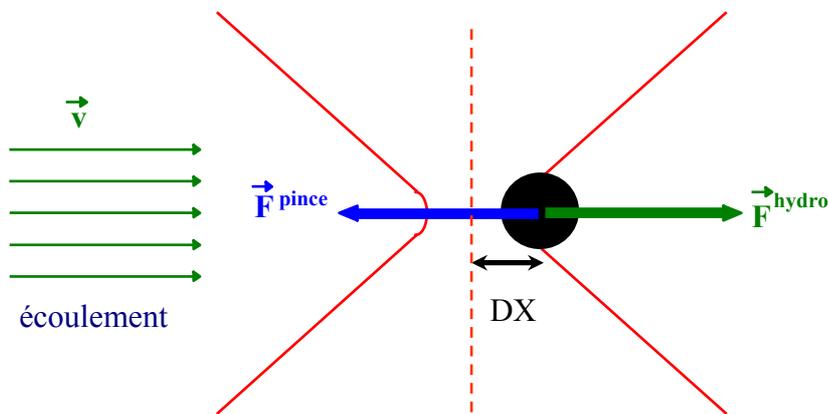


Figure 2.12 : Schéma du principe d'étalonnage

Force de Stokes près d'une paroi plane :

Dans la pratique nous faisons osciller la bille à une hauteur d'environ $5 \mu\text{m}$ (au dessus de la lamelle), à cette distance il est nécessaire d'effectuer une correction sur la force de Stokes. L'expression de la force de Stokes que nous avons donnée précédemment n'est valable que dans le cas d'un fluide infini. Aux distances bille/paroi auxquelles nous travaillons, il est nécessaire pour une plus grande précision d'y inclure un facteur correctif [Happel & coll., 1981][figure.2.13], venant de la condition de non-glissement du fluide aux parois. On ne tiendra compte ici de l'influence que d'une seule paroi amenant à la relation suivante :

$$\vec{F}_s = -6\pi\eta R \vec{V} \beta$$

$$\text{Avec : } \beta = \frac{1}{1 - \frac{9R}{16l} + \frac{1}{8}\left(\frac{R}{l}\right)^3 - \frac{45}{256}\left(\frac{R}{l}\right)^4 - \frac{1}{16}\left(\frac{R}{l}\right)^5}$$

R : rayon de la bille,

l : distance de la bille à la paroi la plus proche.

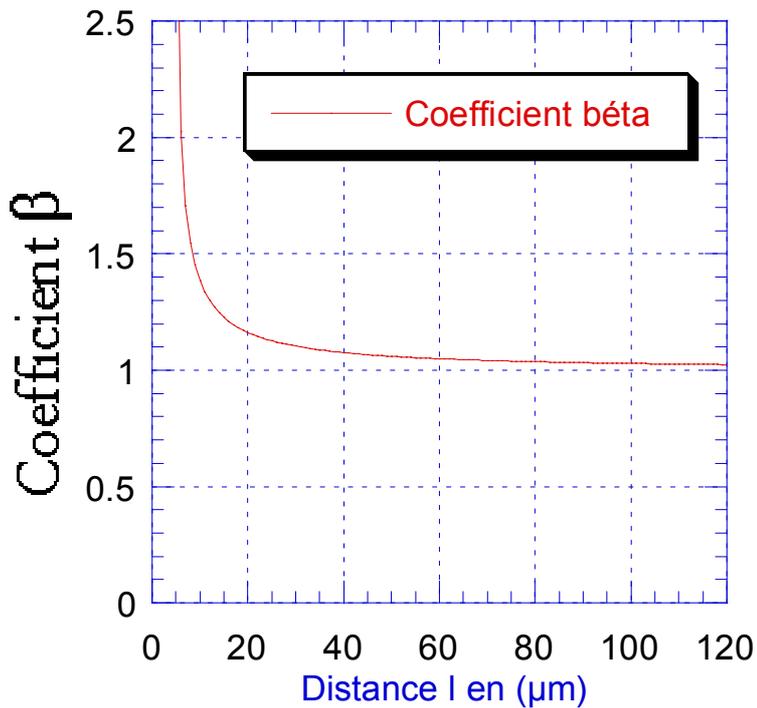


Figure 2.13 : Variation du facteur correctif de la force de Stokes pour des billes de $5 \mu\text{m}$ en fonction de la distance l de la bille à la paroi (au-delà de $50 \mu\text{m}$, la correction est inférieure à 5%, on ne considère donc l'influence que d'une seule paroi).

Pour chaque vitesse appliquée, nous mesurons la distance DX du centre de la bille au centre du piège et la force de piégeage correspondante est calculée à partir de la force de Stokes corrigée. Chaque courbe étalon est alors ajustée par un polynôme d'ordre 3 de la forme :

$$F = m_1 DX + m_2 DX^2 + m_3 DX^3$$

On obtient le type de courbes d'étalonnage suivantes [figure 2.14], mesurées en appliquant un signal triangulaire au cristal piézoélectrique et cela pour différentes puissances d'émission du laser.

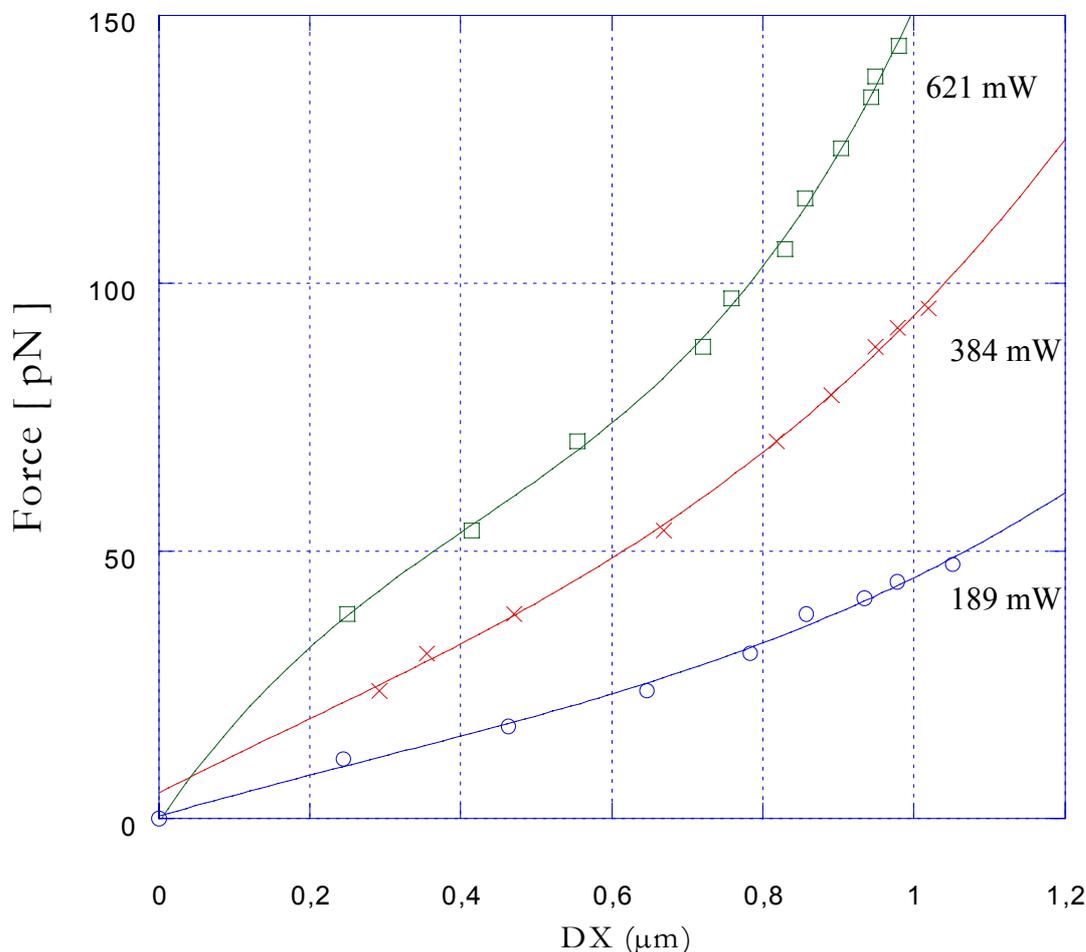


Figure 2.14 : Courbes d'étalonnage des forces de piégeage : force de piégeage en fonction de la distance DX du centre de la bille au centre du piège. Mesures effectuées à différentes puissances d'émission 189, 384, 621 mW pour des billes de $3,47 \mu\text{m}$ de diamètre à une distance de $30 \mu\text{m}$ de la lamelle.

L'ajustement polynômial nous donne, pour une puissance d'émission de 621 mW, une force maximale atteinte de l'ordre de 150 pN pour une excursion de bille légèrement supérieure au micron. En première approximation, la force appliquée par la pince est proportionnelle à la puissance du laser, comme prévu par la théorie.

Influence des dioptries : Astigmatisme

Pour évaluer l'influence du problème de stigmatisme, dû à l'interface verre-eau, au voisinage de la lamelle (qui n'est pas un dioptre parfaitement stigmatique puisqu'il est plan) nous avons procédé à une série d'étalonnages à différentes profondeurs (distance piège-lamelle).

Pour mesurer la distance entre la bille et le fond de la chambre expérimentale, on peut piéger une bille sur le fond de la microcuve. Une fois celui-ci atteint la bille va se défocaliser à son contact. C'est à partir de cette référence que l'on peut estimer la hauteur à laquelle on place ensuite la bille au moyen de la vis micrométrique réglant le déplacement en z de l'objectif. On peut mesurer celui-ci avec une précision de l'ordre du micromètre.

La figure suivante [figure 2.15] représente la variation de la force de piégeage en fonction de la distance x du centre de la bille au centre du piège pour différentes positions de la bille selon l'axe z :

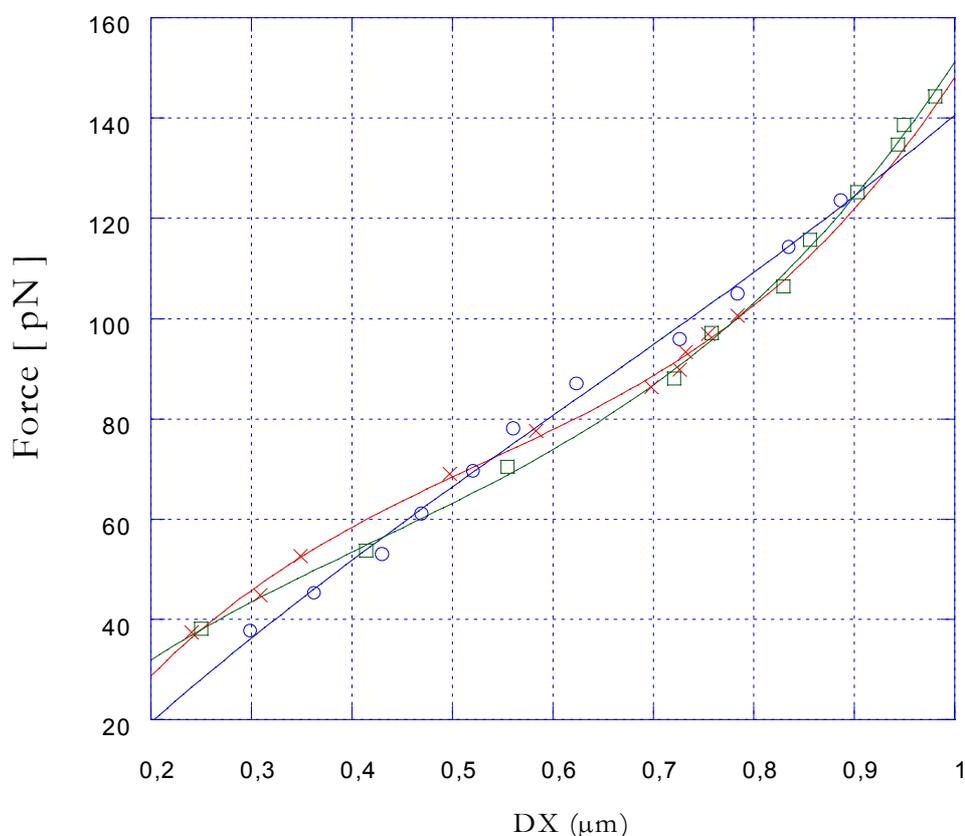


Figure 2.15: Courbes étalons des forces de piégeage en fonction de la distance DX du centre de la bille au centre du piège. Mesures effectuées à différentes profondeurs : 30(carré), 50 (rond) et 80μm (croix). Billes de 3,47 μm de diamètre, puissance d'émission de 621W, signal triangulaire.

Nous n'avons donc pas constaté d'influence notable de la profondeur (distance bille/lamelle) pour nos mesures. Le facteur correctif dans l'expression de la force de Stokes semble être suffisant pour une connaissance précise de la force appliquée.

Nous avons ensuite effectué des calculs de force/puissance en fonction de DX sur ces courbes afin de déterminer une courbe maîtresse [figure 2.16], nous donnant la relation force/distance bille-piège pour une profondeur de bille de 5 μm et différentes puissances

d'émission. Cette distance de $5\ \mu\text{m}$ a été choisie car c'est la distance moyenne qui sépare la lamelle inférieure des cellules, sur lesquelles sont collées les billes de la lamelle.

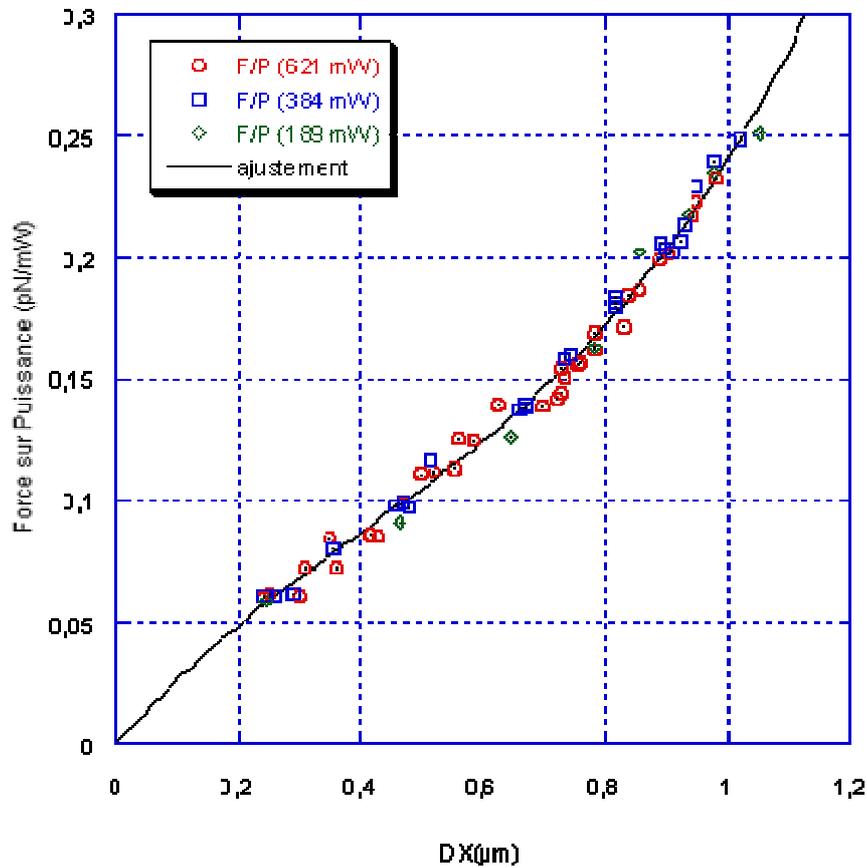


Figure 2.16 : Courbe étalon théorique obtenue après ajustement par un polynôme d'ordre 3, représentant la variation de la force de piégeage en fonction de l'écart bille-piège pour une profondeur de $5\ \mu\text{m}$

Nous avons estimé la précision sur l'intensité de la force de l'ordre de 5%. Les sources d'incertitude sont d'origine différentes. Une première dispersion vient du calibrage du diamètre des billes qui est de $\pm 0,1\ \mu\text{m}$. Une deuxième source d'erreur peut provenir d'un mauvais alignement des lasers, ou de la présence de poussière ou de tout dépôt absorbant sur les optiques. Il y a également une sensibilité à la température (*via* la viscosité). Il est donc nécessaire au début de chaque expérience de réaliser un test de force en vérifiant quelques points de la courbe d'étalonnage et de s'assurer du bon alignement des optiques. Nous avons également mesuré des courbes d'étalonnage pour différents rayons de billes $R=1,75$ et $R=2,5\ \mu\text{m}$.

E. Conclusion

Nous avons décrit dans ce chapitre le principe des pinces optiques, et la méthode utilisée pour mesurer l'intensité de la force exercée par un piège sur une bille. La gamme de force que nous pouvons balayer avec notre système s'étend de 0,1 à 240 pN pour un piège unique créé par un laser de puissance 621 mW. Nous avons également montré que la pince optique est un outil qui de part la taille de l'objet piégé, le choix de la longueur d'onde du laser et la gamme de force appliquée est tout à fait adapté à la manipulation d'objets biologiques. De plus, la possibilité de traiter spécifiquement les microbilles avec des anticorps donne toute sa versatilité au système. Cette méthode, moyennant quelques précautions, est donc peu « invasive ». Les forces appliquées sont parfaitement déterminées après un étalonnage et sont reproductibles. L'incertitude sur la force est faible (de l'ordre de quelques pour-cent), et permet donc une étude quantitative précise.

III. Modules viscoélastiques du cytosquelette d'actine cellulaire

A. Introduction

Nous présentons ici des mesures des modules viscoélastiques du cytosquelette d'actine réalisées pour la première fois par pinces optiques. Une bille de silice collée de façon spécifique à la membrane de cellules en culture (fibroblastes, myoblastes, cellules épithéliales alvéolaires) sert de poignée pour les déformer.

Il y a deux axes de travail expérimental dans ce chapitre. D'abord, en situation quasi-statique, nous mesurons simultanément la force appliquée et la déformation résultante dont nous déduisons le module d'Young (module élastique) à fréquence nulle, en prenant en compte le degré d'enfoncement de la bille dans le milieu cellulaire. La dispersion de ces modules élastiques et la statistique des mesures de temps de relaxation que nous avons effectuée montre qu'il n'existe pas un temps de relaxation unique et donc que le milieu ne peut pas être décrit par un simple modèle viscoélastique de Maxwell. Nous avons ensuite effectué, et c'est le deuxième axe de ce chapitre, une étude en régime dynamique, durant laquelle nous décrivons et analysons les mesures du module élastique G' et du module de perte cellulaire G'' en fonction de la fréquence f .

La première partie de ce chapitre expose en parallèle les protocoles de mesures utilisés pour les deux axes définis. La deuxième partie présente les outils théoriques choisis, dans le cas statique et leur extension au régime dynamique, pour la modélisation du cytosquelette cellulaire. Les résultats sont présentés et discutés dans la dernière partie. Ce travail a fait l'objet de deux publications où sont présentées, pour l'étude en régime quasi-statique, une comparaison des résultats obtenus avec les pinces optiques et avec la technique de magnétocytométrie pour la première; et l'influence de facteurs protéiques sur la dynamique du cytosquelette cellulaire pour la seconde. Ces deux publications sont annexées à la fin du manuscrit.

B. Protocoles expérimentaux et méthodes d'analyse

1. Préparation du matériel biologique

a) Culture cellulaire

Des cellules épithéliales alvéolaires humaines (lignée A549 provenant de l'American Type Culture Collection, Rockville, MD) sont cultivées dans des flasques stériles. Le milieu utilisé pour la culture est du DMEM auquel on ajoute 10% de sérum de veau fœtal, des antibiotiques et de la glutamine. Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère de 95% d'air et 5% de CO₂. Lorsque les cellules deviennent confluentes, elles sont décrochées à l'aide d'une enzyme, la trypsine EDTA, qui coupe leurs protéines d'adhésion, puis diluées etensemencées dans de nouvelles boîtes. Exactement 24 heures avant expérimentation, les cellules sont décrochées des boîtes de culture etensemencées sur des lamelles de verre. Une dilution d'environ 40 µl (fonction de la densité cellulaire avant passage) de cellules confluentes dans 5ml de milieu mis en culture pendant 24 heures nous permet d'obtenir des lamelles sur lesquelles les cellules sont parfaitement isolées les unes des autres. Ceci nous permet donc d'effectuer des expériences sur cellules uniques.

b) Préparation des lamelles

Des lamelles de verre de dimension 22×22 mm sont utilisées pour cultiver les cellules et créer la chambre expérimentale. Les lamelles sont lavées à l'éthanol 70%, puis traitées avec 5µg/ml de fibronectine pendant trois heures à température ambiante. La fibronectine est une protéine d'ancrage des cellules à la matrice extra-cellulaire, elle constitue donc une structure propice à l'adhésion des cellules.

c) Revêtement des billes par un ligand spécifique des récepteurs intégrines

Notre étude porte sur les propriétés mécaniques du cytosquelette d'actine. Afin de sonder celles-ci il est nécessaire d'utiliser une sonde permettant de déformer de manière spécifique le réseau actinique à travers la membrane plasmique [Ingber, 2003]. Or, les filaments contractiles

d'actine s'attachent à des complexes protéiques particuliers de la membrane plasmique, sur lesquels il est donc nécessaire de s'accrocher pour déformer le réseau.

Dans les cellules autres que les myocytes, la particularité d'un faisceau contractile est qu'il est focalisé vers le point de contact de la cellule avec son support (plaque d'adhérence ou contact focal) ou avec une autre cellule (jonction adhérente). La structure de ce point d'attache est complexe et fait l'objet de nombreuses études. On a déjà dénombré plus de 20 espèces protéiques dans la plaque d'adhérence ; on en identifiera probablement autant dans la jonction adhérente. Malgré leur complexité, on distingue trois parties dans ce point d'attache : des protéines trans-membranaires qui unissent la cellule à la matrice extra-cellulaire ou à une cellule voisine, des adaptateurs protéiques qui unissent ces protéines membranaires intrinsèques au faisceau contractile d'actine et le faisceau lui même.

L'extrémité des fibres tractiles s'attache aux plaques d'adhérence, sites spécialisés qui arment la face ventrale des cellules (face basale) à la matrice extra-cellulaire. A la plaque d'adhérence sont confinées les intégrines, ce sont les protéines trans-membranaires qui se fixent aux molécules de fibronectine de la matrice extra-cellulaire [figure 1.8].

Les microbilles utilisées dans cette étude sont des billes de silice de 3.47 ou 5 μm de diamètre (Bangs Laboratories) présentant un groupement carboxyl COOH à leur surface. Elles sont incubées à température ambiante pendant deux heures, sous agitation douce, en présence d'un peptide RGD (Telios pharmaceuticals, San Diego, CA), spécifique d'un des récepteur des intégrines (2 mg de billes / 0,2 mg de protéines / ml) dans un tampon phosphate à 100 mM et à pH 5, contenant de l'EDAC (1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride) à 1 mg/ml. Après plusieurs lavages dans du PBS (Phosphate Buffered Saline) pour éliminer l'excès de ligand, les billes sont remises en suspension (concentration de 1,5 mg/ml) dans du PBS contenant 1% de BSA (Bovine Serum Albumin) puis conservées à 4°C.

d) Fixation des billes sur les cellules

Les billes sont remises en suspension dans du milieu de culture contenant 1% de BSA à une concentration de 0,3 mg de billes/ml. Les cellules sont ensuite incubées en présence des microbilles pendant 30 minutes à 37°C. Plusieurs lavages de la préparation à l'aide de milieu de culture contenant 1% de BSA permettent, enfin, d'éliminer les billes non fixées.

Nous avons ensuite, en partenariat avec le laboratoire de Daniel Isabey (Inserm U492), effectué des mesures d'adhésion au microscope confocal afin de vérifier la spécificité de l'ancrage

de nos microbilles. Contrairement à la microscopie de fluorescence classique, la microscopie confocale ne récolte que la fluorescence des molécules du seul plan focal et fournit ainsi une image bien plus résolue. La projection confocale d'images est obtenue par un fin rayon laser focalisé qui, instantanément, balaie chacun des points du plan focal. L'image de ces points est enregistrée par un ordinateur et l'image finale recomposée vient de la superposition des coupes à différentes hauteurs (ici des coupes de $0,3 \mu\text{m}$) dans l'échantillon. La profondeur des coupes est donnée par un code de couleurs annexé à l'image finale [figure 3.1].

Pour cela nous avons préparé des lamelles où les cellules ont été cultivées dans les mêmes conditions que les conditions expérimentales. Ensuite il a été nécessaire de procéder à une coloration de la F-actine à la rhodamine-phalloïdine afin de visualiser le cytosquelette d'actine.

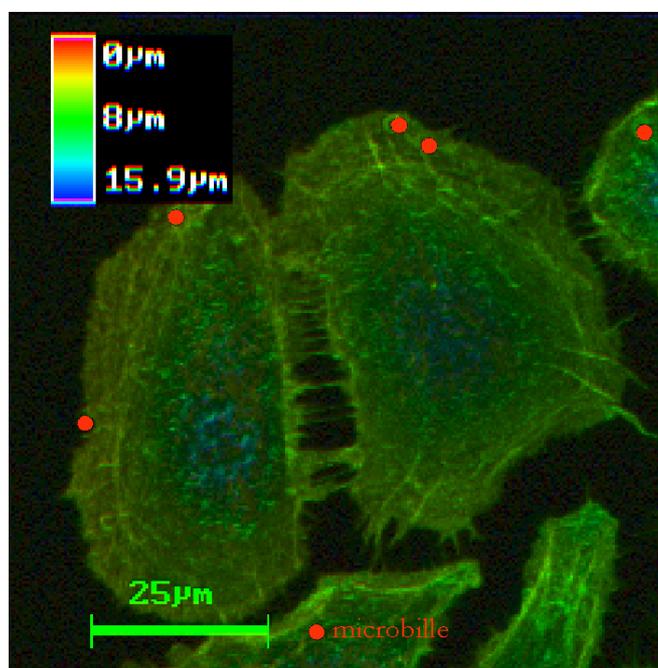


Figure 3.1 : Image en microscopie confocale de cellules épithéliales alvéolaires, lignée A549 mise en culture avec des microbilles traitées avec un ligand de surface RGD

La figure ci-dessus confirme la spécificité de l'ancrage des billes à l'actine cellulaire. En effet, on peut noter sur ces images une densité d'actine importante autour des microbilles (point rouge) traitées RGD, il y a donc eu recrutement d'actine autour de celles-ci. Des reconstructions tridimensionnelles de ces images issues de la microscopie confocale ont appuyé cet argument [Laurent & coll., 2002].

2. *Protocoles de mesures*

Toute manipulation commence par la mise sous tension des alimentations lasers permettant la stabilisation en température des diodes, évitant ainsi la dérive des faisceaux. On procède ensuite aux alignements optiques. Une fois les réglages terminés, on vérifie quelques points de la courbe d'étalonnage de force validant ainsi les différents réglages optiques.

Une lamelle est préparée suivant le protocole décrit précédemment. Une fois la lamelle contenant les cellules à tester préparée avec les microbilles de silice fixées spécifiquement aux complexes intégrines, celle-ci est montée sur une cuve expérimentale [figure 2.11] dans laquelle on injecte environ 50 μ l de milieu de culture. La chambre expérimentale est ensuite placée sur la cale piézoélectrique, elle-même fixée sur la platine du microscope à l'intérieur de l'enceinte thermalisée. On cherche ensuite une cellule isolée ayant une bille fixée à une hauteur d'environ 5 μ m au dessus de la lamelle, ce qui correspond à nos étalonnages de force et évite de coller la bille à la lamelle inférieure.

Nous avons conçu un programme de commande de la céramique piézoélectrique. Cet algorithme génère deux types de signaux sur deux voies synchronisées *via* l'horloge de la carte d'acquisition (carte PCI-MIE 16E-4, National Instruments). Le premier signal, analogique, consiste en une suite de trains d'ondes sinusoïdaux à différentes fréquences. Le deuxième signal, numérique et synchronisé au premier, échantillonne la prise d'images. Pour chaque bille, on applique une série de 10 trains d'oscillations successives (chacune sur plusieurs périodes) à des fréquences différentes ($f = 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 16.66, 41.5, 0.1, 0.05\text{Hz}$). La fréquence d'échantillonnage des images est calculée en fonction de la fréquence d'oscillation du piézoélectrique.

L'utilisateur choisit donc, *via* l'interface Labview, le type de déplacement qu'il va envoyer à la céramique piézoélectrique : rampe triangulaire basse fréquence, pour les mesures en régime quasi-statique, ou trains d'ondes sinusoïdaux à fréquence et amplitude définie, pour les expériences en régime dynamique. En effet, le signal analogique envoyé par l'ordinateur à l'alimentation est défini par une fonction reliant l'intensité (amplitude) au temps, ce qui permet donc de fixer tout type de signal.

La mesure peut se décomposer en trois étapes :

i) Dans un premier temps, on centre le piège optique sur une bille fixée sur une cellule isolée, de sorte que la bille traverse le piège selon son diamètre, tangentiellement à la membrane [figures 3.2, 3.3]. On lance le programme qui déclenche le mouvement de la chambre expérimentale. La prise de données dure entre quelques secondes et 3 minutes selon le type de signal généré. Elle doit être effectuée le plus rapidement possible en raison de déplacements éventuels de la cellule sur des temps de l'ordre de quelques minutes, introduisant des dérives dans le point d'équilibre.

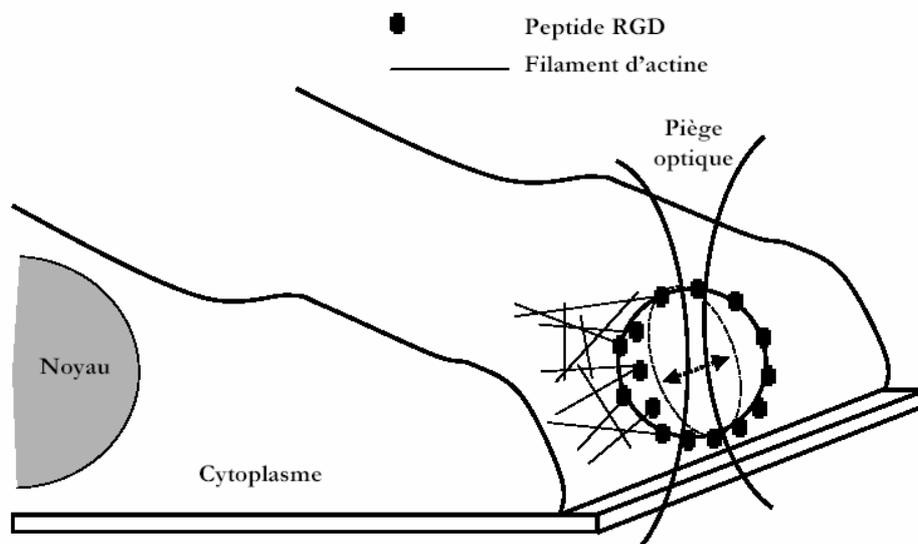


Figure 3.2 : Schéma de déplacement de la chambre expérimentale, le piège restant fixe

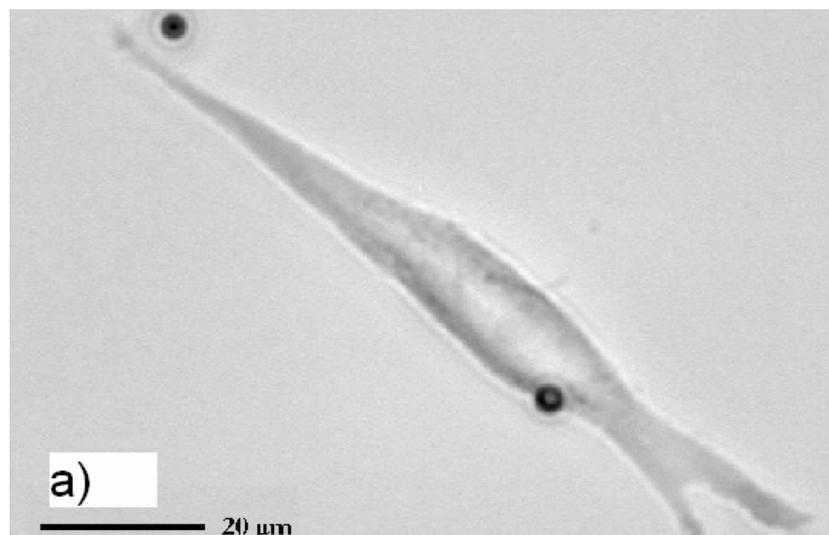


Figure 3.3 : cellule pré-musculaire C2 avec une microbille de silice collée spécifiquement *via* les intégrines.

ii) A la fin de chaque mesure une pile de 1092 images (correspondant à la taille mémoire de la caméra) est récupérée *via* une carte d'acquisition vidéo (PCI/PXI 1407, National Instruments). L'ensemble des images, pour chaque position de bille, est traité par un algorithme de reconnaissance de forme (Imaq Vision Builder, National Instruments) de façon à améliorer le contraste, puis à calculer la position $X_{\text{bille}}(t)$ du centre de la bille, avec une résolution inférieure au pixel. C'est à dire, en prenant en compte le grossissement obtenu par le microscope, inférieure à 40 nm. On évalue aussi **[figure 3.10]** le degré d'enfoncement α de la bille dans la cellule, par mesure directe sur les images, comme décrit dans ce même chapitre.

iii) La troisième étape consiste à comparer les déplacements respectifs de la bille et du piège et à en déduire la force appliquée sur la cellule au cours du temps et la déformation de cette cellule.

L'intérêt de ce protocole expérimental est d'appliquer des forces harmoniques dans une large gamme de fréquences qui peuvent varier entre 0,05Hz et 41,5Hz. Cette gamme de fréquence recoupe celle choisie par Maksym et collaborateurs ($\rightarrow 10^3$ Hz) dans son étude menée par MTC oscillante sur des cultures de cellules musculaires lisses **[Maksym & coll., 2000]**.

3. Modèles mécaniques de déformation cellulaire, approche analytique

Dans cette partie nous présentons les modèles qui ont permis d'établir une forme analytique pour la relation contrainte-déformation en tenant compte du degré d'enfoncement de la bille dans le corps cellulaire. Ces relations permettent de mesurer les coefficients viscoélastiques à partir des mesures de force et de déplacement de la bille. Les détails du calcul analytique sont présentés dans l'article annexé à ce manuscrit **[Laurent & coll., 2002]**. Nous considérons ici une sphère rigide comme sonde de la viscoélasticité du milieu intracellulaire. Le volume et le poids des microbilles utilisées sont assez faibles pour que gravité et flottabilité soient négligées. Le milieu intracellulaire est considéré comme viscoélastique linéaire et incompressible. Nous présentons sa réponse mécanique comme celle d'un simple modèle de Voigt, *i.e.* l'association en parallèle d'un élément purement élastique (ressort) et d'un élément purement visqueux (amortisseur). Nous examinerons en détail trois configurations géométriques différentes : **a)** bille entièrement immergée dans un milieu intracellulaire tridimensionnel ; **b)** bille immergée dans un milieu intracellulaire semi-infini, limité par un plan ; **c)** bille est en contact avec la surface plane du milieu intracellulaire semi-infini, *via* une petite aire circulaire. Dans ce dernier

cas, le degré d'immersion de la bille dans le milieu cellulaire est mesuré par le demi-angle α générant le cône délimitant la surface de contact.

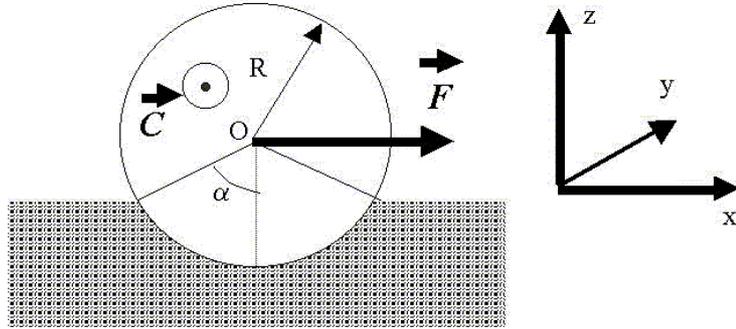


Figure 3.4 : Schéma de la bille partiellement immergée dans le milieu cellulaire

On suppose que la bille est soumise à une force F constante, parallèle à la membrane. Le déplacement x du centre de la bille résulte d'une translation et d'une rotation. En négligeant l'inertie de la bille, la force F est égale et opposée à la force viscoélastique F_v exercée sur la bille par le milieu. Nous écrivons la relation entre F_v et x de la manière suivante :

$$F_v = F_d + F_e = - \left(\beta_e E R \delta x + \beta_d \mu R \dot{\delta x} \right)$$

Dans cette formule F_e et F_d sont respectivement les contributions élastiques et visqueuses à F_v , E est le module d'Young du milieu, μ sa viscosité, R représente le rayon de la bille, β_e et β_d sont des coefficients numériques sans dimension dépendant du degré d'immersion de la bille dans le milieu intra-cellulaire.

Lorsqu'on remplace la force constante F par une force sinusoïdale $F(\omega)$ à la pulsation ω , les coefficients E et μ doivent dépendre en toute généralités de la pulsation ω . En l'absence d'une théorie plus complète on supposera que l'on peut généraliser la formule ci dessus en conservant les mêmes expressions pour β_e et β_d .

$$F_v(\omega) = - \left[\beta_e E(\omega) + i \omega \beta_d \mu(\omega) \right] R \delta x(\omega)$$

Enfin, dans le cas des expériences dites « quasi-statiques », le temps caractéristique de mesure est de l'ordre de la minute. Ce temps est bien supérieur au temps caractéristique $\frac{\mu}{E}$ de l'équation précédente. Dans ces expériences les coefficients mesurés correspondent à la limite basse fréquence.

Nous détaillons maintenant les résultats pour chaque configuration géométrique étudiées.

a) Cas statique (limite basse fréquence)

Hypothèses

- Le milieu intracellulaire est considéré comme :

homogène viscoélastique linéaire

incompressible : module d'Young $E = 3\kappa$ où κ est le module de cisaillement

Coefficient de Poisson $\nu = 0.5$

La dissipation est caractérisée par le coefficient μ

- Le degré d'attachement de la bille à la cellule est caractérisé par l'angle α [figure 3.4]

- La bille est soumise à une force extérieure exercée en son centre et tangentielle à la membrane

- Le module d'Young de la bille est supposé très grand devant celui du milieu (bille indéformable)

Conditions aux limites

Tous les points de la surface de la bille subissent le même déplacement [figure 3.5]. Cependant la solution analytique satisfaisant ces conditions est inconnue, nous allons donc effectuer les approximations suivantes:

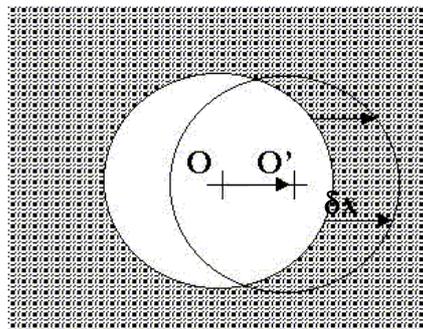


Figure 3.5 : Schématisation du déplacement de la bille dans le milieu

- Le volume de la bille de rayon R est remplacée par un volume élastique homogène de même nature que le milieu cellulaire [figure 3.6]. On applique la même force F au centre de ce même volume

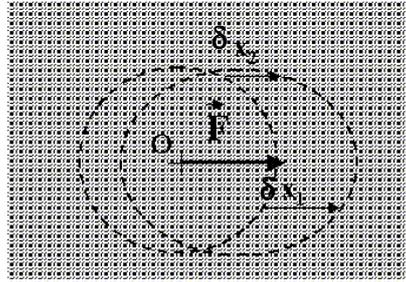


Figure 3.6 : Schéma de la bille immergée dans le milieu

- Le déplacement réel de la bille est calculé comme la moyenne des déplacements des points situés à une distance R du centre d'application de la force (sphère limitant le volume test).

Résultats dans le cas purement élastique ($\mu=0$)

Pour les calculs trois cas limites ont été considérés :

a) $\alpha = 180^\circ$: bille entièrement immergée [figure 3.7]

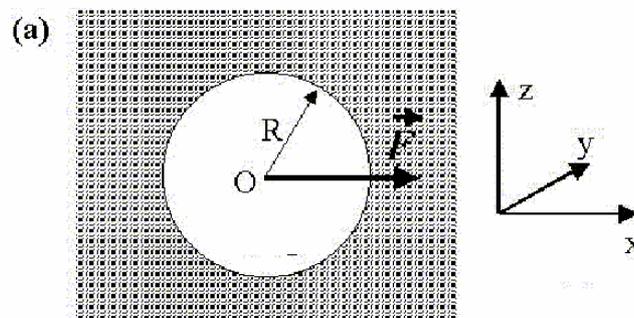


Figure 3.7 : Cas géométrique a) $\alpha=180^\circ$

$$\delta x = \frac{1}{2\pi E} \frac{F}{R} = -\frac{1}{2\pi E} \frac{F_e}{R} \quad (1)$$

où F_e est la force élastique exercée par le milieu en réponse à la force appliquée

b) $\alpha = 90^\circ$: bille demi-immergée [figure 3.8]

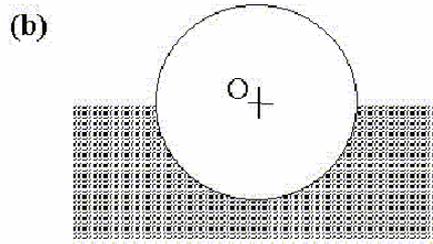


Figure 3.8 : Cas géométrique b) $\alpha=90^\circ$

$$\delta x = -\frac{9}{8\pi E} \frac{F_e}{R} \quad (2)$$

c) α petit : petite surface de contact [figure 3.9]

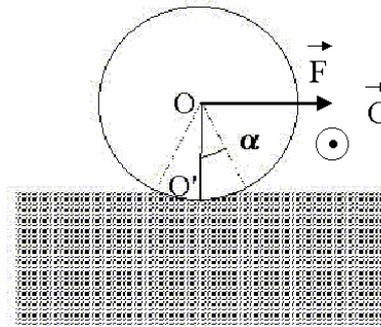


Figure 3.9 : Cas géométrique c) α petit

Dans cette configuration, lorsque F est appliqué au centre O de la bille, la réaction élastiques F_e du milieu est exercée au niveau de la surface de contact. La condition d'équilibre impose alors que le milieu exerce également un couple élastique C_e sur la bille au voisinage de la région de contact. Ce couple est donné approximativement par la relation:

$$C_e = -RF \cos \alpha .$$

Le déplacement δx du centre de la bille prend donc en compte la translation δx_1 due à l'action de la force, et la déformation $\delta x_2 = R\theta$ due à l'action du couple qui fait tourner la bille d'un angle θ , pour lesquels on peut calculer les expressions :

$$\delta x_1 = \frac{9}{8\pi E} \frac{F}{R \sin \alpha}$$

$$\delta x_2 = \frac{-3}{4\pi E} \frac{C}{R^3 \sin^3 \alpha}$$

D'où finalement l'expression de δx :

$$\delta x = \frac{9}{8\pi R} \frac{F}{E} \left(\frac{1}{\sin \alpha} + \frac{2 \cos \alpha}{3 \sin^3 \alpha} \right)$$

On peut alors écrire l'expression de la force élastique s'exerçant sur une bille immergée d'un angle α dans l'approximation quasi-statique sous la forme :

$$F_e = -f(\alpha) 2\pi R E \delta x$$

où $f(\alpha)$ s'écrit:

$$f(\alpha) = \frac{4}{9} \frac{1}{\left(\frac{1}{\sin \alpha} + \frac{2 \cos \alpha}{3 \sin^3 \alpha} \right)}$$

En raison des hypothèses simplificatrices du calcul, l'erreur dans le coefficient de la formule finale est évaluée comme étant de moins de 20%.

Les calculs ont aussi été effectués pour un milieu dissipatif. Les relations entre la force visqueuse \vec{F}_v et la vitesse \vec{V} de la bille générant un écoulement de Poiseuille dans un milieu continu de viscosité μ , ont été établies dans les mêmes configurations géométriques [figures 3.7 à 3.9]. Les calculs ont donné des relations force visqueuse/vitesse du type :

$$\vec{F}_v = \beta_d \mu R \vec{V}$$

le coefficient β_d dépendant du type de géométrie considérée, son expression est donnée dans l'article annexé.

b) Extension au régime dynamique

Les propriétés microrhéologiques de matériaux complexes soumis à des contraintes oscillantes de faibles amplitudes (régime viscoélastique linéaire), peuvent être caractérisées dans le domaine fréquentiel par leur module complexe $G(f)$, que l'on peut écrire :

$$G(f) = G'(f) + iG''(f)$$

ou de façon équivalente $G(f) = (1 + \eta(f)) G'(f)$. Le facteur d'hystérésivité $\eta(f)$ représentant le *ratio* entre les parties visqueuses et élastiques du module $G''(f)/G'(f)$ et sert d'index à la mesure de la fluidité du système. Lorsque l'on passe dans le domaine temporel, la transformée de Fourier Inverse du module complexe fournit des informations sur la distribution des temps caractéristiques du matériau étudié.

Comme indiqué au début de cette partie, l'expression de la force élastique s'exerçant sur une bille immergée d'un angle α dans l'approximation quasi-statique peut être généralisée en remplaçant F par $F(\omega)$ et E par $G^*(\omega)$

$$F(\omega) = -f(\alpha) 2\pi R G^*(\omega) \delta x(\omega)$$

En pratique comment δx est mesuré pour chaque cellule ? A chaque fréquence f , on connaît, grâce à un étalonnage préalable, la position de la cale piézoélectrique en fonction du temps. Nous appellerons alors $X_{\text{réf}}$ la position au cours du temps de la céramique telle que :

$$X_{\text{réf}}(t) = X_{\text{réf}}^{\circ} \sin(2\pi f t)$$

Sur chaque image, on mesure la position de la bille $X_{\text{bille}}(t)$. On calcule à chaque instant le déplacement de la bille par rapport à la cellule $\delta x(t)$ ($\delta x(t) = X_{\text{bille}}(t) - X_{\text{réf}}(t)$) ainsi que la force $F(t)$ appliquée sur celle-ci. La force F dépend de la distance de la bille par rapport au centre du piège, $r(t) = X_{\text{bille}}(t)$ (le piège est fixe en $X = 0$, et la cale ne bouge que selon Ox).

On ajuste alors F et δx par des fonctions sinusoidales de fréquence f et on obtient :

$$F_{\text{pince}} = F^0 \sin (2\pi f t + \chi)$$

et la déformation :

$$\delta x (t) = \delta x^0 \sin (2\pi f t + \varphi)$$

où χ et φ sont le déphasages respectifs de F et δx par rapport à $X_{\text{réf}}$

On peut alors donner la formule analytique nous permettant de calculer le module élastique $G'(f)$ et le module de perte $G''(f)$:

$$G'(f) = \frac{9}{8\pi R} \frac{F^0}{\delta X_0} \cos(\chi - \varphi) \left(\frac{1}{\sin \alpha} + \frac{2 \cos \alpha}{3 \sin^3 \alpha} \right)$$

$$G''(f) = \frac{9}{8\pi R} \frac{F^0}{\delta X_0} \sin(\chi - \varphi) \left(\frac{1}{\sin \alpha} + \frac{2 \cos \alpha}{3 \sin^3 \alpha} \right)$$

C. Résultats en régime de déformation quasi-statique

1. Mesure d'élasticité

En régime quasi-statique on applique une rampe de déplacement au piège à vitesse constante $X_{\text{piège}} = \alpha t$, de sorte que la bille est traversée par le piège en quelques secondes. La force du piège (proportionnelle à la distance entre la bille et le piège) est équilibrée à chaque instant par un rappel élastique exercé par la cellule

Une quarantaine de mesures a été réalisée sur des cellules épithéliales alvéolaires. La caractéristique $F(x)$ est ajustée par une loi linéaire, un résultat type est montré sur la figure 3.11. De la pente de la droite on déduit le module d'Young à partir des formules établies dans la section précédente. Ceci nécessite la connaissance de l'angle α [Figure 3.10] que l'on mesure au préalable à partir des images.

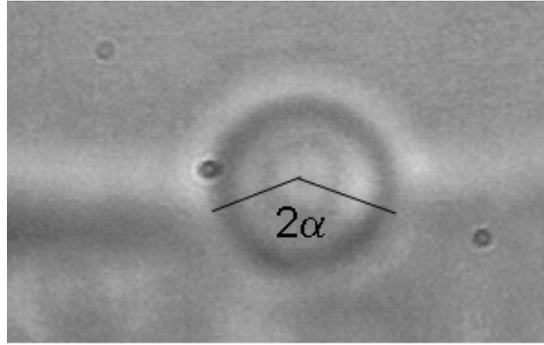


Figure 3.10 : Mesure de l'angle α à partir des images, ici $\alpha = 60^\circ$, la valeur de E tirée de cette manipulation est $E = 216 \text{ Pa}$ pour la cellule épithéliale testée.

Pour l'exemple tiré de la figure 3.10 on trouve un angle α de 60° , le module d'Young obtenu sera alors $E = 216 \text{ Pa}$.

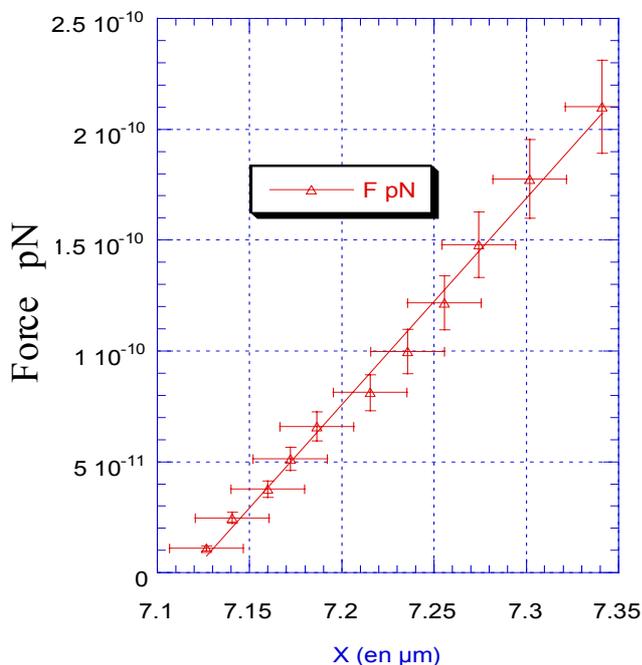


Figure 3.11 : Caractéristique force/déplacement du centre de la bille. Sur notre échelle de force les variations restent linéaires. La pente de la droite est directement liée au module élastique. La marge d'erreur sur les mesures pour le déplacement de la bille est de $\pm 20 \text{ nm}$, et sur la force de $\pm 5\%$

Dans notre gamme de force, jusqu'à 200 pN , la réponse du cytosquelette suit une loi élastique linéaire. La valeur du module d'Young du cytosquelette d'actine a été mesurée sur 44 cellules épithéliales. Un histogramme récapitulatif est présenté sur la figure suivante [figure 3.12].

Le module d'élasticité obtenu varie entre 29 et 258 Pa avec une valeur moyenne des modules d'Young trouvés à $E=131\text{Pa}$.

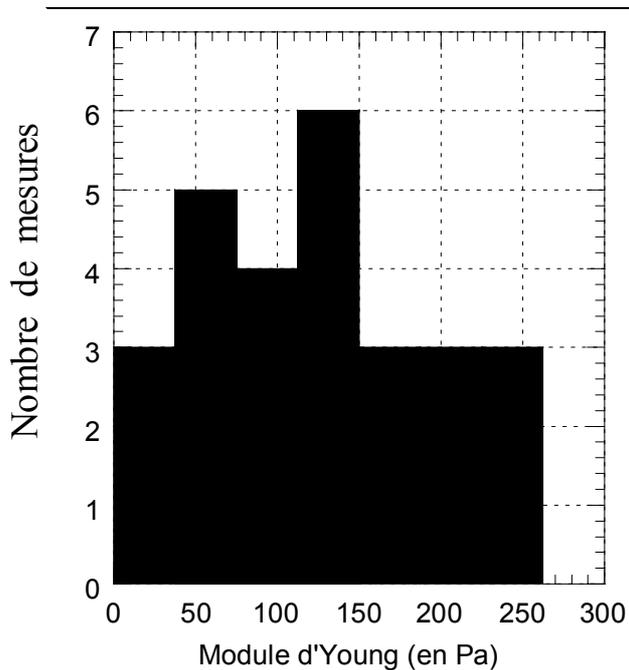


Figure 3.12 : Histogramme récapitulatif de l'ensemble des mesures. En ordonnées on trouve le nombre de mesures et en abscisse la classe de valeurs du module d'Young correspondant. La valeur moyenne obtenue pour les modules est de 131 Pa.

Les hypothèses expliquant la dispersion sur les mesures sont de quatre sortes :

- La concentration en RGD semble influencer les résultats. En effet, parmi les résultats obtenus, nous avons fait des expériences en diminuant la concentration en RGD, dans ce cas les modules obtenus sont généralement plus faibles. Une hypothèse expliquant ce phénomène est que le nombre d'intégrines recrutées au point de fixation de la bille serait moins important. Ainsi autoriserait-on à la bille des déplacements d'amplitude plus grande, le module élastique en serait alors affecté.

- Certains de ces sites sont aussi susceptibles de rompre lors de déplacements de trop grande amplitude et donc modifier la mesure du module d'Young.

- Le modèle élastique ne tient pas compte de la présence de la paroi à proximité de la bille. Qualitativement, cet effet conduit à une valeur apparente de E supérieure à la valeur réelle. Par la suite, des simulations numériques nous permettront de préciser les corrections à apporter aux formules utilisées pour le calcul du module d'Young [Mijailovich & coll., 2002].

- Enfin une des raisons essentielles de dispersion vient du fait que nous travaillons sur un système vivant dont la réponse dépend de facteurs tels que: l'âge des cellules, leur taille, la température extérieure (non contrôlée pour l'étude en régime statique).

2. Coefficient de dissipation

. Lorsque la force de rappel viscoélastique devient supérieure à la force maximale que peut exercer la pince, la bille sort du piège et relaxe librement selon une courbe $\delta x(t)$ que l'on mesure.

Dans une première analyse simple nous avons choisi d'ajuster la position de la bille après échappement par une loi exponentielle de la forme :

$$A - Be^{-\frac{t}{\tau}}$$

où τ est le temps caractéristique de relaxation.

Cette analyse repose sur l'hypothèse d'un milieu viscoélastique simple dans lequel:

$$\tau = \frac{3\mu}{E}$$

Un résultat type est montré sur la figure 3.13.

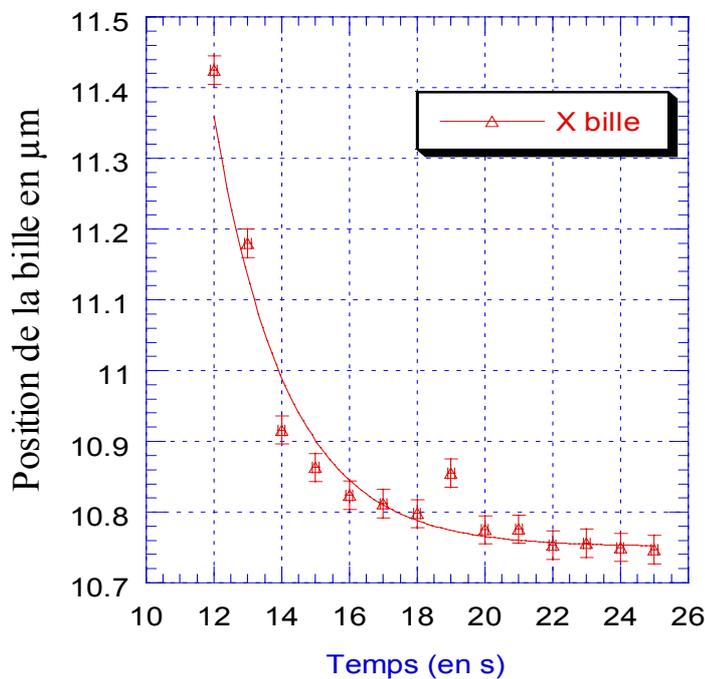


Figure 3.13 : Position de la bille de silice après échappement du piège suivie au cours du temps. Le trait plein correspond à la fonction d'interpolation exponentielle, où t est le temps en seconde et τ le temps caractéristique de relaxation. Ici, $\tau = 2.14$ s. La marge d'erreur sur chaque mesure est de ± 0.1 s

Plusieurs temps de relaxation ont été mesurés. Un histogramme récapitulatif est présenté sur la figure 3.14.

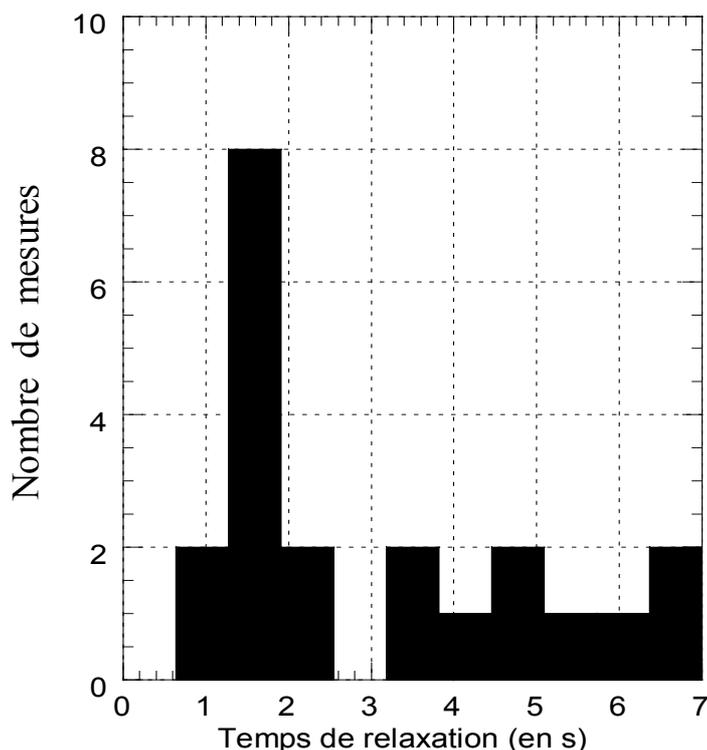


Figure 3.14 : Histogramme récapitulatif de l'ensemble des mesures de temps de relaxation. En ordonnées : le nombre de mesures, en abscisse : les classes de temps de relaxation. La valeur moyenne obtenue est de 1.7s.

La valeur moyenne de τ sur l'ensemble des mesures est $\tau = 1.7s$. La valeur de τ est liée à la viscosité cellulaire par la relation (**x**), on trouve une valeur moyenne de la viscosité de $\mu=80$ Pa.s (= 800 Poise). Une des difficultés principales du traitement de ces données est le choix d'ajustement de ces courbes de relaxation par une loi exponentielle. En effet on s'est aperçu que ces ajustements étaient dépendant de la façon dont l'expérimentateur traitait ces données, dans ce cas précis de la portion de courbe utilisée pour l'ajustement.

3. Discussion

Les valeurs trouvées pour les modules d'Young nous donnent une valeur moyenne de E , à savoir $E= 131$ Pa. Les valeurs trouvées pour les temps de relaxation nous donnent une valeur moyenne de $\tau = 1.7s$. Ces valeurs ($29 < E < 258$ Pa), sont difficilement comparables avec les résultats obtenus dans la littérature (*cf* tableau récapitulatif du chapitre 1). Les différences observées peuvent être expliquées par différentes hypothèses, celles-ci sont soit d'origine biologique soit intrinsèques au système de mesure. En continuité avec les travaux antérieurs portant sur la détermination des propriétés élastiques des structures du réseau d'actine cellulaire, les présents résultats permettent d'établir des facteurs déterminants dans ce type de mesures pouvant expliquer la dispersion observée entre les différentes expériences décrites dans la littérature.

a) Dispersions d'origine biologique

- (i) Le type cellulaire : la concentration d'actine et donc la densité du réseau dépend fortement du type cellulaire étudié (différent selon les techniques utilisées). De plus la motilité et donc la dynamique interne du réseau varie fortement d'un type à l'autre.
- (ii) La localisation de la contrainte : en effet la structure et la dynamique du réseau est différente selon que l'on se situe en face apicale ou en face basale, vers le noyau ou plutôt sur un lamellipode
- (iii) Cellule isolée ou tapis cellulaire : certaines expériences se font sur des tapis cellulaires, quel est alors le rôle des jonctions inter-cellulaires dans la réponse mécanique ? Y a-t'il des régimes de réponse différents associés à des protéines membranaires différentes (ICAM, cadhérine [Kovacs & coll., 2002][Lambert & coll., 2000][Perret & coll., 2002] etc...) ?
- (iv) Sonde intra ou extra-cellulaire : se pose alors la question du rôle de la membrane ?
- (v) La spécificité de la contrainte : la formation de complexes focaux [Nicolas & coll., 2004] induit des réponses biologiques spécifiques (rigidification, induction de réponse génétique dirigée...) qui diffèrent des réponses observées par des techniques comme l'aspiration par micropipettes [Sato & coll., 1987] ou bien la microscopie à force atomique [Radmacher & coll., 1992][Radmacher & coll., 1996][Alcaraz & coll., 2003].
- (vi) « L'état de la cellule » : on peut supposer que les propriétés mécaniques des cellules varient selon que la cellule se situe en métaphase ou en interphase etc... Il serait alors intéressant de travailler sur des cultures cellulaires synchronisées.

- (vii) Le milieu dans lequel les cellules sont sollicitées : température, présence ou non d'ATP, présence ou non de sérum, atmosphère etc... Sont autant de facteurs pouvant influencer le comportement cellulaire
- (viii) Enfin le substrat : les protéines de la matrice extra cellulaire sont de plusieurs types et varient également en fonction des souches utilisées. Des études en cours se penchent sur les différences observées dans les réponses mécaniques selon que l'on cultive les cellules sur du collagène, de la fibronectine, ou encore selon la rigidité du substrat de culture.

b) Dispersions d'origine physique

- (i) La taille de la sonde : la réponse peut être différente selon que l'on sollicite le réseau avec une sonde de taille comparable ou bien grande devant la taille élémentaire du réseau
- (ii) Le type d'effort appliqué : force, couple, homogène ou non (répartition spatiale des contraintes)
- (iii) La vitesse de chargement : y a t'il une influence de la vitesse de la rampe d'application de la force?
- (iv) Contrainte globale ou locale : la sollicitation d'une cellule entière [**Guck & coll., 2001**][**Schmidt & coll., 2000**] peut elle entraîner une réponse différente de celle obtenue pour des déformations localisées ?
- (v) La géométrie de la contrainte (sonde de forme sphérique ou anisotrope par exemple)
- (vi) L'amplitude de la contrainte : régime linéaire ou non pour les grandes déformations

Il existe donc de multiples facteurs pouvant influencer de manière notable ces mesures. Il est en effet très difficile de comparer la valeur absolue des modules de rigidité et des viscosité mesurées [**figure 1.18**]. Dépendant de la technique utilisée, en particulier de la taille de la sonde

expérimentale, les modules élastiques obtenus peuvent varier sur plusieurs ordres de grandeurs. De 10^0 - 10^2 Pa pour la magnétocytométrie à 10^3 - 10^5 Pa pour l'AFM [Shroff & coll., 1995].

Pour essayer de limiter ces différentes sources de dispersions, nous avons, en collaboration avec l'équipe de Daniel Isabey (Inserm U492), mesuré les propriétés mécaniques d'un même type cellulaire (cellules épithéliales alvéolaires, lignée A549), avec deux techniques expérimentales utilisant des tailles de sondes comparables et appliquant des contraintes similaires. Ces deux techniques sont la magnétocytométrie (*cf* tableau au paragraphe I.C.5) et les pinces optiques. Les valeurs obtenues sur 15 cellules bien qu'inférieures en moyenne pour la magnétocytométrie (MTC : $34 < E < 58$ Pa, $\eta = 23 \pm 13$ Pa.s) sont assez proches de celles trouvées pour les pinces optiques (PO : $29 < E < 250$ Pa, $\eta \approx 80$ Pa.s). Cette étude a donc contribué à unifier les différents résultats expérimentaux et à réduire certaines dispersions en décrivant de façon précise le rôle de la géométrie de la sonde dans l'étude de la réponse mécanique cellulaire. Les mesures de coefficients de dissipation sont également assez proches. La dispersion statistique observée sur nos mesures peut être attribuée à de nombreux éléments persistant tels que nous les avons déjà discutés. Par exemple l'amplitude de la contrainte en magnétocytométrie est en moyenne supérieure à celle en pinces optiques (couples équivalents : $0 < \text{pinces optiques} < 400 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$; $400 < \text{magnétocytométrie} < 1200 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$). De même la localisation de la sonde n'est pas la même dans les deux expériences (moyenne sur l'ensemble de la surface libre de la cellule en magnétocytométrie, proche de la face basale de la cellule pour les pinces optiques). Enfin en magnétocytométrie la mesure des coefficients viscoélastiques est issue d'une moyenne sur un grand nombre de billes ayant des angles d'immersion différents alors que l'angle d'immersion est mesuré pour chaque bille dans le cas des pinces optiques. La discussion de ces effets est détaillée dans l'article annexé [Laurent & coll., 2002].

Malgré tout, une des difficultés majeures que nous avons rencontrée est le traitement et l'interprétation des mesures de temps de relaxation. On se demande alors, au regard de la dispersion des temps de relaxation mesurés, si le choix de relaxation exponentielle pour décrire la viscosité cellulaire est pertinent. La cellule, son cytosquelette, architecture nous l'avons vu hautement dynamique n'aurait elle pas une réponse mécanique beaucoup plus complexe ? Celle-ci fait intervenir de multiples acteurs biochimiques interagissant entre eux avec des temps caractéristiques propres, conduisant non pas à un seul mais certainement à une large distribution de temps de relaxations.

Cette conclusion provisoire nous a conduit à mettre en œuvre une nouvelle approche expérimentale: il peut être intéressant d'effectuer des sollicitations dynamiques du cytosquelette d'actine dans le but d'étudier la dépendance éventuelle des mécanismes dissipatifs intracellulaires. Des études récentes ont montré que, à basse fréquence, le module élastique G' et le module de perte G'' varient avec la fréquence de façon concomitante [Fabry & coll., 2001]. La dissipation ne serait donc pas simplement reliée à la viscosité du cytosol, mais pourrait impliquer des processus internes au réseau de filaments. Cela signifie en particulier que la relaxation de la position de la bille pourrait ne pas être exponentielle. La suite décrit donc des études menées sur les mécanismes dissipatifs en soumettant la cellule à des contraintes oscillantes contrôlées en amplitude et en fréquence [Hubmayr & coll., 2000][Balland & coll., 2005].

D. Résultats en régime de déformation dynamique

1. Introduction

Des expériences récentes effectuées en magnétocytométrie ont permis de mesurer le module complexe moyenné, sur des populations confluentes de cellules adhérentes, en les soumettant à des stress oscillants de faibles amplitudes [Danowski & coll., 1992][Maksym & coll., 2000][Fabry & coll., 2001][Fabry & coll., 2003]. Ces expériences ont montré une dépendance de G^* avec la fréquence suivant une loi puissance de celle-ci.. Ces mesures semblent être en accord avec le modèle de structural damping. Fabry et ses collaborateurs interprètent ces données microrhéologiques par un modèle de matériau vitreux mou [Sollich & coll., 1997][Sollich, 1997], qui donne une expression mathématique en accord avec l'empirisme du structural damping. La dépendance en loi puissance du module complexe mesuré nous révèle, par transformée de Fourier inverse, un matériau dont la réponse mécanique est caractérisée par une distribution continue de temps de relaxation. Cependant, l'identification du comportement mécanique cellulaire avec celui de matériau vitreux mou est une hypothèse qui nécessite une plus grande investigation. Tout d'abord, ces mesures sont issues de moyennes effectuées sur un grand nombre de cellules testées simultanément. S'agit-il là d'un effet de moyenne lié à la distribution des billes sur les cellules, en terme de position, d'immersion etc... ?

Que ce passe-t-il à l'échelle de la cellule unique et pour différents types cellulaires ? Enfin, et c'est là le point qui nous semble central dans cette étude, est-il possible grâce à ce type de

mesures de caractériser le rôle des partenaires biochimiques du cytosquelette, comme les moteurs moléculaires par exemple, dans cette réponse mécano-biologique ?

Le but des expériences suivantes est double. D'une part nous voulons mesurer les propriétés microrhéologiques de cellules individuelles adhérentes, de différents types (fibroblastes, myoblastes, cellules épithéliales alvéolaires), avec des pinces optiques. D'autre part nous voulons quantifier la contribution spécifique du couple moteur actine/myosine dans ces réponses (dans le cas des myoblastes). Ces mesures ont été effectuées dans une gamme de fréquence comprenant des fréquences dites physiologiques, incluant celles de la respiration et de la contraction musculaire.

2. Mesures sur cellules épithéliales individuelles

a) Protocole expérimental spécifique

Le protocole de mesure de la réponse fréquentielle des cellules est très proche de celui utilisé pour le régime quasi-statique. De même que pour l'étude en régime statique, les lamelles de verre (22×22 mm) destinées aux manipulations sont préalablement rincées à l'éthanol, et recouvertes d'une solution de fibronectine à 5 µg/mL que l'on laisse incuber 3 heures à température ambiante avec un rinçage au DMEM. Elles sont ensuiteensemencées de la même façon que décrite précédemment, avec une densité cellulaire d'environ 400 cellules/ mm², et incubées à 37°C pendant les 24 heures précédant la manipulation. On ajoute enfin 75µL environ de la suspension de billes (1.5mg/ml dilué 20×), de façon à avoir 2 à 5 billes par cellule en moyenne, et on laisse incuber 30 minutes à 37°C avant de rincer au milieu à 1% de BSA.

On piège une bille attachée à une cellule de manière bio-spécifique (*cf* partie statique) à l'aide du faisceau laser, dont la puissance est réglée au maximum (P=621mW). La position du piège, contrairement à l'expérience en régime statique, est gardée fixe. Ceci nous permet d'obtenir une meilleure résolution sur la force mesurée. Cette fois-ci, on applique à une bille, *via* la cale piézoélectrique, une force sinusoïdale en déplaçant la chambre expérimentale par rapport au piège. Lors de premières séries de mesures le déplacement de la lamelle se faisait « à la main » en changeant à la fin de chaque mesure, la fréquence d'oscillation. Une cycle de mesure pouvait alors atteindre une durée d'environ 50 minutes. A des échelles de temps comme celle-ci la cellule se déplace, nous obligeant à un recentrage du piège pour chaque mesure mais surtout entraînant une modification de la structure locale de son cytosquelette. Il nous est rapidement apparu important

d'appliquer ces contraintes à différentes fréquences de manière automatisée et sur une durée totale limitée, *via* le programme Labview que nous avons réalisé afin d'éviter ce type de problème.

b) Mesure d'élasticité dynamique

Nous nous sommes tout d'abord penchés sur l'étude en régime dynamique de cellules épithéliales alvéolaires. Ceci dans le but de pouvoir effectuer des comparaisons pertinentes entre les deux régimes de contraintes sur un « modèle biologique identique ». Ce choix a également été motivé par l'environnement physiologique de ces cellules qui durant toute leur vie sont soumises à des déformations cycliques.

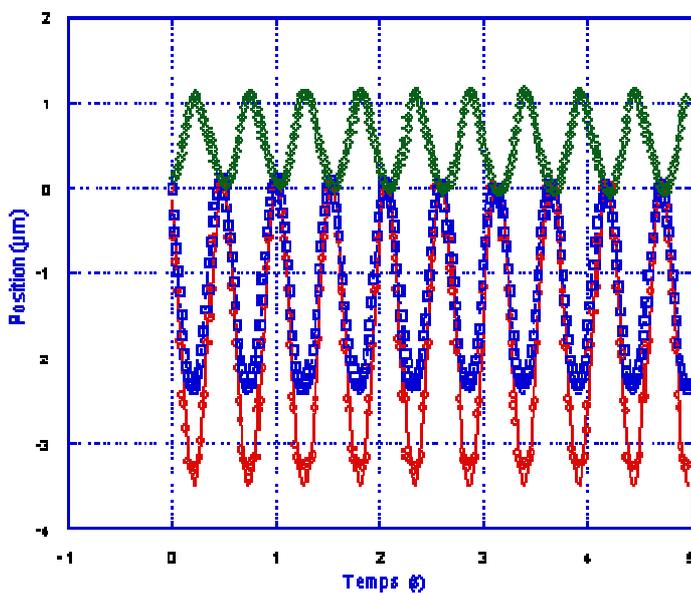


Figure 3.15 : Courbes $\delta X(t)$ et $F_{\text{pince}}(t)$ à $f = 0.5$ Hz, avec ajustement des paramètres d'amplitude et de différence de phase. Déformation (vert), déplacement de la bille (bleu), déplacement piézoélectrique (rouge).

Dans ces expériences, les modules G' et G'' sont calculés à partir des ajustements réalisés aux différentes fréquences des positions relatives du piège et de la bille [figure 3.15]. Elles mêmes sont reliées à la force appliquée et à la déformation cellulaire résultante. Des mesures sur 23 cellules ont été réalisées au laboratoire. Nous avons tracé, pour chaque cellule individuellement, l'évolution de son module complexe en fonction de la fréquence de sollicitation, soit le module élastique $G'(f)$ et le module de perte $G''(f)$, dans la gamme de fréquence $0.05 < f < 41.5$ Hz. Une courbe typique est présentée en échelle logarithmique sur la figure 3.16 pour une cellule unique.

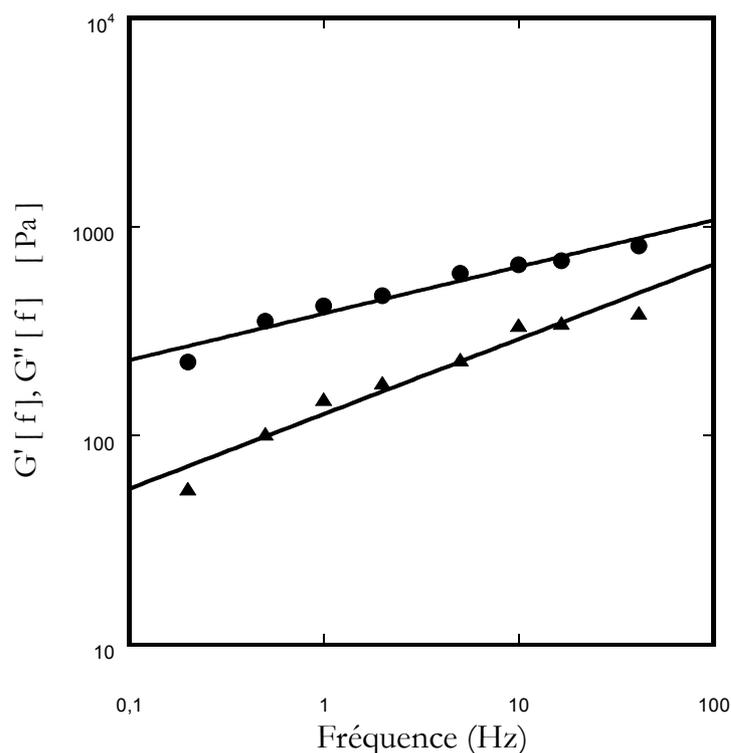
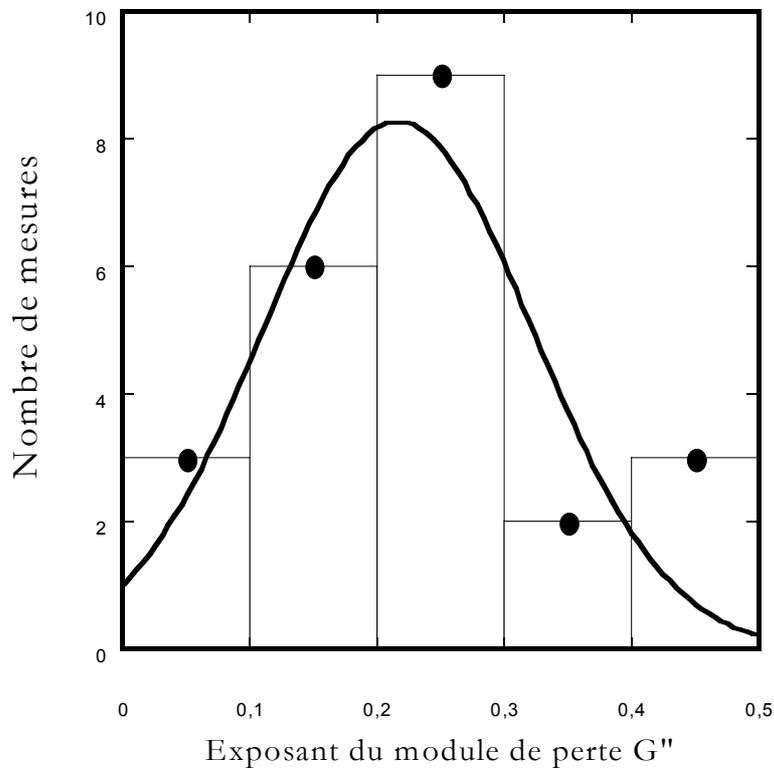
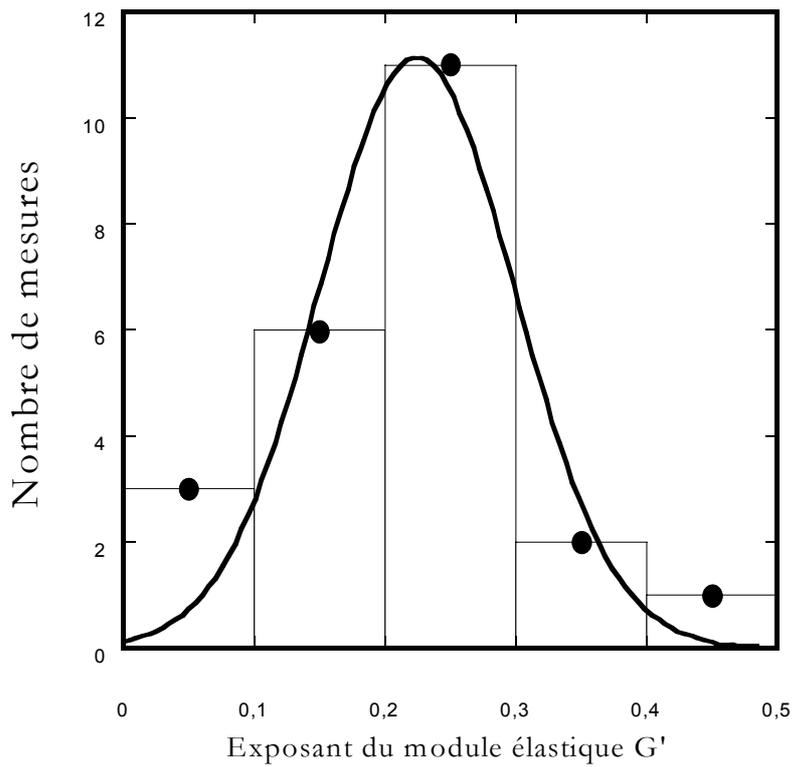


Figure 3.16 : Courbes de réponse du module élastique (ronds), et du module de perte (triangles) du réseau cytosquelettique d'une cellule épithéliale alvéolaire (lignée A549). Les courbes sont ajustées par des lois en puissance de la fréquence avec des exposants respectifs de 0.20 et 0.23.

Pour cette cellule, $G'(f)$ et $G''(f)$ suivent une loi puissance de la fréquence, sur 3 décades, avec des exposants respectifs de $\alpha = 0.20$ et $\beta = 0.23$. Ce comportement en loi puissance est retrouvé pour chaque cellule testée. Les exposants α et β montrent des variations d'une cellule à l'autre, tout en restant confinés dans les limites $0.1 < \alpha < 0.4$ et $0.1 < \beta < 0.5$. D'un point de vue statistique, leurs valeurs moyennes sur 23 cellules sont $\langle \alpha \rangle = 0.20 \pm 0.02$ et $\langle \beta \rangle = 0.23 \pm 0.02$. Pour chaque cellule, les deux exposants sont assez proches l'un de l'autre, cependant la plupart du temps β est trouvé légèrement supérieur à α : en moyenne $\langle \beta - \alpha \rangle = 0.03 \pm 0.02$. Les histogrammes suivants représentent l'ensemble des exposants mesurés pour chaque cellule testée, l'un pour le module élastique [figure 3.17] et le suivant pour le module de perte [figure 3.18].



Quant au préfacteur de la loi puissance [figure 3.19], caractérisant l'amplitude du déplacement de la bille nous observons, une distribution log-normale très proche de celle observée par l'équipe de Jeffrey Fredberg.

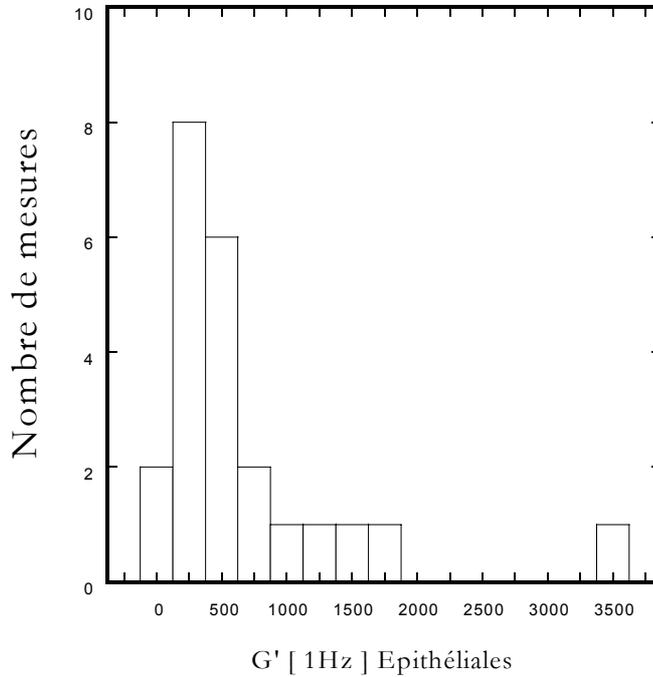


Fig 3.19 : Histogramme récapitulatif des préfacteurs de la loi puissance pour des cellules épithéliales déformées en régime dynamique.

Pour des commodités de présentation et dans un souci de lisibilité des résultats on peut présenter cet histogramme sous forme logarithmique afin de pouvoir y adapter un ajustement gaussien [figure 3.20].

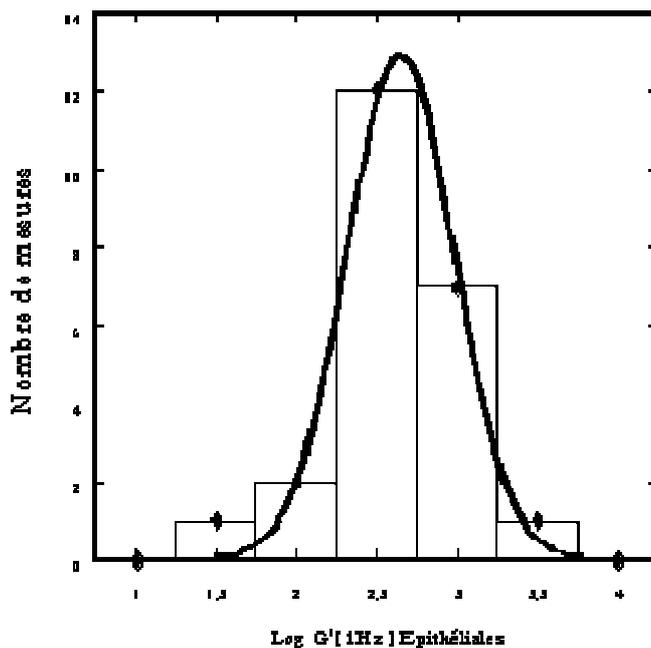


Fig 3.20 : Histogramme récapitulatif du logarithme des préfacteurs de la loi puissance pour des cellules épithéliales déformées en régime dynamique. La moyenne géométrique de G' [1Hz] est : $G'_m [1Hz] = 460 \pm 160$ Pa.

La figure suivante [figure 3.21] représente la moyenne géométrique $G'_m(f) = [\prod G'_i(f)]^{1/23}$ et $G''_m(f) = [\prod G''_i(f)]^{1/23}$ des 23 cellules épithéliales testées, en fonction de la fréquence.

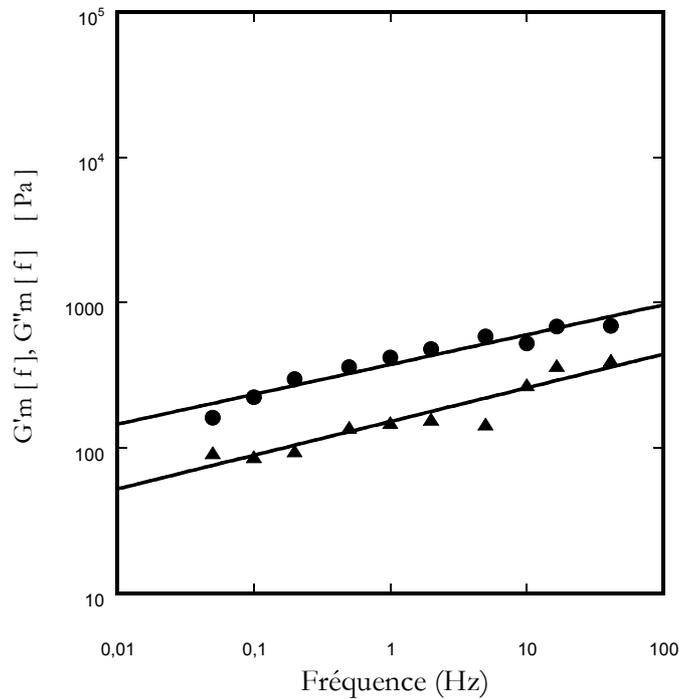


Figure 3.21 : Courbe représentant les moyennes géométriques des modules viscoélastiques $G'_m(f) = [\prod G'_i(f)]^{1/23}$ et $G''_m(f) = [\prod G''_i(f)]^{1/23}$ de cellules épithéliales alvéolaires.

La courbe moyenne présentée ci-dessus reflète bien les comportements observés sur cellules individuelles. L'exposant du module élastique de cette courbe moyenne est $\alpha_m = 0.20$ et $\beta_m = 0.23$ pour le module de perte.

c) Discussion

Comme nous l'avons dit précédemment de telles lois puissance ont déjà été observées. Dans leurs expériences de magnétocytométrie, Fabry et ses collaborateurs [Fabry & coll., 2001] ont mesuré, en moyennant leurs mesures sur un grand nombre de cellules, des variations en loi puissance des modules élastique et de perte. L'exposant α variant entre 0,15 et 0,30 avec en première approximation un exposant commun pour G' et G'' . Dans un autre type d'expériences [Crocker & coll., 2000][Delanoë-Ayari & coll., 2004], le spectre de fluctuation temporel de traceurs immergés dans le cytoplasme et leur spectre de corrélation spatial à deux points suivent également un comportement en loi puissance. De la même manière, des expériences de fluage effectuées sur cellules uniques suivent le même type de loi dans le domaine temporel et ce toujours avec des exposants se situant dans une gamme comparable [Desprat & coll., 2005].

Le résultat significatif que nous présentons ici, est que ce comportement en loi puissance n'est pas observé dans le cas de mesures moyennées sur un grand nombre de cellules mais pour une cellule unique. En effet, en supposant une loi de relaxation exponentielle, en raison des dispersions observées d'une cellule à l'autre, on pourrait par un « effet de moyenne » retrouver des lois puissance. De plus, une moyenne d'ensemble tend généralement à gommer les comportements individuels, et la moyenne elle-même ne reflète pas forcément les caractéristiques de chaque individu. Ceci n'est pas le cas dans une étude faite cellule par cellule. Le fait que la réponse mécanique de chaque cellule suive une loi puissance peut être directement relié aux mécanismes dissipatifs à l'intérieur même du cytosquelette. Dans un modèle discret, associant amortisseurs et structures élastiques, la réponse mécanique d'une cellule pourrait se résumer en une somme finie d'exponentielles impliquant un nombre fini de temps de relaxation. D'un autre côté, un spectre étendu de mécanismes dissipatifs, et donc une distribution continue de temps de relaxation, conduit à d'autres types de réponses, comme les lois puissances. Ceci n'est pas forcément surprenant, de très nombreux mécanismes, impliquant l'interaction d'un grand nombre d'acteurs protéiques, sont perpétuellement à l'oeuvre à l'intérieur de la cellule, contribuant au remodelage continu du cytosquelette d'actine. Parmi eux on peut citer le treadmilling, la dynamique intrinsèque de polymérisation de l'actine, l'interaction filament-filament, l'activité des complexes acto-myosine [Delanoë-Ayari & coll. , 2004][Svitkina & coll., 1997], chacun correspondant à des échelles spécifiques tant d'un point de vue spatial que temporel. Ainsi, notre caractérisation mécanique d'une cellule individuelle supprime définitivement la possibilité de modélisation du comportement mécanique du milieu cellulaire en éléments discrets et démontre que les mécanismes dissipatifs sont liés à une gamme continue de temps de relaxation.

3. Influence du type cellulaire

Dans le but d'une meilleure compréhension du comportement mécanique cellulaire et de sa modélisation, une étude identique à la précédente au regard des différents types cellulaires, nous a paru tout à fait pertinente.

Ce problème est à replacer dans le contexte de la différenciation cellulaire qui est l'une des plus belles questions de la biologie moderne. La question est de savoir comment les gènes sont activés dans un type cellulaire particulier. Le modèle de méthylation de l'ADN élaboré par Riggs et Razin, est une des rares théorie expliquant le rôle que pourrait avoir la méthylation dans la détermination du type cellulaire [Riggs & coll., 2004]. Alors que chaque cellule humaine contient 100 000 gènes, seulement un petit nombre d'entre eux est activé dans une cellule en fonction du stade du développement de l'organisme, du type cellulaire, de signaux extérieurs à l'organisme... Selon ce modèle, la méthylation de l'ADN serait en partie responsable de l'inactivation des gènes. En effet, puisque seulement une fraction des gènes d'une cellule s'exprime, le reste des gènes doit être inactivé. Chaque type de cellules aurait donc un patron de méthylation qui déterminerait quels gènes sont activés. Ce patron serait transmissible aux cellules filles après une division cellulaire, c'est pourquoi le type cellulaire reste généralement le même dans une même lignée de cellule. On a également observé que les patrons de méthylation sont spécifiques aux tissus, c'est-à-dire qu'ils sont différents pour chaque type cellulaire. Le modèle de la méthylation donne également une explication pour les différenciations qui se produisent lors du développement. Selon Riggs, une méthylation large, *de novo*, se produirait en rendant l'ADN de l'embryon assez uniforme. Au fur et à mesure que les cellules se différencieraient, une déméthylation spécifique aurait lieu suivant les types cellulaires.

Peut-on alors définir de manière générale ce qui fait la différence entre deux types cellulaires distincts ? Par définition la différenciation cellulaire est l'acquisition par une cellule ou une population cellulaire de caractères morphologiques originaux habituellement en rapport avec une spécialisation fonctionnelle ou de marqueurs. La mise en évidence morphologique de la différenciation n'est toujours pas possible par les techniques de routine et peut nécessiter des investigations spéciales. Ces différences peuvent être également liées à l'actine elle-même. Les actines de différentes sources cellulaires divergent par la nature de quelques acides aminés à leur extrémité amino-terminale. Ce domaine, impliqué dans les interactions avec les autres protéines, pourrait influencer la localisation sub-cellulaire des différentes actines et ainsi jouer sur la concentration locale de celle-ci. Nous avons alors choisi de tester mécaniquement différentes

souches cellulaires dans les mêmes conditions que précédemment afin d'étudier ce qui distingue un type cellulaire d'un autre du point de vue de leur réponse mécanique.

a) *Les cellules pré-musculaires*

Nous avons utilisé la lignée de cellules pré-musculaires C2, fournie par l'équipe de René Marc Mège de l'institut du fer à Moulin pour les expériences. Le même protocole a bien entendu été utilisé pour ces expériences. La figure suivante [figure 3.22] représente une caractéristique obtenue sur une cellule de lignée C2 testée par notre système.

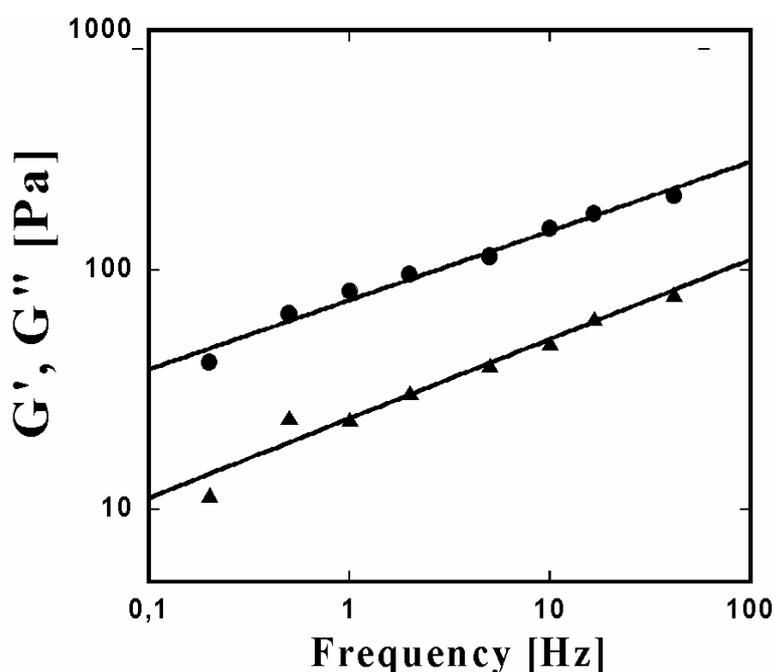


Figure 3.22 : Courbe de réponse d'une cellule C2 $\alpha=0.29$, $\beta=0.33$, module élastique (rond), module de perte (triangle)

La courbe obtenue pour ce type cellulaire adopte la même allure que celle obtenue pour les cellules épithéliales alvéolaire. Le module de perte comme le module élastique suivent une loi puissance de la fréquence avec des exposants sensiblement égaux. Nous avons testé 21 cellules du type C2. Les histogrammes obtenus ci-dessous donnent les valeurs des exposants des modules élastiques [figure 3.23] et de pertes [figure 3.24] ainsi que la distribution des préfacteurs de la loi puissance [figure 3.25].

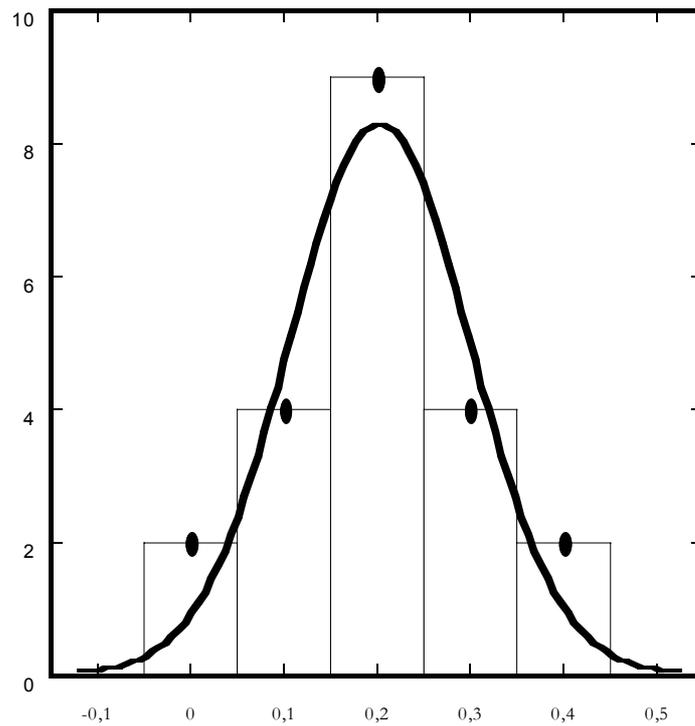


Figure 3.23 : Histogramme des exposants des modules élastiques obtenues sur 21 cellules de lignée pré-musculaire C2
La valeur moyenne de l'exposant est $\langle \alpha \rangle = 0.20 \pm 0.02$

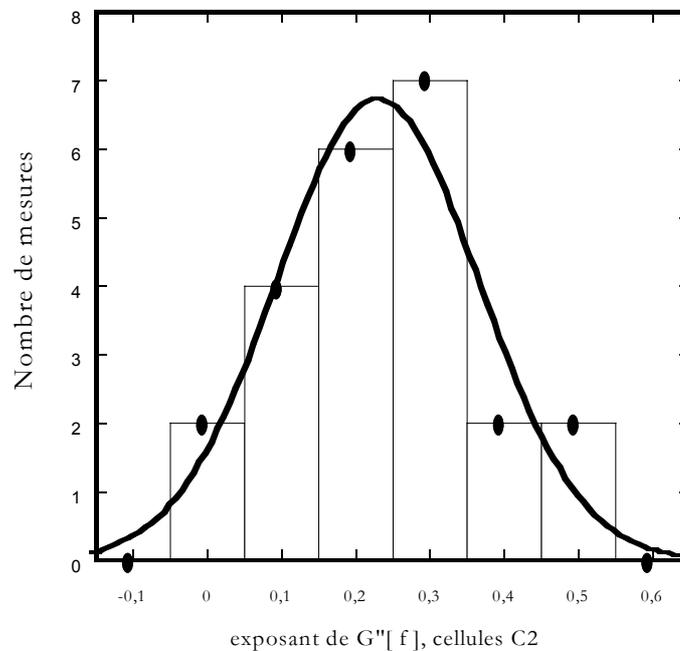
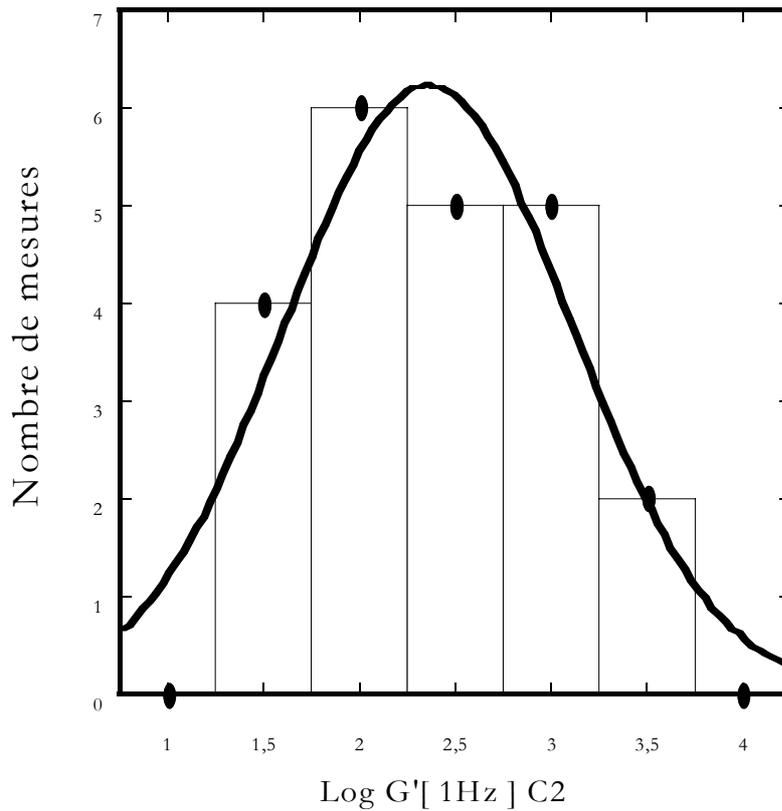


Figure 3.24 : Histogramme des exposants des modules de pertes
La valeur moyenne de l'exposant est $\langle \beta \rangle = 0.29 \pm 0.02$ obtenues sur 21 cellules de lignée pré-musculaire C2



**Figure 3.25 : Histogramme des préfacteurs de la loi puissance
Ajusté par une distribution log-normale.
La moyenne géométrique donne $\langle G'[1\text{Hz}] \rangle = 260 \pm 80 \text{ Pa}$.**

Les données microrhéologiques obtenues pour ce type cellulaire sont tout à fait comparables avec celles obtenues pour les cellules épithéliales alvéolaires. Au regard des exposants du module élastique, du module de perte ou bien de la distribution des préfacteurs, les données suivent les mêmes lois. Comme on peut le voir sur les histogrammes ci-dessus, le module complexe suit une loi puissance de la fréquence avec des exposants sensiblement égaux et compris dans une gamme allant de 0,15 à 0,40. Le préfacteur suit une distribution log-normale légèrement décalée par rapport à celle des cellules épithéliales. On constate d'après ces données que la différence entre types cellulaires se fait sur le préfacteur de la loi de puissance qui lui-même est directement lié à un index de rigidité de la cellule à fréquence fixe ($\langle G'[1\text{Hz}]_{\text{épi}} \rangle - \langle G'[1\text{Hz}]_{\text{MDCK}} \rangle \approx 300 \text{ Pa}$). La distribution spatiale d'actine, différente d'un type à un autre pour des raisons morpho-fonctionnelles, pourrait être directement responsable des propriétés mécaniques de celles-ci. Nous avons donc poursuivi cette hypothèse en testant différents types cellulaires.

b) Fibroblastes et cellules épithéliales MDCK

Nous présentons ci-dessous deux courbes individuelles pour deux cellules différentes de lignée respective L929 fibroblastiques et MDCK épithéliales.

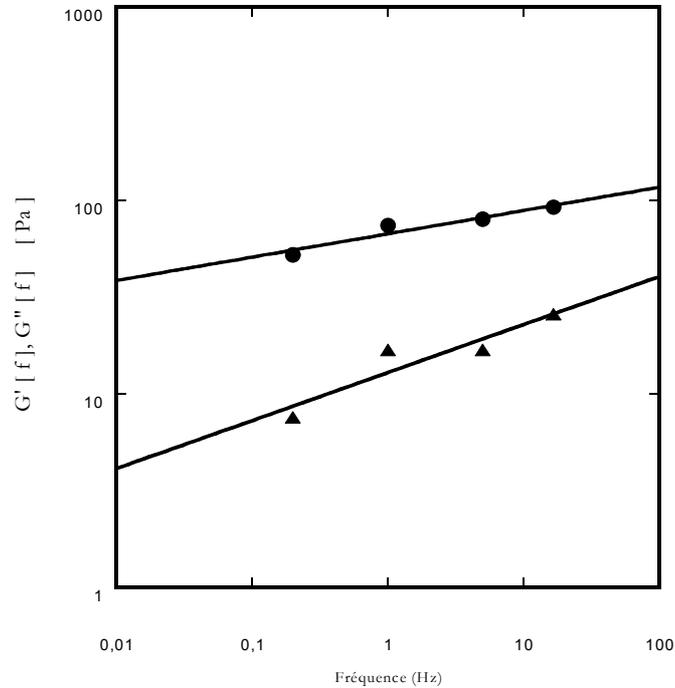


Figure 3.26 : Courbe de réponse cellule unique de lignée L929 module élastique (rond), module de perte (triangle)

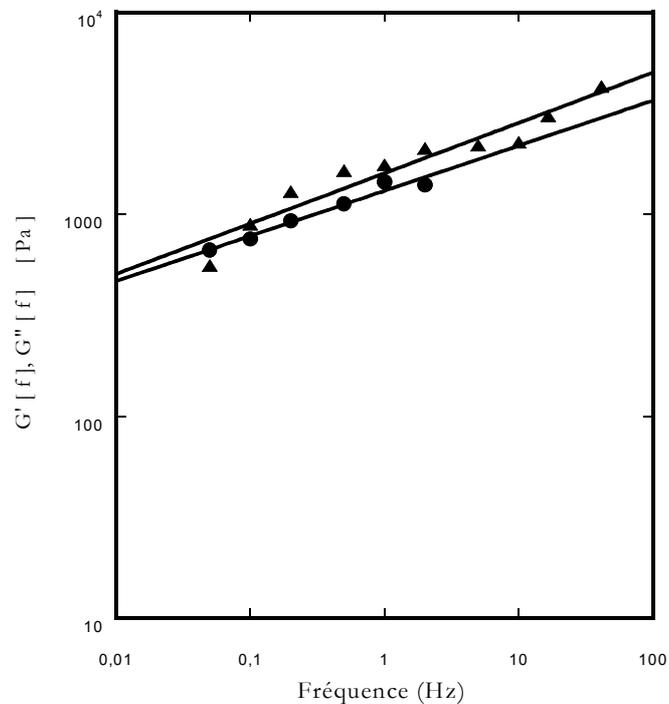


Figure 3.27 : Courbe de réponse cellule unique de lignée MDCK module élastique (triangle), module de perte (rond)

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant [figure 3.28].

Type cellulaire	$\langle\alpha\rangle$	$\langle\beta\rangle$	G' [1Hz]
Fibroblates L929 <i>10 cellules</i>	0.15 ± 0.013	0.28 ± 0.08	220 ± 90
Epithéliales alvéolaires A 549, <i>23 cellules</i>	0.20 ± 0.02	0.23 ± 0.02	460 ± 160
MDCK <i>10 cellules</i>	0.20 ± 0.02	0.24 ± 0.06	150 ± 70
C2-7 <i>21 cellules</i>	0.20 ± 0.02	0.29 ± 0.03	260 ± 80

Figure 3.28 : Tableau récapitulatif des mesures sur l'ensemble des types cellulaires testés en régime dynamique. G' [1Hz] désigne la moyenne géométrique des G' des différentes cellules mesurés à 1Hz.

Pour tous les types cellulaires nous avons obtenu des modules viscoélastiques répondant en loi puissance de la fréquence. Les exposants respectifs des modules d'élasticité et de perte restent dans la gamme $\alpha \in [0.15, 0.20]$ et $\beta \in [0.20, 0.30]$, toujours avec $\beta > \alpha$.

c) Discussion

Les propriétés microrhéologiques de différents types cellulaires ont été testées avec notre système de pinces optiques dynamiques dans une gamme de fréquences englobant des fréquences dites physiologiques (respiration, contraction). Un comportement en loi de puissance a été observé à la fois pour le module élastique et pour le module de perte sur cellules individuelles.

La seule différence notable entre types cellulaires semble être, d'un point de vue mécanique, une rigidité à fréquence fixe (*i.e.* une rigidité intrinsèque) du cytosquelette. Cette rigidité nous le savons repose essentiellement sur l'actine et ses partenaires biochimiques.

Le cytosquelette, bien qu'en remodelage permanent, possède une organisation spatiale dépendante du type cellulaire, permettant de différencier « grossièrement » un état voire un type cellulaire. Au regard des lignées testées dans ce travail, on peut alors suggérer que les propriétés mécaniques intrinsèques de cellules individuelles sont liées directement à leur fonctionnalité et à la distribution spatiale de leur réseau d'actine.

On se demande alors quel mécanisme régule cette distribution spatiale, différenciant ainsi un type cellulaire de l'autre. Existe-t-il une corrélation avec l'organisation spatiale tissulaire ? Est-ce le même mécanisme qui est responsable de la formation de cils ou de villosités pour certains d'entre eux ? Les contraintes cycliques que subissent les cellules épithéliales alvéolaires par exemple participent-elles de façon rétroactive à cette régulation ?

D'un point de vue plus physique, ce comportement en loi puissance des modules viscoélastiques est assez courant dans les fluides complexes [Henon & coll., 2002][Mason & coll., 1995] comme les micelles, les solutions de polymères ou bien les suspensions colloïdales. Ces comportements en loi puissance reflètent une large distribution de temps de relaxation dans ces systèmes non-actifs. L'exposant α de ces lois représente le degré de fluidité du système : α varie de 0 pour un système purement élastique à 1 pour un fluide purement visqueux. D'un point de vue très simpliste, ne prenant pas en compte l'activité biologique de la cellule, le milieu intracellulaire pourrait être assimilé à ce type de fluides complexes. En effet, cette description peut sembler adéquate dans le cas de solution diluée d'actine *in vitro*, où l'on mesure également des lois puissance avec des exposants autour de 0,75 [Amblard & coll., 1996].

Bien sûr, la dynamique à l'intérieur d'une cellule doit prendre en compte l'aspect hors-équilibre de son activité biochimique. Dans une approche plus élaborée, le cytoplasme est comparé aux « matériaux vitreux mous » [Lequeux & coll., 2001], une classe de matériau caractérisé par du désordre et de la métastabilité. Cette gamme de matériaux possède une grande dynamique hors équilibre. Elle inclue les mousses, les pâtes et les granulaires dont des mécanismes dissipatifs sont contrôlés par des processus actifs non visqueux. En supposant que la distribution des temps de relaxation est une loi puissance de ces temps dans ces milieux, on prévoit que les modules élastique et de perte varient en loi puissance de la fréquence, ce qui est compatible avec les données expérimentales.

Cependant ce modèle est basé sur des hypothèses assez générales, et le lien avec des mécanismes microscopiques régulant la dynamique du cytosquelette n'est pas explicite. De plus, un modèle aussi général ne prévoit pas de légères déviations à la loi puissance standard, comme le

fait que nous trouvons pour le module de perte un exposant toujours légèrement supérieur à celui du module élastique par exemple. Des modèles plus phénoménologiques existent, ceux-ci sont basés sur la réponse théorique linéaire d'un gel actif, prenant en compte la dynamique de polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine, et l'activité des moteurs moléculaires. Ces modèles nous semblent plus appropriés à la description d'un réseau cytosquelettique actif **[Kruse & coll., 2004]**.

Un point de vue globalement partagé voit l'état mécanique de la cellule comme intermédiaire entre celui d'un solide élastique et d'un fluide visqueux. Le comportement solide étant lié au cytosquelette lui-même (responsable des générations de force et du maintien de la forme de la cellule), et un comportement liquide que l'on voit apparaître lors des processus d'adhésion, de migration **[Felder & coll., 1990]** et de division liés à la réorganisation dynamique du cytosquelette. De plus, il a été suggéré que les polymères du cytosquelette devaient subir une transition sol-gel **[Tempel & coll., 1996]**, donnant au cytosquelette un comportement fluide dans certaines circonstances (phase sol), et solide dans d'autres (phase gel). Le modèle de matériau vitreux mou couplé avec les observations récentes n'est pas en accord avec cette théorie de la transition sol-gel. En effet les matériaux vitreux mous **[Lequeux & coll., 2001]** sont proches de la transition vitreuse qui est un processus hors équilibre contrairement à la transition sol-gel qui elle est liée à un processus à l'équilibre.

Ainsi, il est suggéré que le désordre structurel et la métastabilité soient des éléments essentiels à la description des propriétés microrhéologiques des cellules eucaryotes. Afin de tester la robustesse de cette théorie nous avons décidé de perturber des éléments essentiels de cette réponse : réseau d'actine, moteurs moléculaires, pour mesurer la contribution respective de certains acteurs protéiques de l'activité du réseau cytosquelettique.

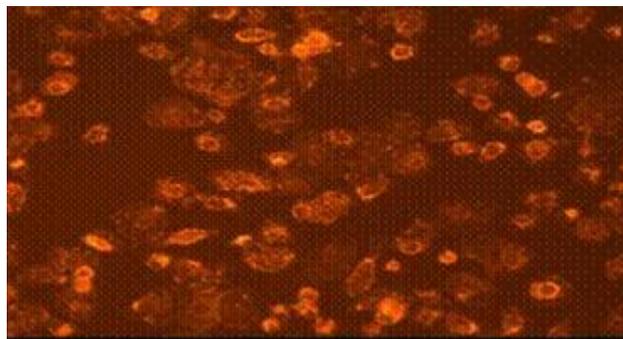
4. Rôle de la polymérisation de l'actine

a) Introduction

Il est aujourd'hui possible grâce aux progrès combinés de la biologie cellulaire et moléculaire, d'interférer avec certains processus cellulaires en utilisant des mutations ou des anticorps inhibiteurs. Dès les années 70, alors que ces méthodes n'étaient pas encore appliquées, on savait déjà dépolymériser le cytosquelette d'actine en utilisant des toxines fongiques. En effet, certaines toxines fongiques comme la cytochalasine B (ou son dérivé plus puissant, la cytochalasine D) ont pour propriété de déstabiliser l'équilibre monomère-polymère. La cytochalasine D, alcaloïde de champignon, s'attache au bout + du filament d'actine et provoque ainsi sa dépolymérisation. Les protomères ne pouvant plus s'attacher au bout +, la concentration critique de polymérisation/dépolymérisation devient celle du bout – et les filaments se démantèlent.

b) Mesures sur cellules épithéliales traitées à la cytochalasine D

Nous avons utilisé de la cytochalasine D au laboratoire pour nos expériences. Tout d'abord nous avons vérifié quel était son effet sur les cellules épithéliales et leur cytosquelette d'un point de vue structural. Pour cela nous avons cultivé une lignée stable de cellules épithéliales dont nous avons marqué le cytosquelette d'actine à la rhodamine phalloïdine. Les cellules, déposées sur lamelles de verre, sont immergées dans du milieu de culture auquel nous avons ajouté de la cytochalasine D en concentration milliMolaire. Une image caractéristique obtenue en microscopie de fluorescence est présentée ci-dessous [figure 3.29].



**Figure 3.29 : Image en microscopie de fluorescence de cellules épithéliales marquées à la rhodamine-phalloïdine et traitées à la cytochalasine D.
Grossissement $\times 20$**

La présence ou non de fibres de stress est difficilement évaluable sur ces images. Celles-ci jouant un rôle fondamental dans la réponse mécanique des cellules ; des clichés au microscope confocal sur ces mêmes cellules nous ont permis de trancher cet argument. Les deux images suivantes présentent le cytosquelette d'actine d'une cellule non traitées à la cytochalasine D et l'autre traitée à une concentration milliMolaire pendant 6 minutes.

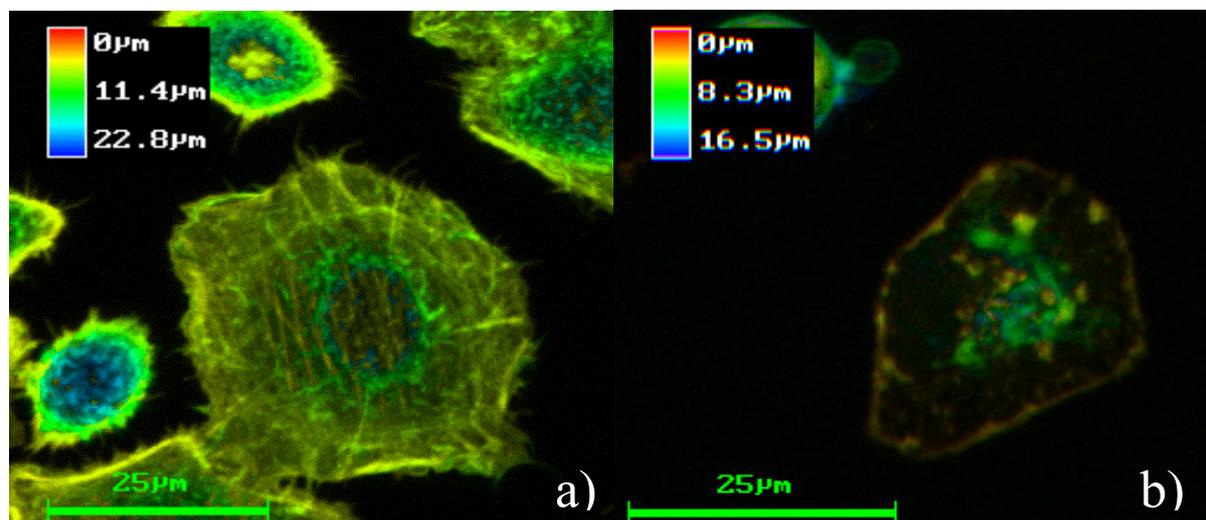


Figure 3.30 : a) cellules épithéliales en culture marquées à la rhodamine phalloïdine, cliché obtenu par superposition d'images en coupe de microscopie confocale
b) Image identique pour des cellules traitées à la cytochalasine D.

Les images obtenues avec le microscope confocal [figure 3.30] nous montrent qu'il n'y a plus présence de filaments d'actine au sein de la cellule. Six minutes d'action à une concentration milliMolaire suffisent donc pour tester la réponse mécanique de cellule dont le cytosquelette est dépolymérisé. Le même protocole que pour les expériences précédentes a été utilisé. Cependant une étape a été rajoutée. Après les 30 minutes de mise en contact des billes avec les cellules nous avons ajouté de la cytochalasine D au milieu de culture pendant 6 minutes. La lamelle est alors fixée comme précédemment à la cale piézoélectrique pour les expériences de sollicitations dynamiques. Une courbe moyenne obtenue pour six cellules est présentée ci-dessous [figure 3.31].

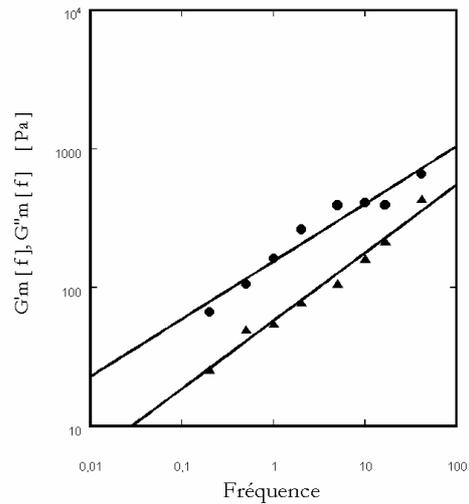


Figure 3.31 : Courbes moyennes effectuées sur 6 cellules épithéliales de la lignée A549
L'ajustement de G' et de G'' donne des lois puissances d'exposant respectif 0.42 et 0.49
module élastique (rond), module de perte (triangle)

On peut comparer les courbes obtenues avec celles issues de la moyenne des cellules épithéliales non traitées en superposant les courbes sur le même graphique.

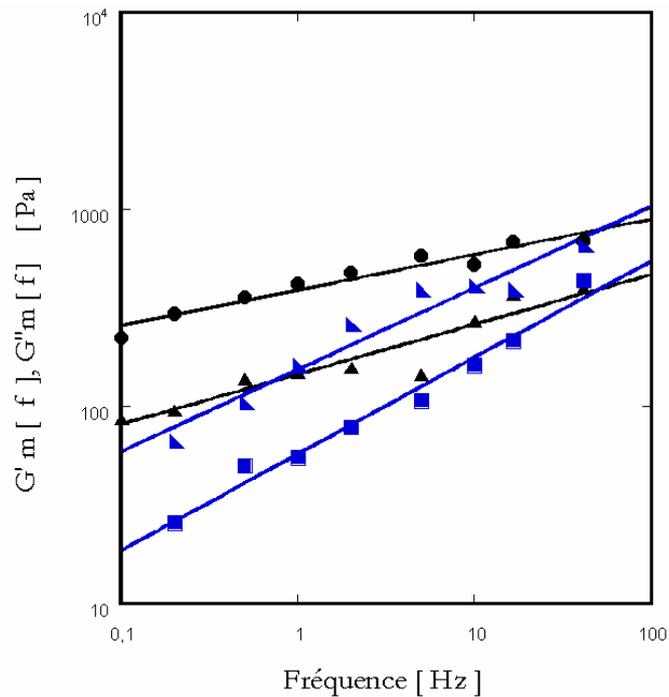


Figure 3.32 : Courbes comparatives des mesures effectuées sur les cellules épithéliales,
courbes noires (cellules non traitées) : module élastique (rond), module de perte (triangle),
courbes bleues (cellules traitées cytoD) : module élastique (triangle), module de perte (carré)

c) Discussion

La dépolymérisation des filaments avec la cytochalasine D a pour conséquence d'abaisser la valeur de $G'[\text{f}]$ et de $G''[\text{f}]$, $\langle G'_{\text{épi}}[\text{1Hz}] \rangle \approx 170\text{Pa}$ ($\approx \langle G'_{\text{épi}}[\text{1Hz}] \rangle / 3$), et en même temps d'augmenter les exposants des deux lois puissance, $\alpha_m = 0.44$ et $\beta_m = 0.55$. Ceci signifie que les cellules sans actine-F deviennent beaucoup moins rigides et que la dissipation au sein de celles-ci augmente drastiquement. Sachant que la cytochalasine D dépolymérise spécifiquement la F-actine, ces données ne peuvent pas être expliquées par une modification de la dynamique des récepteurs membranaires ni par une altération des propriétés mécaniques de la membrane plasmique. Elles montrent en revanche que les billes transmettent les efforts au cytosquelette par l'intermédiaire des complexes adhésifs et que celui-ci est déformé lorsque les billes se déplacent à chaque oscillation. Ceci confirme donc que le module complexe G^* mesuré reflète bien les propriétés mécaniques du cytosquelette. Ce point de vue peut être complété par les expériences effectuées dans le groupe de Jeffrey Fredberg à Boston qui a utilisé des billes traitées avec de l'acLDL (acetylated low density lipoprotein) afin que celles-ci ne forment pas de complexes d'adhésion avec les cellules. Ils ont trouvé des modules de G' et de G'' 5 fois inférieurs à ceux obtenus pour les billes collées aux intégrines et également une faible réponse à l'utilisation de drogues contractiles du cytosquelette comme l'histamine.

Cependant, plusieurs questions sont encore en suspens. Nous avons mesuré la réponse viscoélastique de cellules individuelles, celle-ci suit une loi puissance de la fréquence, signant ainsi une distribution continue de temps de relaxation. La pertinence de ces mesures a été validée par les tests effectués grâce à la cytochalasine D. Il reste à comprendre quels sont les mécanismes à l'origine d'une dissipation si particulière au sein de la cellule.

5. Rôle des moteurs moléculaires dans la réponse mécanique des cellules pré-musculaires

Il est fondamental, pour comprendre la dynamique du cytosquelette d'actine, de pouvoir identifier de façon précise les contributions respectives des différents mécanismes dissipatifs régnant au sein de la cellule. Comment la dynamique de polymérisation de l'actine, le degré de réticulation du réseau ou encore l'activité des moteurs moléculaires participent à la dissipation de l'énergie au sein de la cellule ? Concernant la dynamique des filaments, les expériences à la cytochalasine D, montrent que la déstabilisation des filaments d'actine rend le réseau à la fois moins rigide, d'un facteur 3 pour nos expériences, et plus fluide. L'influence du degré de réticulation du réseau a été étudiée par Wagner [Wagner & coll., 1999] qui a montré que l'ajout d'un agent réticulant type α -actinine au sein d'un gel d'actine *in vitro* entraîne un changement de rigidité uniquement pour les grands taux de déformation. De plus ce complexe, en liant les filaments les uns aux autres, stimule le taux de polymérisation de l'actine tout en créant des nœuds inter-filaments. Il augmente ainsi à la fois la densité et le degré de réticulation du réseau. Si l'on mesure le module élastique d'une solution d'actine en présence d' α -actinine, il peut être, à une fréquence donnée, 40 fois supérieur à celui d'une solution purifiée d'actine à la même concentration. Le réseau est cependant plus visqueux prouvant ainsi que l' α -actinine crée des liens dynamiques entre les filaments d'actine.

Le rôle des moteurs moléculaires dans la réponse mécanique du cytosquelette quant à lui, est loin d'être élucidé. Des études récentes [Legoff & coll., 2002] ont montré que le module complexe de gels d'actine *in vitro* possédait également une dépendance temporelle et évoluait en loi puissance de la fréquence avec un exposant de 0.75 dans l'état passif. Dans l'état actif, c'est à dire celui où les myosines sont ATP-activées, l'exposant de la loi puissance passe de 0.75 à 0.87. Ceci signifie que, *in vitro*, l'activité du complexe acto-myosine [Svitkina & coll., 1997] augmente les fluctuations longitudinales des filaments, et rend la réponse du gel plus proche de celle d'un fluide purement visqueux. A notre connaissance, aucune étude n'a été reportée à ce jour sur la réponse microrhéologique du cytosquelette d'actine en cellule vivante, en bloquant ou en activant spécifiquement le complexe acto-myosine.

a) Principe des expériences

L'étude du rôle du complexe acto-myosine dans les mécanismes dissipatifs intra-cellulaire nous a poussé naturellement à approfondir notre approche sur la lignée des cellules pré-

musculaires. En effet, les proportions respectives d'actine et de myosine II dans ces cellules sont supérieures à celles de nombreuses autres lignées, les rendant ainsi, du fait de leur constitution et de leur fonction contractile, un modèle de choix pour cette étude. La culture cellulaire et le protocole expérimental suivi sont les mêmes que ceux utilisés pour les expériences précédentes.

b) Inhibition spécifique des myosines II

La myosine II est le moteur protéique qui sous-tend la contraction musculaire [Jay & coll., 1995]. La myosine II, présente dans la majorité des types cellulaires, est en concentration plus importante dans les cellules musculaires. La motilité de ces cellules devait donc résulter d'un mécanisme rappelant la contraction musculaire. Nous avons donc décidé de cibler notre étude sur la réponse mécanique du squelette cellulaire dans lequel les myosines II seraient inactivées.

Comme inhibiteur du complexe acto-myosine, nous avons utilisé un outil moléculaire dont la cible spécifique est la myosine II. Il a été montré [Straight & coll., 2003] que la blebbistatine agit spécifiquement sur les myosines II, en inhibant leur activité ATPasique et en abaissant de façon notable la motilité de glissement des myosines dans des cellules plaquettaires. Nous avons utilisé un mélange racémique des deux énantiomères (\pm)- blebbistatine (Fisher BioBlock Scientific, Illkirch FR) à une concentration de 75 $\mu\text{m}/\text{l}$, maintenue dans du DMSO. Cette concentration a été mesurée à partir du spectre d'absorbance de la solution (coefficient d'extinction 0.58 à 422 nm d'émission) conformément aux données fournies par les auteurs. A cette concentration, l'activité ATPasique des myosines II est réduite à 5% de sa valeur initiale, et la motilité de glissement des filaments à 20%.

c) Mesures sur cellules

Nous avons comme précédemment, mesuré pour chaque cellule à la fois le module élastique et le module de perte en fonction de la fréquence de sollicitation, dans la gamme $0.05 < f < 41.5$ Hz. Une courbe typique est présentée sur la figure 3.33 en échelle logarithmique, pour une cellule unique de la lignée pré-musculaire C2.

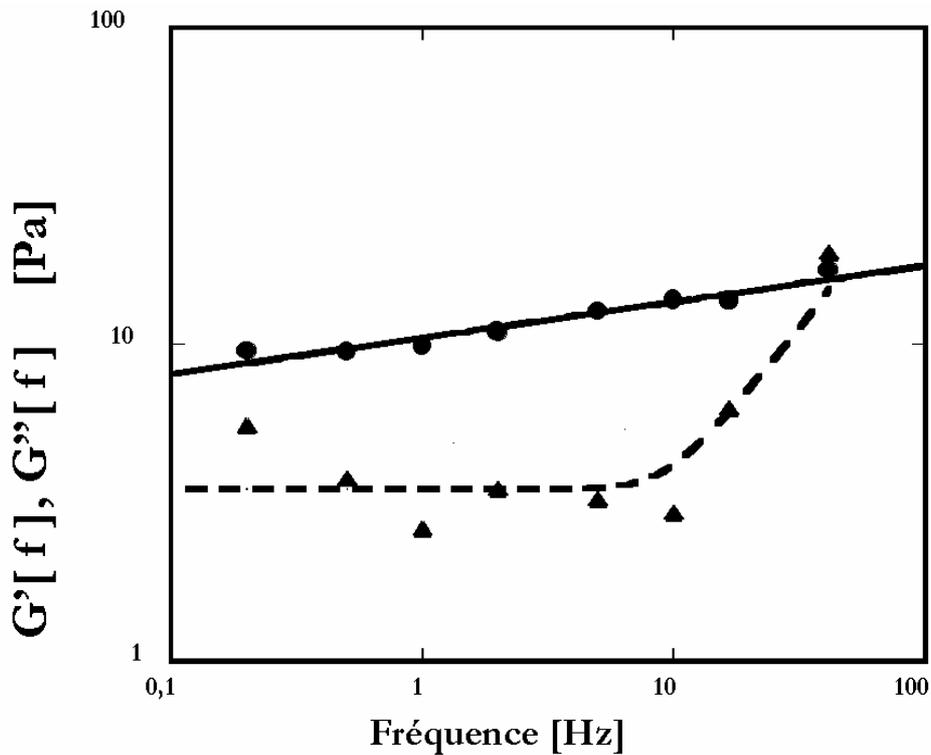


Figure 3.33 : Courbe de réponse d'une cellule unique dont les myosines II ont été inhibées par l'utilisation de blebbistatine à une concentration de $75 \mu\text{M}$ module élastique (rond), module de perte (triangle)

La réponse microrhéologique des cellules traitées à la blebbistatine est tout à fait différente de celle obtenue pour des cellules non perturbées. Le module élastique $G'[f]$ suit toujours une loi puissance de la fréquence avec un exposant plus faible que précédemment, ici autour de 0.11. D'un autre côté, le module de perte semble être constant dans la gamme 0.1 – 10 Hz, et croit rapidement lorsque la fréquence dépasse 10 Hz. Nous avons observé le même comportement pour un groupe de 15 cellules testées. La courbe représentant la moyenne géométrique de ces mesures est annexée ci-dessous [figure 3.34].

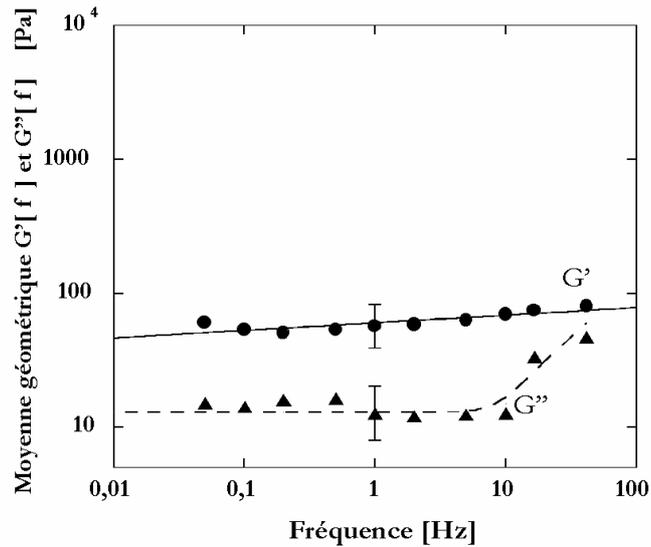


Figure 3.34 : Courbes $G'[f]$ et $G''[f]$ du réseau cytosquelettique pour des cellules traitées à la blebbistatine. Les courbes représentent une moyenne sur 15 cellules. L'exposant des moyennes est réduit pour G' à 0,07, module élastique (rond), module de perte (triangle)

On retrouve le même comportement sur les valeurs issues des moyennes. La valeur moyenne de l'exposant de $G'[f]$ est $0,07 \pm 0,02$, et le module de perte moyen est comparable à celui mesuré pour les cellules individuelles. Un histogramme donnant la statistique des exposants du module élastique est présenté ci-dessous [figure 3.35].

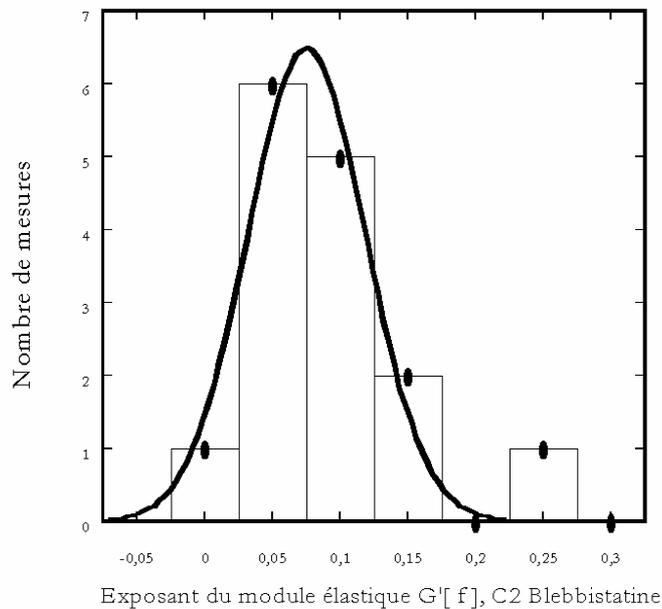


Figure 3.35 : Histogramme récapitulatif des exposants du module élastique Pour les cellules traitées à la blebbistatine 75 μM .

Qu'en est il des préfacteurs des lois puissances obtenues ? L'histogramme ci-dessous représente la statistique des $G' [1\text{Hz}]$ pour les cellules perturbées [figure 3.36].

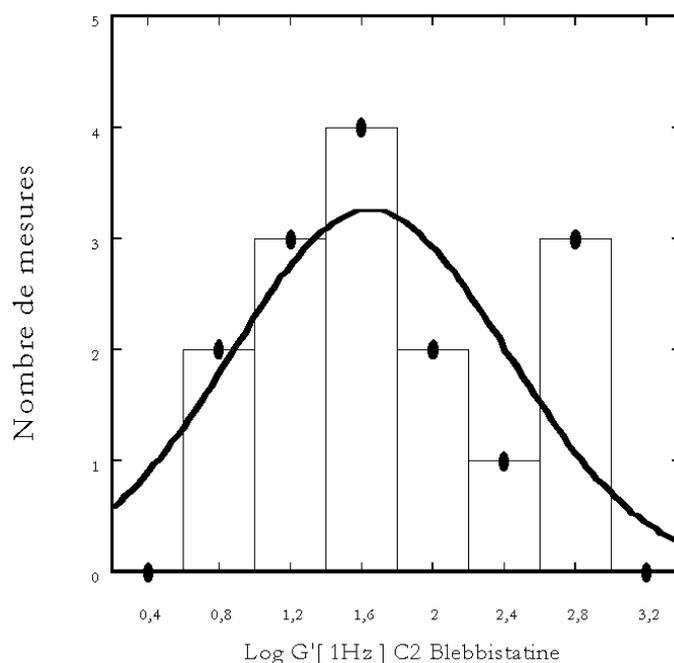


Figure 3.36 : Histogramme récapitulatif des $G' [1\text{Hz}]$

Le comportement individuel des cellules est bien retrouvé pour les moyennes statistiques effectuées. Le module moyen $G'_m [f]$ est ajusté par une loi puissance, avec un exposant moyen $\alpha'_m = 0.06$, inférieur de façon significative à celui trouvé pour les cellules « saines ». En revanche, $G''_m [f]$ reste constant dans la gamme 0.05 – 10 Hz. Les valeurs de G'_m et de G''_m à $f=1\text{Hz}$ sont respectivement : $G'_m [1\text{Hz}] = 57 \pm 22 \text{ Pa}$ et $G''_m [1\text{Hz}] = 13 \pm 6 \text{ Pa}$. Ces deux valeurs sont près de 10 fois inférieures à celle obtenues pour les cellules non perturbées.

Ces différences entre les deux populations cellulaires sont une signature tout à fait nette de l'activité du complexe acto-myosine.

d) Discussion

La réponse mécanique obtenue pour des cellules non traitées a été analysée en détail, dans le cas des cellules traitées à la blebbistatine. La réponse micro-mécanique se rapproche beaucoup plus de celle d'un solide purement élastique. En effet, les exposants moyens pour $G' [f]$ sont passés de 0.19 à 0.06, et de 0.25 à 0 dans la gamme de fréquence 0.05 – 10 Hz pour $G'' [f]$. Cependant, les cellules de contrôle sont beaucoup plus rigides que celles traitées, la valeur de G'

1Hz] étant presque 10 fois supérieure dans le premier cas. Ceci peut être expliqué en analysant le mécanisme par lequel la blebbistatine inhibe l'activité du complexe actine-myosine.

Il a été montré que la blebbistatine agit sur la myosine II [Straight & coll., 2003] en inhibant son activité ATPasique. Ainsi, avec cet outil moléculaire, l'ATP est beaucoup moins facilement hydrolysée et reste donc accrochée à la tête de myosine beaucoup plus longtemps que dans les expériences de contrôle. L'effet de la blebbistatine n'est donc pas seulement d'abaisser l'activité motrice des myosines, mais il est aussi d'un point de vue plus structural de garder les têtes de myosine plus longtemps détachées des filaments d'actine. Ainsi on peut comprendre que la blebbistatine rend le réseau d'actine plus élastique, en empêchant les filaments de glisser, inhibant ainsi ce processus de dissipation active. Simultanément le réseau est rendu moins rigide par une diminution induite du nombre moyen de nœuds de réticulations. Cette interprétation est en bon accord avec les données expérimentales. Un schéma décrivant cette interprétation a été représenté ci-dessous [figure 3.37].

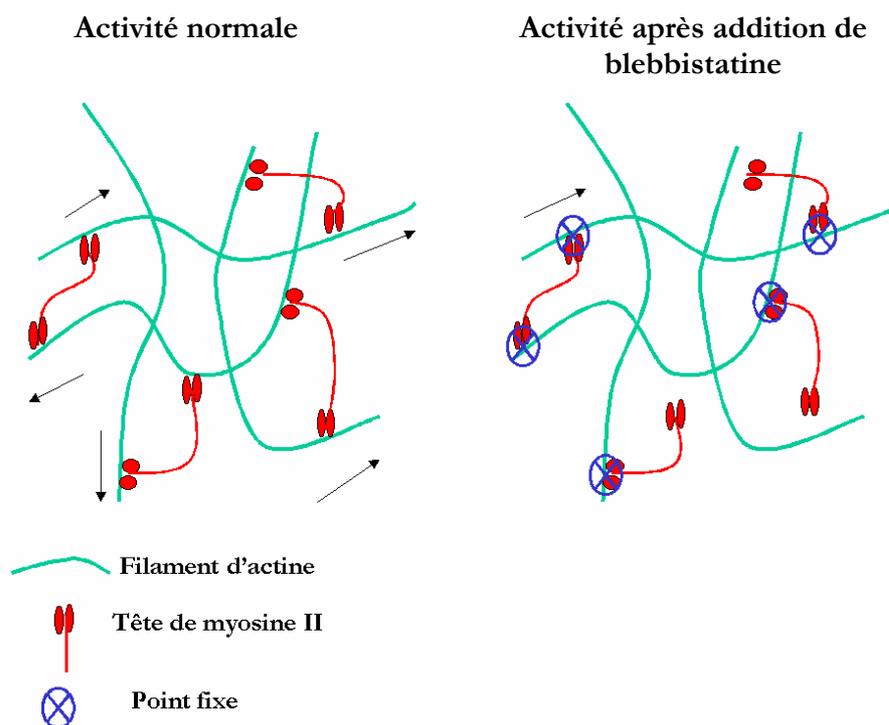


Figure 3.37 : Schéma explicatif de l'action de la blebbistatine sur le réseau d'actine.

Il est intéressant de noter que ces résultats peuvent être également mis en parallèle avec des expériences effectuées sur des gels d'actine *in vitro* en présence de myosines [Legoff & coll., 2002]. Dans ces manipulations, le complexe acto-myosinique passe d'un état dit actif à celui dit

de *rigor* lorsque l'ATP est déplété, et l'exposant α de la loi puissance, diminue. En parallèle, Legoff observe que le module de G^* augmente, car la déplétion d'ATP dans le milieu entraîne que la myosine reste attachée aux filaments d'actine, augmentant ainsi en moyenne le nombre de nœuds de réticulation et la rigidité du réseau.

Enfin, commentons brièvement le comportement de $G''[f]$ que nous mesurons pour les fréquences supérieures à 10Hz. La croissance rapide du module de perte au delà de 10Hz suggère que les mécanismes dissipatifs dans cette gamme de fréquence sont dominés par des effets de viscosité. En ajustant le module de perte pour des fréquences supérieures à 10Hz avec l'équation constitutive d'un amortisseur visqueux : $G''[f] = 6 \pi \eta f$, on trouve une viscosité $\eta = 0.07$ Pa.s. Cette valeur est comparable avec celle obtenue pour des mesures de viscosité intrinsèques du cytosol [Yamada & coll., 2000][Fabry & coll., 2001][Wilhelm & coll., 2003].

Pour conclure, la comparaison des comportements mécaniques des réseaux d'actine représentée dans la figure 3.37 nous suggère qu'une grande part des mécanismes dissipatifs intracellulaires ont été inhibés par l'ajout de blebbistatine. Le module élastique voit sa pente grandement diminuée de 0.20 à 0.07, alors que le module de perte diminue drastiquement devenant quasi-indépendant de la fréquence, pour suivre un comportement de fluide visqueux aux hautes fréquences. Ceci suggère que, dans une cellule vivante, l'activité du complexe actine-myosine est une source essentielle de dissipation active d'énergie liée à la déformation, du moins pour le type cellulaire des myoblastes et dans la gamme de fréquence que nous avons explorée. Ainsi modélisée, la contribution de ce mécanisme moléculaire dans la réponse mécanique du réseau cytosquelettique pourrait mettre en accord les modèles structuraux avec les modèles de matériaux vitreux mous. Si toutefois ce modèle permet de décrire un système hors-équilibre, dans lequel la relaxation des contraintes est gouvernée par un processus de dissipation active.

Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons montré que l'utilisation de pinces optiques a permis une étude quantitative de la visco-élasticité du réseau cytosquelettique cellulaire dans différents régimes. Les forces appliquées ainsi que les conditions expérimentales sont parfaitement contrôlées, cette technique s'est donc révélée tout à fait capable de remplir le cahier des charges requis pour des mesures microrhéologiques cellulaires. Nous avons pu vérifier que la réponse mécanique d'un myoblaste unique était identique à celle obtenue sur un ensemble de cellules moyennées. Dans des conditions de mesures « normales », c'est à dire pour des lignées cellulaires non modifiées biochimiquement, le module complexe des différents types cellulaires testés suit une loi puissance de la fréquence dans la gamme $0.05 < f < 50$ Hz:

$$G^* = G' + iG''$$

$$\text{Avec } G' = G'_0 f^\alpha$$

$$\text{et } G'' = G''_0 f^\beta$$

G^* : module complexe

f : fréquence

Les deux exposants α et β du module complexe, module de perte et d'élasticité, sont proches et évoluent dans une gamme allant de 0,15 à 0,30. Bien que la norme du module d'élasticité soit supérieure à celle du module de perte, son exposant semble être toujours un peu plus faible. Ce comportement en loi de puissance déjà observé expérimentalement sur d'autres matériaux complexes comme les mousses, les émulsions, les pâtes ou encore les solutions colloïdales fait l'objet de différentes approches de modélisation. L'apparition de cette loi puissance révélant une distribution continue de temps de relaxation a définitivement mis fin au formalisme discret des modèles viscoélastiques simples. Deux grandes classes de modèles s'attachent à décrire le comportement mécanique de cellules vivantes, les modèles structuraux et les modèles comportementaux. La première a l'avantage d'explorer par des hypothèses de structures l'architecture physique du réseau, la deuxième famille, elle, a permis d'une part de révéler l'effet de continuum apparaissant dans ces structures, et de fournir un support théorique à la dynamique de réorganisation spatiale des filaments du cytosquelette.

En modifiant le cytosquelette par différents traitements biochimiques, nous avons tenté de rapprocher ces deux approches théoriques. Le traitement du cytosquelette à la cytochalasine D nous a permis de valider la fiabilité de nos mesures et de confirmer le rôle de support mécanique du cytosquelette d'actine dans l'architecture cellulaire. L'addition de blebbistatine, inhibiteur de l'activité du complexe actine-myosine II, a rendu le cytosquelette des cellules pré-musculaires à la fois moins rigide et plus proche du comportement d'un solide élastique. Notre interprétation de ce résultat est que le glissement des filaments entre eux, provoqué par les myosines, est la source principale de dissipation d'énergie dans ce type cellulaire. Les données expérimentales obtenues pour les lignées de contrôles sont en accord avec le modèle de matériau vitreux mou. Cependant celui-ci ne prévoit pas un tel écart à la loi puissance pour les cellules traitées à la blebbistatine. L'interprétation structurelle que nous avons formulée pour expliquer l'action de la blebbistatine sur le réseau d'actine est en bonne corrélation avec les données expérimentales. Ainsi nous souhaiterions voir apparaître des prédictions issues de modèles plus phénoménologiques, prenant en compte le rôle dissipatif des myosines II dans la dynamique du cytosquelette.

Bibliographie

Adams, R.J., Pollard T.D., Binding of myosin I to membrane lipids. *Nature*, **340** :565-568, 1989.

Alberts, B. & coll., *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc., 1994.

Albrecht-Buehler, G.. Role of cortical tension in fibroblast shape and movement. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **7** :54-67, 1987.

Albrecht-Buelher, G., Autonomous movements of cytoplasmic fragments. *Proceedings of National Academy of Science USA*, **77** :6639-6643, 1980.

Alcaraz, J. & coll., Microrheology of human lung epithelial cells measured by atomic force microscopy. *Biophysical Journal*, **84** :2071-2079, 2003.

Amblard, F. & coll., Subdiffusion and anomalous local viscoelasticity in actin networks. *Physical Review Letters*. **18** 77(21): 4470-4473, Nov 1996.

An, S. & coll., Stiffness changes in cultured airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **283**: C792-C801, May 2002.

Ashkin, A., Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers. *PNAS*. **13** :94(10) :4853-60, May 1997.

Ashkin, A., The study of cells by optical trapping and manipulation of living cells using infrared laser beams. *ASGSB Bull.* **4**(2) :133-46, Jul 1991.

Balland, M., Richert, A., Gallet, F., The dissipative contribution of myosin II in the cytoskeleton dynamics of myoblasts. *Eur. Biophys. J.* **in press** 2005

Bamburg, J.R., Proteins of the ADF / cofilin family : essential regulators of actin dynamics. *Annual Review of Cell Developmental Biology*, **15** :185-230, 1999.

Bamburg, J.R., McGough, A., Ono, S., Putting a new twist on actin : ADF / cofilins modulate actin dynamics. *Trends in Cell Biology*, **9** :364-370, 1999.

Bausch, A. & coll., Local measurements of viscoelastic parameters of adherent cell surfaces by magnetic bead microrheometry. *Biophysical Journal*, **75** :2038-2049, 1998.

Bausch, A.R. & coll, Measurements of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers. *Biophysical Journal*, **76** :573-579, 1999.

Bausch, A.R. & coll., Rapid stiffening of integrin receptor-actin linkages in endothelial cells stimulated with thrombin: a magnetic bead microrheology study. *Biophysical Journal*. **80**(6): 2649-57, Jun 2001.

Beil, M., Sphingosylphosphorylcholine regulates keratin network architecture and viscoelastic properties of human cancer cells. *Nature Cell Biology*, **5** :803-811, 2003.

Belmont, L., Mitchison, T., Deacon, H.W., Catastrophic revelations about Op18/stathmin. *Trends in Biology Science*, **21** :197-198, 1996.

Bershadsky, A.D., Balaban, N.Q., Geiger, G., Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **19** :677-695, 2003.

Blanchard, A., Ohanian, V., Critchley, D., The structure and function of alpha-actinin. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, **10** :280-289, 1989.

Butler, J.P. & coll., Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings. *Am. J. Physiol. Cell.* **282(3)**: C595-605, Mar 2002.

Caspi, A., Granek, R., Elbaum, M., Enhanced diffusion in active intracellular transport. *Physical Review Letter*. **25;85(26 Pt 1)**:5655-8, Dec 2000.

Chen, C.S. & coll., Cell shape provides global control of adhesion assembly. *Biochemical and Biophysical research Communications*, **307** :355-361, 2003.

Chen, J. & coll., Twisting integrin receptors increases endothelin-1 gene expression in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell.* **280(6)**: C1475-84, Jun 2001.

Chicurel, M.E. & coll., Integrin binding and mechanical tension induce movement of mRNA and ribosomes to focal adhesions. *Nature*. **16;392(6677)**: 730-3, Apr 1998.

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

Cooke, R., The mechanism of muscle contraction. *CRC Critical Review of Biochemistry*, **21** :53-118, 1986.

Couarraze, G., Grossiord, J.L., *Initiation à la Rhéologie* . **Lavoisier Tech. et Doc**, 2000.

Coughlin, M.F., Stamenovic, D., A prestressed Cable network model of the adherent cell cytoskeleton. *Biophysical Journal*, **84** :1328-1336, 2003.

Crocker, J.C., Two-point microrheology of inhomogeneous soft materials. *Physical Review Letters*, **85** :888-891, 2000.

Dahl, K.N. & coll., The nuclear envelope lamina network has elasticity and a compressibility limit suggestive of a molecular shock absorber. *Journal of Cell Science*, **117** :4779-4786, 2004.

Danowski, B.A. & coll., Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes. *Journal of Cell Biology*, **118** :1411-1420, 1992.

Delanoë-Ayari, H. & coll., Membrane and acto-myosin tension promote clustering of adhesion

proteins. *Proceedings of the national Academy of Science USA.*, **101** :2229-2234, **2004**.

Desprat, N. & coll., Creep function of a single living cell, *Biophys. J.*. **88(3)**:2224-33, **Dec 2004**.

Dichtl, M.A., Sackmann, E., Microrheometry of semiflexible actin networks through enforced single-filament reptation: frictional coupling and heterogeneities in entangled networks. *PNAS*. **14;99(10)**:6533-8, **May 2002**.

Dong, C., Skalak, R., Sung, K.L., Cytoplasmic rheology of passive neutrophils. *Biorheology.*, **28** :557-567, **1991**.

Drechsel, D.N. & coll., Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Molecular Biology of the Cell*, **3** :1141-1154, **1992**.

Evans, E.A., Membrane viscoelasticity. *Biophysical Journal*, **16** :1-11, **1976**.

Evans, E.A., Yeung, A., Apparent viscosity and cortical tension of blood granulocytes determined by micropipet aspiration. *Biophysical Journal*, **56** :151-160, **1989**.

Fabry, B. & coll., Scaling the microrheology of living cells. *Physical Review Letters.*, **87** :148102 1-4, **2001**.

Fabry, B. & coll., Selected contribution: time course and heterogeneity of contractile responses in cultured human airway smooth muscle cells. *Journal of Applied Physiology.*, **91** :964-994, **2001**.

Fabry, B., Remodeling of airway smooth muscle cell : are we built of glass? *Respiratory Physiology and Neurobiology*, **137** :109-124, **2003**.

Fabry, B. & coll., Time scale and other invariants of integrative mechanical behavior in living cells. *Physical Review E.*, **68** :0419141-17, **2003**.

Farge, E., Mechanical induction of twist in the drosophila foregut/stomodaeal primordium. *Current Biology*, **13** :1365-1377, **2003**.

Felder, S., Elson, E.L., Mechanics of fibroblast locomotion: quantitative analysis of forces and motions at the leading lamellas of fibroblasts. *Journal of Cell Science.*, **111** :2513-2536, **1990**.

Feynman, Electromagnétisme 1, **InterEditions 2000**.

Fuchs, E., Weber, K., Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease. *Annual review of Biochemistry*, **63** :145-182, **1994**.

Fung, Y.C., *Biomechanics: mechanical properties of living tissus*. **Springer- Verlag, 1984**.

Gardel, M.L. & coll., Microrheology of entangled f-actin solutions. *Physical Review Letters.*, **91** :158302 1-4, **2003**.

Giancotti, F.G., Ruoslahti, E., Integrin signaling. *Science*, **285** :1028-1032, 1999.

Gisler, T., Scaling of the microrheology of semidiluted F-Actin solutions. *Physical Review Letters*. **82**: 1606-1609, Feb 1999.

Gittes, F. & coll., Microscopic viscoelasticity : shear moduli of soft materials determined from thermal fluctuations. *Physical Review Letters*., **79** :3286-3289, 1997.

Gittes, F., Schmidt, C.F., Signals and noise in micromechanical measurements. *Methods in Cell Biology*. **55**, 129-156, 1998.

Gittes, F., Dynamic shear modulus of a semi-flexible polymer networks. *Physical Review E*., **58** :1241-1244, 1998.

Glogauer, M. & coll., Calcium ions and tyrosine phosphorylation interact coordinately with actin to regulate cytoprotective response to stretching. *Journal of Cell Science*., 110 :11-21, 1997.

Goldmann, W.H., Ezzell, R.M., Viscoelasticity in wild type and vinculin-deficient (5.51) mouse F9 embryonic carcinoma cells examined by atomic force microscopy and rheology. *Exp. Cell Res.*. **226(1)**: 234-7, Jul 1996.

Guck, J. & coll., The optical stretcher : a novel laser tool to micromanipulate cells. *Biophysical Journal*, **81** :767-784, 2001.

Guck, J. & coll., Optical deformability of soft biological dielectrics. *Physical Review Letter*. **5**;84(23) :5451-4, Jun 2000.

Henon S., Cabane B. Liquides, solutions, dispersions, emulsions, gels. *Editions Belin*. Nov 2002

Happel, J., Brenner, H., Low Reynolds number hydrodynamics, **Springer Publishers 1981**

Henon, S. & coll., A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers. *Biophysical Journal*. **76** :1145-51, Feb 1999.

Hubmayr, R.D., Biology lessons from oscillatory cell mechanics. *J. Appl. Physiol.*. **89(4)**: 1617-8, Oct 2000.

Ingber, D., Mechanobiology and diseases of mechanotransduction. *Annals of Medicine*., **35** :564-577, 2003.

Ingber, D., Mechanosensation through integrins : cells act locally but think globally. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*., **100** :1472-1474, 2003.

Ingber, D., Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *Journal of Cell Science*., **116** :1397-1408, 2003.

Isambert, H., Maggs, A.C., Dynamics and rheology of actin solutions. *Macromolecules*, **29** :1036-1040, 1996.

Janmey, P. & coll., Viscoelastic properties of vimentin compared with other biopolymer networks. *Journal of Cell Biology*, **113** :155-160, 1991.

Janmey, P.A., Mechanical properties of cytoskeletal polymers. *Current Opinion in Cell Biology.*, **2** :4-11, 1991.

Jay, P.Y. & coll., A mechanical function of myosin II in cell motility. *Journal of Cell Science*, **108** :387-393, 1995.

Kabsch, W. & coll., Atomic structure of the actin : DNase i complex. *Nature*, **347** :44-53, 1990.

Karcher, H.& coll., A three dimensional viscoelastic model for cell deformation with experimental verification. *Biophysical J.* **85(5)**: 3336-49, Nov 2003.

Katz, B.Z. & coll., Physical states of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Molecular Biology of the Cell.*, **11** :1047-1060, 2000.

Kovacs, E.M. & coll., Cadherin-directed actin assembly: E-Cadherin physically associates with the Arp2/3 complex to direct actin assembly in nascent adhesive contacts. *Current Biology.* **5;12(5)**: 379-82, Mar 2002.

Kruse, K. & coll., Asters, vortices, and rotating spirals in active gels of polar filaments. *Phys. Rev. Lett.*, **20,92(7)**:078101, Aug 2004.

Lambert, M., Padilla, F., Mege, R.M., Immobilized dimers of N-cadherin-Fc chimera mimic cadherin-mediated cell contact formation: contribution of both inside-out and outside in signals. *Journal of Cell Science*, **113** :2207-2219, 2000.

Landau, L. & coll., Physique théorique tome 7 Théorie de l'élasticité, éd. **Librairie du globe Edition MIR.**

Lang, M.J., Block, S.M., LBOT-1 : Laser based optical tweezers. *Am. J. Phys.* **71(3)** :201-14. 2002

Lang, M.J., Fordyce, P.M., Block, S.M., Combined optical trapping and single-molecule fluorescence. *J. Biol.* **2(1)** :6, 2003.

Lau, A. & coll., Microrheology, stress fluctuations, and active behavior of living cells. *Physical Review Letters.*, **91** :198101 1-4,2003.

Laurent, V.M. & coll., Assessment of mechanical properties of adherent living cells by bead micromanipulation: comparison of magnetic twisting cytometry *vs* optical tweezers. *J. Biomech. Eng.* **124(4)**: 408-21, Aug 2002.

Lebedev, P.N., Experimental examination of light pressure. *Ann. Der Physik.* **6**, 433, 1901.

Legoff, L., Amblard, F., Furst, E.M., Motor-driven dynamics in actin-myosin networks. *Physical Review Letters.*, **88**: 018101 1-4, 2002.

Lequeux, F., Adjari, A., Averaging rheological quantities in descriptions of soft glassy materials. *Physical Review E Stat. Nonlin. Soft matter Phys.* **63(3 Pt 1)**: 030502, Mar 2001.

Lu, Q., Solomon, M.J., Probe size effects on the microrheology of associating polymer solutions. *Phys. Rev. Lett. NonLin soft matter phys.* **66(6 Pt 1)**: 0-61504, Dec 2002.

Maggs, A.C., Micro-bead mechanics with actin filaments. *Physical Review E.*, **57** :2091 2094, 1998.

Mahaffy, R.E. & coll., Quantitative analysis of the viscoelastic properties of thin regions of fibroblasts using atomic force microscopy. *Biophysical Journal.*, **86** :1777-1793, 2004.

Mahaffy, R.E. & coll., Scanning probe-based frequency-dependent microrheology of polymer gels and biological cells. *Physical Review Letter.*, **85** :880-883, 2004.

Maksym, B. & coll., Mechanical properties of cultured human airway smooth muscle cells from 0.05 to 0.4 hz. *Journal of Applied Physiology.*, **89** :1619-1632, 2000.

Maniotis, A.J., Chen, C.S., Ingber, D.E., Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proceedings of the National Academy of Science, USA.*, **94** :849-854, 1997.

Mason, T.G. & coll., Rheology of F-actin solutions determined from thermally driven tracer motion. *J. Rheol.* **44(4)**, July/August 2000.

Mason, T.G., Weitz, D.A., Optical measurements of frequency-dependent linear viscoelastic moduli of complex fluid. *Physical Review Letters.* **74(7)**: 1250-53, Feb 1995.

Meyer, C.J. & coll., Mechanical control of cyclic AMP signalling and gene transcription through integrins. *Nature Cell Biology.* **2(9)**: 666-8, Sep 2000.

Mijailovich, S.M. & coll., A finite element model of cell deformation during magnetic bead twisting. *J. Appl. Physiology.* **93(4)**: 1429-36, Oct 2002.

Mitchison, T., Kirschner, M., Microtubule assembly nucleated by isolated centrosome. *Nature*, **312** :232 237, 1984.

Monthus, C., Bouchaud, J.P., Models of traps and glass phenomenology. *J. Phys. A.* **29**: 3847-3869, 1996.

Morse, D.C., Viscoelasticity of concentrated isotropic solutions of semiflexible polymers. 1.model and stress tensor. *Macromolecules.*, **31** :7030-7043, 1998.

Nicolas, A., Geiger, B., Safran, S.A., Cell mechanosensitivity controls the anisotropy of focal

adhesions. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **101** :12520-12525, 2004.

O'Shaughnessy, B., Vavylonis, D., Dynamics of living Polymers. *Eur. Phys. J.E. Soft Matter*. **12(3)**: 481-96, Nov 2003.

Ott, A., Measurements of the persistence length of polymerized actin using fluorescence microscopy. *Physical Review E*, **48** :1642-1643, 1993.

Palmer, A. & coll., Diffusing wave spectroscopy microrheology of actin filament networks. *Biophysical journal*, **76**: 1063-1071, Feb 1999.

Pérez J. Ph., Carles R., Fleckinger R., Electromagnétisme vide et milieux matériels, **édition MASSON, 1990**

Perret, E. & coll., Fast dissociation kinetics between individual E-cadherin fragments revealed by flow chamber analysis. *The EMBO Journal*. **3;21(11)**: 2537-46, Jun 2002.

Plastino, J. & coll., The effect of diffusion, depolymerisation and nucleation promoting factors on actin gel growth. *Eur. Biophys. J.*. **33(4)**:310-20, Dec 2003.

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

Pourati, J. & coll., Is cytoskeletal tension a major determinant of cell deformability in adherent endothelial cells? *AJP Cell Physiology*, **274** :C1283-C1289, 1998.

Puig de Morales, M. & coll., Measurement of cell microrheology by magnetic twisting cytometry with frequency domain demodulation. *Journal of Applied Physiology*, **91** :1152-1159, 2001.

Radmacher, M. & coll., From molecules to cells : imaging soft samples with the atomic force microscope. *Science*, **257** :1900-1905, 1992.

Radmacher, M. & coll., Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope. *Biophysical Journal*. **70**: 556-567, Jan 1996.

Rafelski, S.M., Theriot, J.A., Crawling toward a unified model of cell motility : spatial and temporal regulation of actin dynamics. *Annual Review of Biochemistry*, **73** :209-239, 2004.

Riggs, A.D., Xiong, Z., Methylation and epigenetic fidelity. *PNAS*. **101**:4-5, Jan 2004.

Riveline, D. & coll., Focal contacts as mechanosensors : externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independant mechanism. *Journal of Cell Biology*, **153** :1175-1185, 2001.

Rodionov, V., Borisy, G.G., Microtubule treadmilling *in vivo*. *Science*, **275** :70-73, 1997.

Sako, Y. & coll., Cytoplasmic regulation of the movement of E-cadherin on the free cell surface as studied by optical tweezers and single particle tracking: corraling and tethering by the membrane skeleton. *Journal of Cell Biology*. **9;140(5): 1227-40, Mar 1998.**

Sato, M., Levesque, M.J., Nerem, R.M., Micropipet aspiration of cultured bovine aortic endothelial cells exposed to shear stress. *Arteriosclerosis*, **7 :276-286, 1987.**

Schmid-Schonbein, G.W. & coll., Passive mechanical properties of human leukocytes. *Biophysical Journal*, **36 :243-256, 1981.**

Schmidt, F.G., Hinner, B., Sackmann, E., Microrheometry underestimates the values of the viscoelastic moduli in measurements on f-actin solutions compared to macrorheometry. *Physical Review E*, **61 :56465653, 2000.**

Sheetz, M.P., *Laser Tweezers in Cell Biology*, **Academic Press, 1990**

Shroff, S.G., Saner, D.R., Lal, R., Dynamic micromechanical properties of cultured rat atrial myocytes measured by atomic force microscopy. *AJP-Cell Physiology*, **269 :C286-292, 1995.**

Simmons, R.M. & coll., Quantitative measurements of force and displacements using an optical trap. *Biophysical Journal*. **70(4) :1813-22, Apr 1996.**

Sollich, P. & coll., Rheology of soft glassy materials. *Physical Review Letters*, **78 :2020-2023, 1997.**

Sollich, P., Rheological constitutive equation for a model of soft glassy materials. *Physical Review E*. **58(1): 738-759, Dec 1997.**

Stamenovic, D. Coughlin, M.F., The role of prestress and architecture of the cytoskeleton and deformability of cytoskeletal filaments in mechanics of adherent cells : a quantitative analysis. *Journal of Theoretical Biology*, **201 :63-74, 1999.**

Stamenovic, D., Ingber, E., Models of cytoskeletal mechanics of adherent cells. *Biomech. Model Mechanobiol.* **1: 95-108, 2002.**

Stewart, M., Intermediate filaments structure and assembly. *Current Opinion in Cell Biology*, **5:3-11, 1993.**

Straight, A.F. & coll., Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor. *Science*. **14;299(5613): 1743-7, 2003.**

Svitkina, T.M. & coll., Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes : mechanism of cell body translocation. *Journal of Cell Biology*, **139 :397-415, 1997.**

Svoboda, K., Block, S.M., Biological applications of optical forces. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23 :247-85, 1994.**

Tempel, M., Isenberg, G., Sackmann, E., Temperature-induced sol-gel transition and microgel formation in α -actinin cross-linked actin networks: A rheological study. *Physical Review E*. **54(2): 1802-1810, Aug 1996.**

Thoumine, O., Ott, A., Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation. *Journal of Cell Science*, **110** :2109-2116, 1997.

Thoumine, O., Cardoso, O., Meister, J.J., Changes in the mechanical properties of fibroblasts during spreading : a micromanipulation study. *European Biophysical Journal*, **28** :222-234, 1999.

Timson, D.J., Fine tuning the myosin motor: the role of the essential light chain in striated muscle myosin. *Biochimie*. **639-645** **85**, 2003.

Tsai, M.A., Frank, R.S., Waugh, R.E., Passive mechanical behavior of human neutrophils : power law fluid. *Biophysical Journal*, **65** :2078-2088, 1993.

Tseng, Y., Wirtz, D., Mechanics and multiple-particle tracking microheterogeneity of α -actinin-cross-linked actin filament networks. *Biophysical Journal*, **81** :1643-1656, 2001.

Tseng, Y., Kole, T.P., Wirtz, D., Micromechanical mapping of live cells by multiple-particle-tracking microrheology. *Biophysical Journal*, **83** :3162-3176, 2002.

Vale, R.D., Reese, T.S., Sheetz, M.P., Identification of a novel force generating protein (kinesin) involved in microtubule-based motility. *Cell*, **41** :39-50, 1985.

Wade, R.H. & coll., Organization and structure of microtubules and microtubule-motor protein complexes. *European Biophysics Journal*, **27** :446-454, 1998.

Wagner, O. & coll., Viscoelastic properties of f-actin, microtubules, f-actin/ α -actinin, and f-actin/hexokinase determined in microliter volumes with a novel nondestructive method. *Biophysical Journal*. **76(5):2784-2796**, May 1999.

Walker, R.A. & coll., Dynamic instability of individual microtubule analyzed by video light microscopy : rate constants and transition probabilities. *Journal of Cell Biology*, **107** :1437-1448, 1988.

Wang, N., Butler, J.P., Ingber, D.E., Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, **260** :1124-1127, 1993.

Wang, N. & coll., Cell prestress. I. Stiffness and prestress are closely associated in adherent contractile cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiology*. **282(3): C606-16**, Mar 2002.

Wang, N. & coll., Mechanical behavior in living cells consistent with the tensegrity model. *PNAS*. **3;98(14): 7765-70**, Jul 2001.

Wang, G.M. & coll., Experimental demonstration of violations of the second law of thermodynamics for small systems and short time scales. *Physical Review Letters*. **29;89(5): 050601**, Jul 2002.

Weiner, O.D. & coll., Spatial control of actin polymerization during neutrophil chemotaxis. *Nature Cell Biology*, **1** :75-81, 1999.

Weissenhorn, A.L. & coll., Deformation and height anomaly of soft surfaces studied with the

AFM. *Nanotechnology.*, 4 :106-113, 1993.

Welch, M.D. & coll., Interaction of the human Arp2/3 complex and the *listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science*, **281** :105-108, 1998.

Wilhelm, C., Gazeau, F., Bacri, J.C., Rotational magnetic endosome microrheology : viscoelastic architecture inside living cells. *Physical Review E.*, **67** :061908 1-12, 2003.

Wu, H.W., Kuhn, T., Moy, V.T., Mechanical properties of L929 cells measured by atomic force microscopy : effects of anticytoskeletal drugs and membrane crosslinking. *Scanning.*, **20** :389-397, 1998.

Yamada, S., Wirtz, D., Kuo, S.C., Mechanics of living cells measured by laser tracking microrheology. *Biophysical Journal.*, **78** :1736-1747, 2000.

Yeung, A., Evans, A., Cortical shell-liquid core model for passive flow of liquid-like spherical cells into micropipets. *Biophysical Journal.*, **56** :139-149, 1989.

Zhelev, D.V., Needham, D., Hochmuth, R.M., Role of the membrane cortex in neutrophil deformation in small pipets. *Biophysical Journal.*, **67** :696-705, 1994.

Zheng, Y. & coll., Nucleation of microtubule assembly by a γ -tubulin-containing ring complex. *Nature*, **378** :578-583, 1995.

Zhu, C., Bao, G., Wang, N., Cell mechanics : mechanical response, cell adhesion, and molecular deformation. *Annual Review of Biomedical Engineering.*, **02** :189-226, 2000.

Ziemann, F., Radler, J., Sackmann, E., Local measurements of viscoelastic moduli of entangled actin networks using an oscillating magnetic bead micro-rheometer. *Biophysical Journal.* **66(6)**: 2210-6, Jun 1994.

Annexes

Valérie M. Laurent

e-mail: v.laurent@creteil.inserm.fr
INSERM Unité 492,
Physiopathologie et Thérapeutique
Respiratoires,
Faculté de Médecine et Faculté des Sciences et
Technologie,
Université Paris XII, 8, rue du Général Sarrail,
94010 CRÉTEIL cedex France
CNRS, UMR-7057 associé aux Universités Paris
VI et Paris VII,
Laboratoire de Biorhéologie et
d'Hydrodynamique Physicochimique,
et Fédération de Recherche Matière et
Systèmes Complexes
2 place Jussieu, 75251 PARIS cedex 5, France

Sylvie Hénon¹

e-mail: henon@ccr.jussieu.fr
CNRS, ESA-7057 associé aux Universités Paris
VI et Paris VII,
Laboratoire de Biorhéologie et
d'Hydrodynamique Physicochimique,
2 place Jussieu, 75251 PARIS cedex 5, France

Emmanuelle Planus

e-mail: emmanuelle.planus@creteil.inserm.fr

Redouane Fodil

e-mail: redouane.fodil@creteil.inserm.fr

INSERM Unité 492,
Physiopathologie et Thérapeutique
Respiratoires,
Faculté de Médecine et Faculté des Sciences et
Technologie,
Université Paris XII, 8, rue du Général Sarrail,
94010 CRÉTEIL cedex France

Martial Balland

e-mail: martial@ccr.jussieu.fr
CNRS, ESA-7057 associé aux Universités Paris
VI et Paris VII,
Laboratoire de Biorhéologie et
d'Hydrodynamique Physicochimique,
2 place Jussieu, 75251 PARIS cedex 5, France

Daniel Isabey¹

e-mail: daniel.isabey@creteil.inserm.fr
INSERM Unité 492,
Physiopathologie et Thérapeutique
Respiratoires,
Faculté de Médecine et Faculté des Sciences et
Technologie,
Université Paris XII, 8, rue du Général Sarrail,
94010 CRÉTEIL cedex France

François Gallet

e-mail: frgallet@ccr.jussieu.fr
CNRS, ESA-7057 associé aux Universités Paris
VI et Paris VII,
Laboratoire de Biorhéologie et
d'Hydrodynamique Physicochimique,
2 place Jussieu, 75251 PARIS cedex 5, France

Assessment of Mechanical Properties of Adherent Living Cells by Bead Micromanipulation: Comparison of Magnetic Twisting Cytometry vs Optical Tweezers

We compare the measurements of viscoelastic properties of adherent alveolar epithelial cells by two micromanipulation techniques: (i) magnetic twisting cytometry and (ii) optical tweezers, using microbeads of same size and similarly attached to F-actin. The values of equivalent Young modulus E , derived from linear viscoelasticity theory, become consistent when the degree of bead immersion in the cell is taken into account. E -values are smaller in (i) than in (ii): $\sim 34\text{--}58\text{ Pa}$ vs $\sim 29\text{--}258\text{ Pa}$, probably because higher stress in (i) reinforces nonlinearity and cellular plasticity. Otherwise, similar relaxation time constants, around 2 s, suggest similar dissipative mechanisms. [DOI: 10.1115/1.1485285]

¹Corresponding authors: Daniel Isabey and Sylvie Hénon

Contributed by the Bioengineering Division for publication in the Journal of Biomechanical Engineering. Manuscript received November 29, 2000; revised manuscript received November 5, 2001. Associate Editor: T. C. Skalak

1 Introduction

It is now widely recognized that biological functions of cells are dependent upon or regulated by the mechanical environment, *i.e.*, the extracellular matrix and neighboring cells [1–7]. In adherent living cells, interactions with the mechanical environment occur via specific molecular pathways. For instance, transmembrane extracellular matrix receptors, such as members of the integrin family, bind actin-associated proteins within focal adhesions and thereby physically link the extracellular matrix (ECM) with cytoskeleton filaments. These transmembrane receptors have been used to transfer a mechanical signal to the cytoskeleton, and specifically measure the cytoskeletal elastic modulus using spherical ferromagnetic microbeads coated with specific receptor ligands [8]. It should be noted that deformation of adherent cells depends much more on cytoskeletal and environmental conditions, especially the ECM, than suspended cells [7,9,10].

The cytoskeleton is a complex yet organized structure, whose mechanical properties are not only recognized as a key determinant of cell shape [4], but also of other cellular functions such as spreading, crawling, polarity and cytokinesis [3,4,6,11,12]. In a recent study, relative decreases in cytoskeletal rigidity down to 20% of the initial value were associated with enhancement of migration and improvement of wound healing caused by exogenous collagenases [13]. This illustrates the growing need for accurate and reliable estimates of cellular mechanical properties, which constitutes the first basic motivation for the present study.

A second motivation concerns the constant difficulty to compare absolute measured values of rigidity modulus and dissipative modulus in adherent cells due to their lack of consistency. For instance, depending on the micromanipulation technique used, rigidity modulus values have been shown to differ by several orders of magnitudes, namely 10^0 – 10^2 Pa in magnetic twisting cytometry [7,8,14,15], 10^2 Pa in micropipette aspiration [16,17], 10^3 Pa in cell poking [18] and microplate manipulation [19], 10^3 Pa in magnetic tweezers experiments [20], and 10^3 – 10^5 Pa in atomic force microscopy [21]. These discrepancies may have multiple origins: differences in the biological material studied or in physiological conditions, differences in the magnitude of stress applied in each technique (from 10^{-1} to 10^4 pN/ μm^2), uncertain estimation of applied stress, variability in probe dimension, resulting in a wide range of cellular deformations between the various techniques. Using tensegrity models whose characteristic size matches the probe dimension, some authors [22,23] have recently attempted to explain the close link existing between the measured values of cellular elastic modulus and the size of the probe used in each technique.

In the present study, we measure the mechanical properties of living epithelial alveolar cells and perform an experimental and theoretical comparison of cell stiffness measurements using two micromanipulation techniques: magnetic twisting cytometry and optical tweezers technique. These two techniques advantageously share a number of common features with, however, a few differences that motivate the theoretical approach and structure the discussion. Both techniques use a spherical bead as a probe to study the mechanical response of living cell and generate a small or moderate stress to the cell in the approximate range: 1–100 pN/ μm^2 . Magnetic twisting cytometry technique was initially designed by Wang et al. [8] and permits specific bead attachment to the cytoskeleton via transmembrane mechanoreceptors. Optical tweezers technique has been extensively used for the study of biological systems [24], and more recently to investigate the mechanical properties of the cell cytoskeleton [9,14,25,26]. We used similar cell types, similar extracellular matrix substrate, similar ligand to coat the beads and spherical beads of similar sizes, *i.e.*, RGD coated ferromagnetic beads for magnetic twisting and RGD coated silica beads for optical tweezers, in order to minimize differences between techniques. The irreducible differences concern the type of effort applied to the bead and the number of implicated beads. In the magnetic twisting technique, a torque is applied to

each bead resulting in a mean bead deviation measured over a large number of beads ($\sim 10^5$), bound to a significant cell population ($\sim 5.10^4$). In the optical tweezers technique, a unidirectional force is applied to a unique attached bead and results in bead translation or rather in a combination of rotation and translation. By assuming that the intracellular medium behaves like a linear viscoelastic solid, we derive and compare the general equations of motion for small deformations, in terms of force-displacement and force-velocity relationships (translation), and also torque-rotation angle and torque-angular velocity relationships (rotation) and thus provide a first quantitative description of a simple concept, *i.e.*, the less immersed the bead in a given cell, the easier the bead displacement. This approach avoids a dramatic underestimate of the measured cellular rigidity. Once properly corrected on the basis of the presently developed bead immersion theory, the range of rigidity properties estimated by the two techniques—presently expressed in terms of equivalent Young modulus—tend to overlap with however smaller rigidity values measured with magnetic twisting. A possible explanation is that magnetic twisting operates in a larger range of stress than optical tweezers and induces non linear and unrecoverable deformations already documented [8,14,27,28]. Other reasons deal with inherent intracellular and transcellular heterogeneity. On the whole, this comparative theoretical and experimental analysis of two bead micromanipulation techniques reduces the amount of unexplained discrepancies between the two techniques and improves the consistency with other intracellular or extracellular measurements [29].

2 Theory

In this section, we present a summary of the theoretical results used to interpret magnetic twisting and optical tweezers cytometry experiments. Most of the algebra is described in the appendix. We consider a rigid spherical bead to be a probe of the viscoelastic properties of the surrounding intracellular medium. The volume and the weight of microbeads used are so small that gravity and buoyancy effects can be neglected. The intracellular medium is assumed to be a linearly viscoelastic and incompressible solid. We represent its mechanical response by a simple Voigt model, *i.e.* the association in parallel of a pure elastic element and a dashpot. Three different geometric configurations are examined: a) The bead is fully immersed in an infinite three-dimensional medium (Fig. 1a); b) Half the bead is immersed in a semi-infinite medium, limited by a plane (Fig. 1b); c) The bead is in contact with the plane surface of a semi-infinite medium via a small circular area. In this last case, the degree of bead immersion is measured by the half-angle α generating the cone limiting the contact area (Fig. 1c), *e.g.*, $\alpha = \pi$ in case (a) and $\alpha = \pi/2$ in case (b).

In the case of pure translation, we write the relationship between the bead displacement x and the viscoelastic force F_v exerted by the medium on the bead as:

$$F_v = F_e + F_d = -(\beta_e E R x + \beta_d \eta R \dot{x}) \quad (1)$$

In this formula F_e and F_d are respectively the elastic and dissipative contributions to F_v , E is equivalent to the Young elastic modulus of the medium, η its viscosity, R represents the bead radius, and β_e and β_d are numerical coefficients depending on the degree of bead immersion α (see appendix). Strictly speaking, both E and η are dependent on the frequency ω of the mechanical excitation, so that the correct relationship at frequency ω is:

$$F_v(\omega) = -[\beta_e E(\omega) + i\omega\beta_d\eta(\omega)]R x(\omega) \quad (2)$$

However, it will be shown in the section Results that the experimental time scale is about 1 min both for optical tweezers and magnetic twisting. This time is larger than the characteristic time η/E appearing in equation (1). We thus assume quasi-static experimental conditions, and simply write in the following $E(\omega) \approx E(0) = E$ and $\eta(\omega) \approx \eta(0) = \eta$.

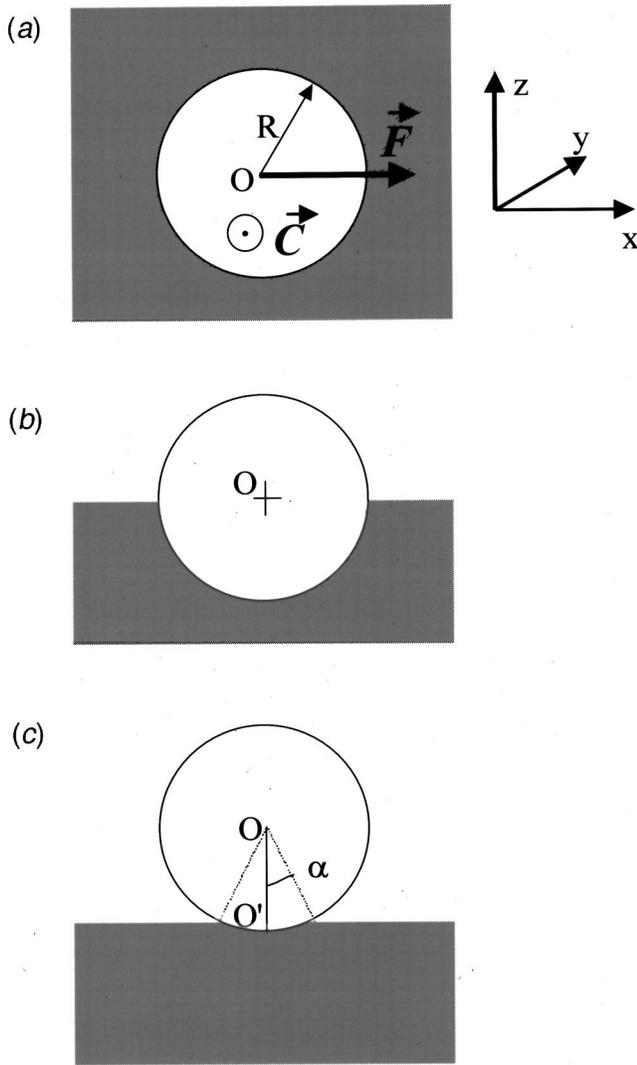


Fig. 1 Various geometric configurations for a bead bound to a cell considered to be a homogeneous elastic medium: (a) The bead is fully immersed in an infinite three-dimensional medium; (b) Half the bead is immersed in a semi-infinite medium; (c) The bead is in contact with the flat surface of a semi-infinite medium via a small circular area. The degree of bead immersion is measured by the half-angle α generating the cone limiting the contact area.

In the case of pure rotation, a similar expression may be written between the bead rotation angle θ (in radians) and the viscoelastic torque C_v exerted on the bead:

$$C_v = C_e + C_d = -(\gamma_e ER^3 \theta + \gamma_d \eta R^3 \dot{\theta}) \quad (3)$$

As in Eq. (1), γ_e and γ_d are numerical coefficients depending on α (see Appendix).

The results are summarized in Table 1 and Table 2. In most geometric configurations, we obtained exact relationships between kinematic and dynamic quantities. It should be noted that the expressions found for elastic force F_e and torque C_e in the case of a half-immersed bead ($\alpha = \pi/2$) and in the case of a small contact area ($\alpha \ll 1$) are strictly consistent. Based on this consistency at both limits: $\alpha \ll 1$ and $\alpha = \pi/2$, we assume in the following that the α -dependent formulas (established for F_e and C_e at small α) may be interpolated for intermediate values of $\alpha = [0 - \pi/2]$. Such an interpolation for intermediate values of α does not seem valid for the behavior of the dissipative contribution F_d . By con-

Table 1 Theoretical relationships between bead displacement x (or rotation θ) and the restoring elastic force F_e (or torque C_e) exerted by a linear elastic medium. In the present study, E is the elastic modulus of the intracellular, R is the bead radius and α is the half-angle of the cone limiting the contact area in case (c) of Fig. 1.

	Translation: Elastic Force F_e	Rotation: Elastic Torque C_e
a)	$F_e = -2\pi E R x$	$C_e = -\frac{8}{3}\pi E R^3 \theta$
b)	$F_e = -\frac{8}{9}\pi E R x$	$C_e = -\frac{4}{3}\pi E R^3 \theta$
c)	$F_e = -\frac{8}{9}\pi E R \sin \alpha x$	$C_e = -\frac{4}{3}\pi E R^3 (\sin \alpha)^3 \theta$

trast to the elastic response, the dissipative force coefficients for fully immersed beads ($\alpha = \pi$), half-immersed beads ($\alpha = \pi/2$) and beads in contact by a small area ($\alpha \ll 1$) exhibit a less obvious α -dependence. Nevertheless, since F_e and F_d are both proportional to $\sin \alpha$ when $\alpha \ll 1$, it seems reasonable to use a common formula for all configurations:

$$\frac{F_e}{F_d} = \frac{1}{\tau} \frac{x}{\dot{x}} \quad (4)$$

in which the time constant τ for any α value is approximated by its value for the fully immersed bead:

$$\tau = \frac{3\eta}{E} \quad (5)$$

Due to the lack of quantitative predictions for rotation, we will assume that the relationship obtained for a fully immersed bead may be extrapolated in the full range of α values:

$$\frac{C_e}{C_d} = \frac{1}{\tau} \frac{\theta}{\dot{\theta}} \quad (6)$$

with the same definition of τ as in Eq. (5).

The response (displacement and velocity) of a bead submitted to either an external torque C (in the magnetic twisting set-up), or an external force F (in the optical tweezers set-up) can be observed under real experimental conditions. By ignoring bead inertia, the external torque C applied to the bead in magnetic twisting cytometry is always balanced by the viscoelastic torque $C_v = -C$ exerted by the intracellular medium. At equilibrium, the corresponding rotation angle is:

Table 2 Theoretical relationships between the bead velocity \dot{x} (or its angular velocity $\dot{\theta}$) and the restoring dissipative force F_d (or torque C_d) exerted by a linear dissipative medium. No analytical expression was found for the two N.A.-cases.

	Translation: Dissipative Force F_d	Rotation: Dissipative Torque C_d
a)	$F_d = -6\pi\eta R \dot{x}$	$C_d = -8\pi\eta R^3 \dot{\theta}$
b)	$F_d = -3\pi\eta R \dot{x}$	N.A.
c)	$F_d = -\frac{16}{3}\eta R \sin \alpha \dot{x}$	N.A.

$$\theta = \frac{3}{4\pi E} \frac{C}{R^3 \sin^3 \alpha} \quad (7)$$

Similarly, for optical tweezers, the external force F is balanced by the viscoelastic force $F_v = -F$. However, this situation requires a more refined analysis: F is applied to the bead center, while F_v is localized at the contact area. As shown in the appendix, the full mechanical balance implies that the elastic intracellular medium also exerts an extra torque C' on the bead approximately related to F by:

$$C' = -RF \cos \alpha. \quad (8)$$

At zero velocity, or in quasi static experiments, $F = -F_e$ and $C' = -C_e$, and the total displacement x of the bead center is the combination of a translation and a rotation around the contact area, so that (see A9 in the appendix)

$$x = \frac{3}{4\pi E} \frac{F}{R} \left(\frac{3}{2 \sin \alpha} + \frac{\cos \alpha}{\sin^3 \alpha} \right) \quad (9)$$

Also, in a quasi static experiment, all the stress tensor components can be calculated at any point of the bead surface. However, the local tension $T = [\sigma] \mathbf{n}$ is not homogeneous over the spherical surface, neither in modulus, nor in direction (here \mathbf{n} represents the unit vector normal to the bead surface). It is therefore difficult to precisely define the average stress exerted by the bead on the intracellular medium. In the case of rotation, an order of magnitude of the shear stress component is given by the usual formula:

$$\langle \sigma \rangle \approx E\theta \quad (10)$$

which becomes: $\langle \sigma \rangle \approx -C_e/2V = C/2V$ (fully immersed bead); $\langle \sigma \rangle \approx -C_e/V$ (half immersed bead); $\langle \sigma \rangle \approx -C_e/V \sin^3 \alpha$ (small contact area); with $V = 4\pi R^3/3$ (bead volume). This means that, for a given torque, the stress applied during magnetic twisting cytometry is highly dependent on the bead immersion angle α . Similarly, the shear stress component in translation can be estimated by:

$$\langle \sigma \rangle \approx \frac{Ex}{R \cos \alpha} \quad (11)$$

The same kind of α -dependency could therefore be observed for optical tweezers (see Eq. (A9)).

3 Materials and Methods

Cell Cultures. A549 human alveolar epithelial cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD) were grown to confluence in DMEM containing 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 50 IU/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, and incubated in a 5% CO₂-95% air atmosphere. Routine subcultures (passages 89 to 92) were performed at 1/20 split ratios by incubation with 0.025 g/100 ml trypsin-0.02 g/100 ml EDTA in calcium- and magnesium-free PBS for 10 min at 37°C.

For magnetic twisting cytometry experiments, 96-well bacteriologic dishes were coated with fibronectin at a concentration of 5 μ g/ml for 3 hours at room temperature. Cells were plated at the density of $50 \cdot 10^3$ per well, i.e., ≈ 1560 cells/mm², in complete culture medium with serum, 24 hours before experiments, and incubated in serum-free culture medium with 1% BSA for 30 minutes before experiments. Each magnetic twisting cytometry measurement, performed at a predetermined stress level, was performed the same day in three wells of the same cell culture, as previously done in magnetic twisting protocols [7,13].

A similar cell culture procedure was used for optical tweezers experiments, except that the cells were plated on glass coverslips (18 mm \times 24 mm) coated with fibronectin, at a density of $150 \cdot 10^3$ cells/coverslip, i.e., ≈ 350 cells/mm². Each experimental measurement with optical tweezers was performed once, on a single bead.

Specific Bead Attachment to the Cells. Carboxyl ferromagnetic beads (mean diameter: 4.5 μ m, Spherotec Inc., IL USA) or carboxylated silica microspheres (diameter: 5 μ m, Bangs Laboratories Inc., IN USA) were used as handles to apply a mechanical stress to the cells. The microbeads used in the two techniques were of very similar size in order to ensure similar experimental conditions and, in particular, to obtain the same contact area between the cells and the beads. The beads were coated with arginine-glycine-aspartic acid (RGD) peptide according to the manufacturer's procedure (Telios Pharmaceuticals Inc., CA USA). Before use, coated beads were incubated in serum-free culture medium supplemented with 1% BSA for at least 30 minutes at 37°C to block non-specific binding. Beads were then added to the cells (40 μ g per well, or 100 μ g per coverslip) for 30 min at 37°C in a 5% CO₂-95% air incubator. Unbound beads were washed away with serum-free culture medium-1% BSA. Note that if the cell density was smaller with optical tweezers, the number of bead per cell, i.e., about 2 beads/cell, did not really differ between the two techniques. Moreover, since the bead coating was the same in both cases, differences in F-actin or integrin recruitment should be negligible between the two techniques.

Quantitative Evaluation of Bead Immersion in the Cytoplasm. The method used to determine the degree of bead immersion in the cytoplasm was different in the two techniques. For magnetic twisting cytometry, we used spatial reconstructions of the F-actin cytoskeleton issued from confocal microscopy. We were thus able to accurately measure the half immersion angle α from vertical sections of the reconstructed bead/F-actin structure for 25 representative cases. The F-actin network was revealed by staining with fluorescent phalloidin. Horizontal optical sections of fluorescent intensity were obtained by confocal microscopy and 3D-reconstruction of the F-actin and of the bead positioning were performed. Staining of F-actin was performed using a previously published procedure [13]. Briefly, after cell fixation and staining with rhodamine phalloidin, cells were mounted with 100 μ l of mounting medium on top of the cell monolayer to keep the cell thickness intact. Microscopic observation was performed using a LSM 410 invert confocal microscope (Zeiss, Rueil-Malmaison, France). Fields of cells were randomly selected, brought into focus using a $\times 63/1.4$ numeric aperture Plan Neofluor objective. Epifluorescence was detected for 488 nm excitation and 515-520 nm emission (green) and 543 nm excitation and 570 nm emission (red). A cross sectional image was recorded under confocal conditions and used to establish a plane of focus above the glass surface. Optical sections were recorded every 1 μ m to reveal intracellular fluorescence.

To remove the distortion due to the optical system of the confocal microscope, a 3D deconvolution process, using the theoretical function PSF (Point Spread Function), was performed on the stack of gray level images (8 bits) by the AxioVision 3.0.6 software (Carl Zeiss, NY USA). The fixed images data are implemented at the right scale in Amira 2.2 software (TGS Inc., CA USA) which uses the threshold segmentation method to extract cell contours. The 3D-reconstruction was performed by a GMC module (Generalized Marching Cube algorithm) of Amira software which generates, using a triangulation method, an isosurface from segmented optical planes. We obtained a representative value of the half-angle of bead immersion α from half the angle constructed, in a vertical section, from the bead center to the two contact points with the F-actin.

For optical tweezers, α could be determined bead by bead from brightfield microscopic images which could be taken in the actual conditions of the laser trapping, i.e., in 24 cases. However, because microscopic images are taken from the top of the culture, the α -determination happened to be inaccurate for beads placed on top of cells. Advantageously, during laser trapping, we used silica beads essentially located near the cell periphery, i.e., in a cellular region where the determination of the bead immersion angle α is accurate.

Magnetic Twisting Cytometry

Principle. Magnetic twisting cytometry measures cytoskeleton mechanical properties in a monolayer of adherent cells. This technique, initially proposed by Wang et al. [8], basically uses RGD-coated ferromagnetic microbeads, which are linked to the integrin transmembrane receptors, known to be in relation with the actin cytoskeleton. The laboratory-made magnetic twisting cytometry device used in this study has been described previously [13,28]. The technique uses RGD-coated ferromagnetic microbeads in association with a magnetic twisting device which allows application of a magnetic torque directly to the cell surface via 4.5 μm microbeads linked to integrins and, hence, to the cytoskeleton. Microbeads are magnetized using a 0.15 T uniform magnetic pulse (150 μs). This magnetic field is horizontal, *i.e.* parallel to the cell monolayer. A magnetic torque is then created by Helmholtz coils, which generate a vertical uniform magnetic field \mathbf{H} ($\mu_0\mathbf{H}\leq 6.3$ mT). This magnetic torque induces rotation of the beads. To measure the angle of rotation of the beads θ_t , at any time t , the magnetometer continuously detects the component of the remanent magnetic field in the horizontal plane, $B_t(\leq 2$ nT), and θ_t is obtained by the relationship:

$$\theta_t = \cos^{-1}(B_t/B_0), \quad (12)$$

where B_0 is the value of the horizontal component of the remanent magnetic field of the beads before application of the torque. As in initial studies on twisting magnetic cytometry [7,8], this relationship assumes that the dynamic deviation of all beads is the same over the entire cell population, *e.g.*, about 5.10^4 cells. Note that magnetic twisting cytometry measurements could not be performed with sufficient confidence when the projected values of the remanent magnetic field became too small, *e.g.*, for values clearly above the noise level of the measurement system "magnetometer+probes." A density of 2 beads per cell corresponds to a remanent field of 0.8 nT–1 nT which is above the 0.25 nT-noise level. This is why applied torque values could not be smaller than 400 pN $\times\mu\text{m}$ to have a measurable change in remanent field. On the opposite, no excessive heating in the Helmholtz coils requires $I < 15$ A, *i.e.*, $C < 1200$ pN $\times\mu\text{m}$.

To take into account the variability inherent to the studied cell line, measurements at a given stress level are indeed the mean of three independent measurements obtained on three different days, *i.e.*, performed on different cell cultures but prepared with same protocol. Thus, each measurement value of elastic modulus presented below, is actually the mean (\pm Standard Deviation) of nine magnetic twisting measurements (3 wells \times 3 days). Considering an approximate density of 2 beads per cell, *i.e.*, more than 100×10^3 beads per well, it appears that each magnetic twisting cytometry data point reflects an averaged mechanical behavior resulting from the probing by about 10^6 beads.

Calibration of the Bead Magnetic Moment. By definition, the bead magnetic moment m (in A.m²) is given by the product $M \times V$, where M is the bead magnetization (in A/m) and $V = (4\pi R^3/3)$ is the bead volume (in m³). Magnetization of the beads is deduced from the total magnetization of suspension of beads in agar gel, measured by the Foner method with a precision of 4% [30]. The sample, placed between the two active coils of an electromagnet, is oscillated in the direction of the externally generated magnetic field \mathbf{H} . This motion generates an electric current in additional coils, which is detected by an amplifier synchronized to the frequency of the vibrating sample, *i.e.*, 200 Hz. A preliminary calibration procedure, using known magnetized samples, estimates the magnetization of the sample from the measured electrical current intensity. The magnetization specific to the ferromagnetic beads is obtained from the magnetization curve (H - M relationship) leading to remanent magnetization values of about 4700 A/m, and therefore, a bead magnetic moment, $m = 2.3 \cdot 10^{-13}$ Am² (obtained with a precision presumed to be 15% and 10%, respectively).

Determination of the Mechanical Properties of the Cells. The cells are deformed by rotation of the beads. At equilibrium, the magnetic torque C is balanced by the elastic torque C_e , and using Eq. (7), the angle of rotation of the bead is:

$$\theta_{\text{eq}} = \frac{3}{4\pi E} \frac{C}{R^3 \sin^3 \alpha} \quad \text{where } C = \mu_0 m H \sin\left(\frac{\pi}{2} - \theta_{\text{eq}}\right) \quad (13)$$

This relation is used to measure the equivalent Young modulus E of the intracellular medium. The angle α which characterizes the degree of bead immersion into the cytoplasm (Fig. 1) was determined for some representative cases by the method described above. In Eq. (13), μ_0 is the permeability of the free space, m is the modulus of the bead magnetic moment which, in the present study, was determined as indicated above, and H is the modulus of the external magnetic field. θ_{eq} is measured after 1 min of magnetic torque application, as in initial studies on magnetic twisting cytometry [7,8]. Note that the magnetic torque tends to decrease, by a factor $\cos \theta$, as bead deviation angle θ increases.

Similarly, the apparent viscosity η is estimated after switching off the magnetic torque. During the recovery period, θ_t relaxes as an exponential function of time, with a time constant $\tau = 3 \eta/E$ (see Eqs. (5) and (6)).

Optical Tweezers

Principle. Optical tweezers are used to apply forces in the range 0.1–200 pN onto micrometric objects. The technique has been extensively described elsewhere [25,31]. Briefly, a laser beam (Nd:YAG, $\lambda = 1.064$ μm , $P_{\text{max}} = 600$ mW) is focused by an oil immersion objective with a large numerical aperture ($\times 100$, numerical aperture: 1.25). Small dielectric objects, for instance silica beads, are trapped at the point where the laser is focused. At the same time, the beam-focusing objective allows observation of the beads (and of the cells during experiments) in bright field. Beads located on cell periphery were preferentially chosen—instead of beads located on the apical cell face—in order not to focus the laser beam inside the cell, which could alter its biological integrity. Images are recorded on videotape for subsequent analysis. When displaced from its equilibrium position in the tweezers, a trapped bead is submitted to a restoring force F , roughly proportional to the laser power P and to the distance d between the center of the bead and the center of the trap. The trapping force F was calibrated as a function of P and d , by submitting a trapped bead to a viscous force in a flow of known velocity [26,32]. For a silica bead 5 μm in diameter, F is in the range 0–250 pN, for P between 0 and 600 mW, and d between 0 and ~ 2.5 μm . The accuracy on the force calibration is about 5%. The total number of experimental measurements performed with optical tweezers was 24.

Determination of Intracellular Mechanical Properties. Similarly to the magnetic twisting technique, silica microbeads are specifically attached to the integrin receptors, and micromanipulated with optical tweezers in order to measure the stiffness of the cytoskeleton. A bead attached to a cell is trapped in the tweezers, the trap is then displaced at a low constant speed (0.1 $\mu\text{m/s}$), in a direction parallel to the coverslip and locally tangential to the cell membrane, so that a slowly increasing force is applied to the bead. At any given time, the position of the trap is known and the position of the bead is measured by numerical image processing (NIH Image) on the recorded images, with an accuracy of about 0.1 μm . The applied force F is deduced from the distance between the bead and the trap position, and slowly increases from 0 to 250 pN in about 1 min. The applied force F is locally tangential to the cell membrane, and, in a first approximation, exerted at the center O of the bead. Since O is at a distance $R \cos \alpha$ from the cell membrane, the cell exerts on the bead both a force $-F$ and a torque C' , roughly equal to $-F R \cos \alpha$, and the bead both translates and rotates (see Theory). The velocity of the bead is small enough to assume a quasi-static displacement. The bead and the

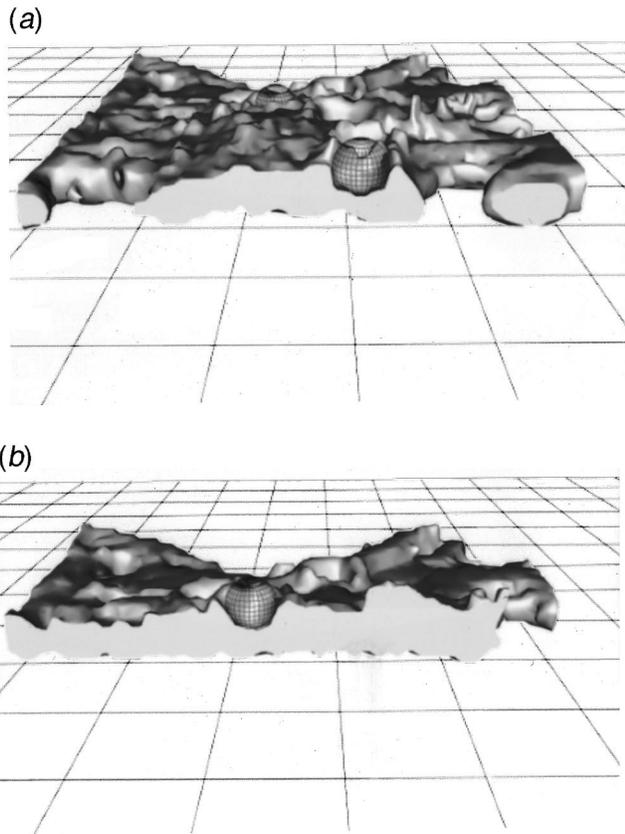


Fig. 2 Spatial reconstruction of the bead/F-actin structure using confocal microscopic images obtained after staining with fluorescent phalloxin. The bead/F-actin structure is represented here for two beads (a) and (b) corresponding to two vertical sections in the same epithelial cell and in conditions representative of magnetic twisting cytometry measurements. Contact points between the bead and the F-actin structure allowed accurate measurements of the half immersion angle α , e.g., $\alpha=78.2^\circ$ and $\alpha=66.8^\circ$ for these two beads (see text for explanations).

cell are considered to have reached the equilibrium state at any time, and the dissipative forces are ignored. Using Eq. (9), the total displacement x of the bead center is:

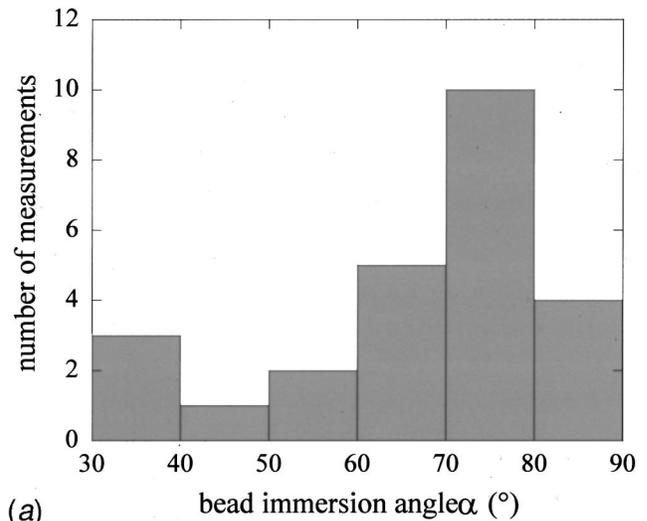
$$x = \frac{3}{4\pi E} \frac{F}{R} \left(\frac{3}{2 \sin \alpha} + \frac{\cos \alpha}{\sin^3 \alpha} \right) \quad (14)$$

The “degree” of bead immersion, α , greatly affects the x/F relationship. The α -angle is estimated for each bead from the recorded images, and measurement of x as a function of F is used to determine E , using Eq. (14).

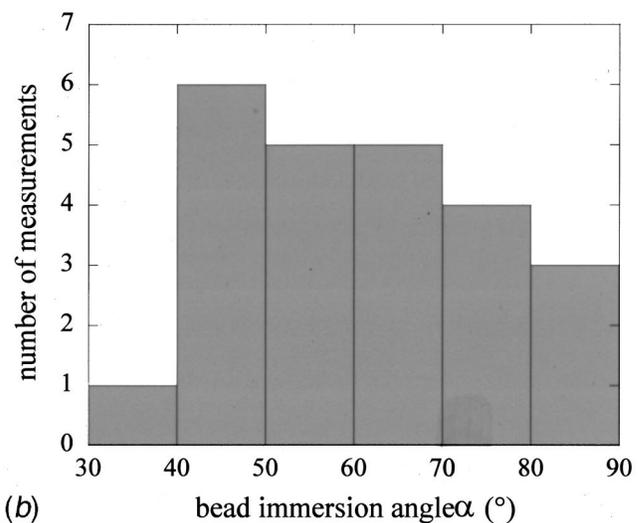
When F is switched off, the bead relaxes towards its equilibrium position as an exponential function of time. As in magnetic twisting cytometry experiments, cell viscosity is deduced from the relaxation time τ , which is assumed to be equal to $3\eta/E$ (see Eqs. (4) and (5)).

Results

Magnetic Twisting Cytometry. The half-angle of bead immersion in the cytoplasm was evaluated in some representative cases, as explained in Materials and Methods. 3D-reconstructions of two beads embedded in the F-actin network are shown in Fig. 2. Twenty five different α -values obtained from vertical sections of this type of reconstructions are presented in Fig. 3(a). Values range from 36° to 86° , with a mean $\alpha_m=67^\circ$ which will be used in the following data analysis (Eq. (13)).



(a)



(b)

Fig. 3 Bead immersion angle (α) in the cytoplasm, measured in (a) from the vertical sections of 3D-reconstructed images of bead/F-actin structure for 25 beads representative of magnetic twisting experiments, in (b) from brightfield microscopic images taken in the actual conditions of the laser trapping, namely for 24 beads. Note the similarities between the distribution angle α measured with two different methods throughout an equivalent number of beads. The mean value of α measured in each technique, i.e., 67° in magnetic twisting and 62° in laser trapping experiments, are fairly compatible.

Four different values of magnetic torque, i.e., $C=444, 768, 987$ and $1205 \text{ pN} \times \mu\text{m}$, calculated at equilibrium using the C -expression in Eq. (13) were tested. The mean bead deviation angles obtained for these four values of magnetic torque lie in the range 21° – 32° , the full range being 16° – 36° (Fig. 4 and Table 3). It is noteworthy that the θ° - C relationship is nonlinear, as previously observed in magnetic twisting cytometry. Accordingly, the mean (\pm SD) values of elastic modulus, E , calculated using Eq. (13) with $\alpha = \alpha_m = 67^\circ$ and reported in Table 3, remain in the range 34 – 58 Pa , the full range being 29 – 76 Pa . These E -values reveal an increase in bead deviation angle and rigidity as the applied torque increases from the lower to the higher torque value (Fig. 5). The increase in elastic modulus observed between two consecutive values is generally larger than the standard deviation

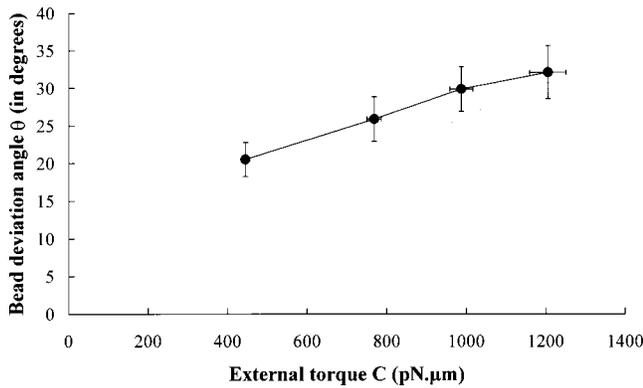


Fig. 4 Plot of the bead deviation angle θ (in degrees) versus the applied magnetic torque C (in $\text{pN}\times\mu\text{m}$). The θ - C relationship is nonlinear, as previously reported in magnetic twisting cytometry experiments. Values are mean \pm SD.

(SD) of a given measurement, except for the highest torque value tested for which the standard error was higher. These results indicate that, over a wide population of alveolar epithelial cells, the elastic modulus depends on the torque applied to the cytoskeleton via a rotating bead.

Table 3 Experimental results obtained for magnetic twisting cytometry for the four values of applied torque tested. C is the magnitude of the applied torque (in $\text{pN}\times\mu\text{m}$), n is the number of independent measurements, θ (in degrees) is the bead deviation angle after a minute of applied torque, E (in Pa) is the equivalent Young elastic modulus of the intracellular medium at a given torque value, τ (in s.) is the relaxation time constant (after stress release), SD is the standard deviation.

	$C=444\pm 6$ [pN·μm]	$C=768\pm 18$ [pN·μm]	$C=987\pm 29$ [pN·μm]	$C=1205\pm 46$ [pN·μm]
n	9	9	9	9
θ -range [°]	19–23	19–30	24–34	16–36
θ -mean [°]	21	26	30	32
\pm SD	2,3	3,0	3,0	3,5
E-range [Pa]	29–44	38–63	42–66	48–76
E-mean [Pa]	34	46	51	58
\pm SD	4,7	7,4	7,0	9,0
n		6	6	3
τ -range [s]		0,2–2,9	0,9–1,9	0,5–2,3
τ -mean [s]		1,2	1,3	1,5
\pm SD		1,1	0,4	0,9

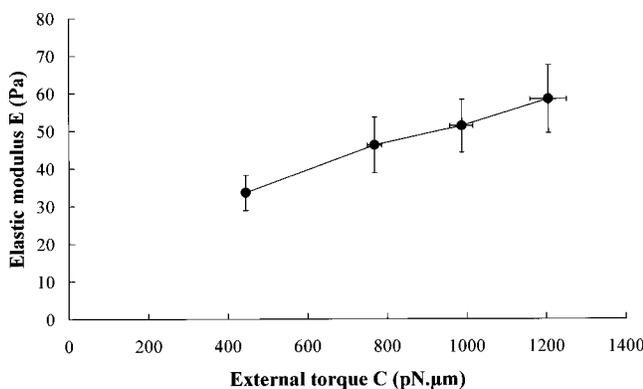


Fig. 5 Plot of the equivalent Young modulus E (in Pascal) for the four values of applied magnetic torque C (in $\text{pN}\times\mu\text{m}$), calculated using Eq. (13) with $\alpha=\alpha_m=67^\circ$ for a typical magnetic twisting cytometry experiment. The E -values lie in the range 34–58 Pa, and increase as magnetic torque increases. Values are mean \pm SD.

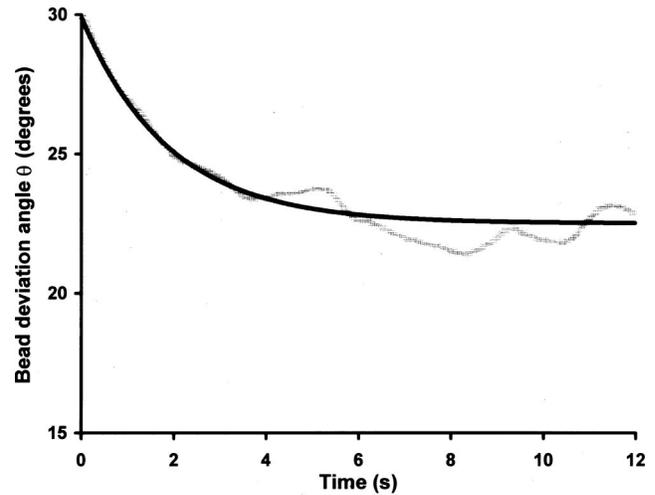


Fig. 6 Plot of the bead rotation angle θ_t (in degrees) versus time (in seconds) in the relaxation period, i.e., when the magnetic torque is released. Experimental data correspond to the gray points. The best mono-exponential fit is also shown (dark curve) and corresponds to a relaxation time constant $\tau=1.9$ s close to the mean value of 1.3 ± 0.8 s found over 15 similar relaxation curve experiments. Note that the final equilibrium state ($\theta\approx 22^\circ$) differs from the initial state ($\theta=0^\circ$).

The time variation of the bead deviation angle θ_t during the recovery period, i.e. once the magnetic torque has been switched off, reveals that θ_t decreases toward an equilibrium state which clearly differs from the initial state. This relaxation behavior, typically observed during twisting magnetic cytometry experiments, is illustrated in Fig. 6 for a torque of $1205 \text{ pN}\times\mu\text{m}$ before relaxation. The curve obtained can easily be fitted by a mono-exponential decay, leading to values of relaxation time constant staying in the range $\tau=0.2\text{--}2.9$ s over the 15 experiments performed, for mean values lying between 1.2 s and 1.5 s for the three torque values tested (see Table 3), i.e., a mean value of 1.3 ± 0.8 s averaged over 15 experiments. The corresponding values of cellular viscosity η , calculated from Eq. (5) using the values of E obtained at $\theta_t=\theta_{eq}$ (Table 3), were in the range 4–41 Pa·s with a mean value of $23\pm 13 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ (230 ± 130 Poise) over 15 experiments, without exhibiting a clear dependence on magnetic torque.

The incomplete recovery of cellular deformation, also called plasticity, systematically observed during magnetic twisting cytometry, has been quantified using a parameter already proposed in the literature [33], i.e., the percent of angular strain sustained after stress release. Values of permanent deformation were found in the range 70%–85%, as in previous studies in living adherent endothelial cells.

Optical Tweezers. Figure 7 shows images recorded during an optical tweezers experiment. The displacement x of the center of the bead is measured at any given time as a function of the applied force F . A typical result is shown on Fig. 8: x increases linearly with F . The relationship between x and F given by Eq. (14) can be used to deduce the elastic modulus E of the cell from the slope of x versus F . For an accurate determination of E , the value of α , characteristic of the degree of bead immersion in the cell, must be known. We measured α for each experiment on recorded images of the cell using the method described in Materials and Methods, for instance, $\alpha\approx 70^\circ$ in Fig. 7.

Measurements were performed on 24 different cells. The values of α measured in these experiments ranged from 35° to 90° with a mean value of 62° (see Fig. 3(b)). Both the α -value distribution and the mean α -values appear roughly similar in the two techniques which globally confirms the validity of each method used for measuring α . Bead displacement was found to be relatively

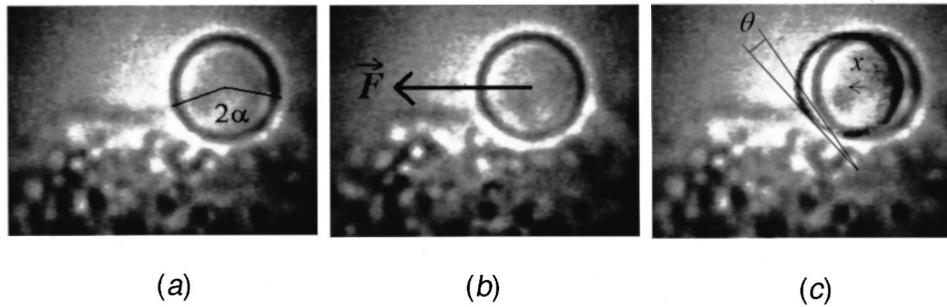


Fig. 7 Images recorded during an optical tweezers experiment. (a): a silica microbead bound at rest to an epithelial alveolar cell; (b): a force $F \approx 240$ pN is applied to the bead by the optical tweezers in a direction parallel to the cell membrane; (c): superimposition of (a) and (b): bead rotation is $\theta \approx 5^\circ$ and total translation of the bead center is $x \approx 0.8 \mu\text{m}$; scale given by the bead diameter ($5 \mu\text{m}$).

small ($< 2 \mu\text{m}$ for $F < 250$ pN), and always varied linearly with the applied force. Figure 9 and Table 4 show the results of all measurements. The measured values of E lie between 29 Pa and 258 Pa, with an average of 125 Pa. As described in section Materials and Methods, the cell opposes both a force and a torque to the bead, resulting in both translation and rotation. Most of the beads are spherical, and it is not easy to quantify experimentally the respective proportion of translation and rotation from the overall displacement. However, for some beads, surface irregularities were used to separately quantify rotation and translation, as illustrated in Fig. 7. In this example, displacement of the center of the bead due to the rotation, $R\theta$, represents about one quarter of the total displacement, a result which is roughly in agreement with Eq. (14), taking $\alpha \approx 70^\circ$, which is the degree of bead immersion measured in this example.

Another way to determine whether or not the analysis leading to Eq. (14) is valid was to check the absence of correlation between the estimated values of E and of α . Since the value of E deduced from Eq. (14) is highly sensitive to the value of α , e.g., the factor $(3/(2 \sin \alpha) + \cos \alpha / \sin^3 \alpha)$ increases by a factor of 4 when α decreases from 90° to 40° , we verified that the highest values of E do not correspond to the smallest values of α .

Relaxation. When F is switched off, the bead relaxes towards an equilibrium position, generally identical to the initial position,

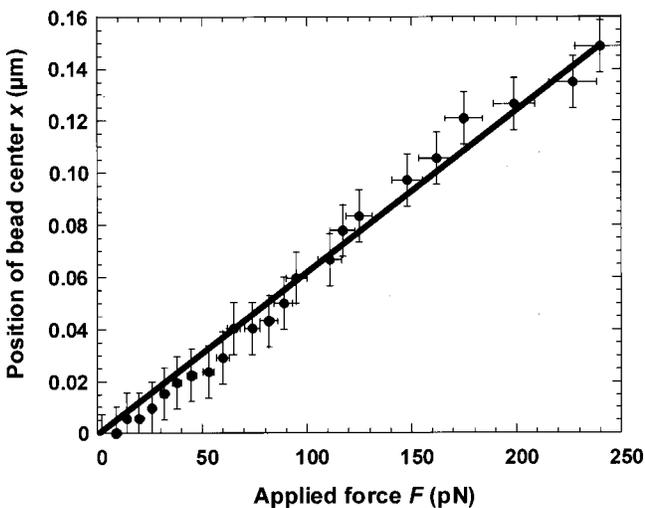


Fig. 8 Plot of the position x (in μm) of the bead center versus applied force F (in pN), characterizing optical tweezers experiments. The accuracy of the measurements is about $\pm 0.1 \mu\text{m}$ for x and $\pm 5\%$ for F . The x - F relationship is mostly linear in contrast with magnetic twisting cytometry experiments.

within the experimental resolution. However, initial and final positions sometimes differ by a few tenths of μm . A typical plot of the position of the bead center during relaxation is shown on Fig. 10. It can be accurately fitted by a mono-exponential function of time. The measured relaxation time τ varies from 1.0 to 6.7 s, with a mean value of 3.1 s averaged over 21 measurements. τ is related to the cell viscosity η and elasticity E by the relationship: τ

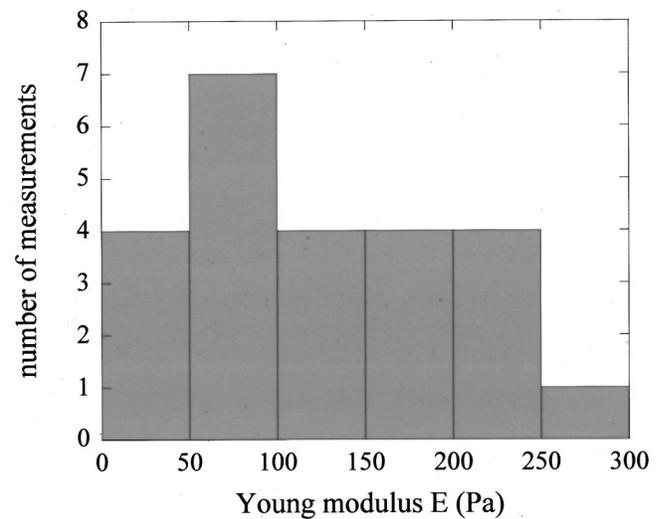


Fig. 9 The equivalent Young modulus E (in Pa) for 24 different epithelial alveolar cells measured with optical tweezers. The measured values of E lie in the range 29–258 Pa, with an average value at 125 Pa.

Table 4 Experimental results obtained for optical tweezers for the entire range of force (or torque) applied. C is the magnitude of the applied torque (in $\text{pN} \times \mu\text{m}$), n is the number of independent measurements, E -range is the range of independent measurement values, E -mean (in Pa) is the mean value of the equivalent Young elastic modulus of the intracellular medium in the tested range of torque. SD is the standard deviation.

$C = 0 - 400$ [pN· μm]	
n	24
E -range [Pa]	29–258
E -mean [Pa]	125
\pm SD	72
n	21
τ -range [s]	1.0–6.7
τ -mean [s]	3.1
\pm SD	2.0

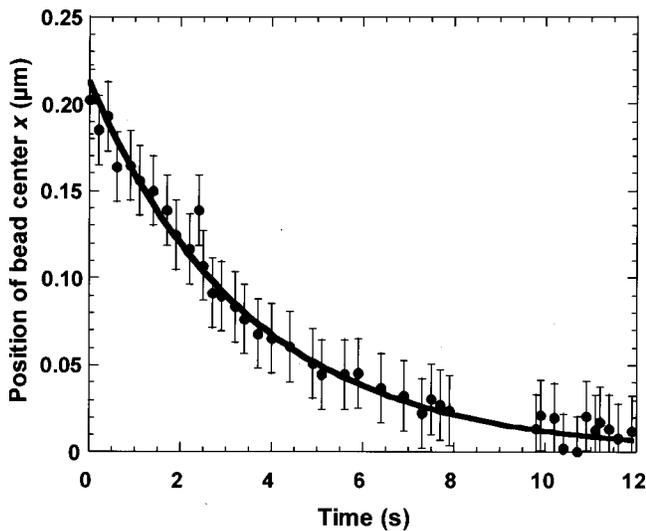


Fig. 10 Plot of the relaxation of the position x (in μm) of a bead versus time (in seconds) when the force applied by optical tweezers is switched off. The best mono-exponential fit is also shown and corresponds to a relaxation time constant: $\tau = 3.5$ s close to the mean value of 3.1 ± 2.0 s found over 21 similar relaxation curve experiments.

$\approx 3\eta/E$, which leads to a viscosity in the range 10–406 Pa·s, with an average value $\eta = 145$ Pa·s (=1450 Poise).

Discussion

The present study provides a rationale to explain whether and how probing cells by beads partly immersed in the cytoplasm could influence measurements of cellular mechanical properties. The present approach demonstrates that, even in the simplest case of a continuous and homogeneous intracellular medium, the degree of bead immersion in this intracellular medium strongly affects the stress-strain and the stress-velocity relationships, both for bead rotation and bead translation (see Tables 1 and 2, respectively). Noteworthy, the linear elasticity assumption presently used allows to provide, through analytical formula given in Table 1, a quantification at first order of the simple concept that the less immersed the bead, the easier the bead displacement, for a given medium and at a given applied stress. The consequence is that partial immersion of probes during micromanipulation measurements via beads could help to explain the scatter of data already reported for adherent cells [20,34–36]. For instance, the magnetic twisting data, analyzed according to the new procedure proposed in this study, lead to rigidity values about 6 times greater than in previous studies [8,9,13,14,23,25,26], suggesting that the very low rigidity values previously found in magnetic twisting cytometry were actually underestimated due to lack of knowledge about the stress-strain relationships characterizing the bead-cell mechanical interaction. The present study can therefore be viewed as a step toward a unification of *in vivo* cellular mechanical data. The limitation is that heterogeneity of the cellular structure or substructure is not taken into account in the present study, which likely contributes to a residual dispersion of experimental data but in a much smaller extend compared to previous reports.

In this study, we indeed performed comparative measurements of mechanical properties of a given type of living adherent cells, i.e., alveolar epithelial cells cultured on the same substrate, using two different micromanipulation techniques: magnetic twisting and optical tweezers cytometry, which both use beads specifically attached to the cells. A comparison between the results of the two micromanipulation techniques is meaningful for two reasons: firstly, we attempted to minimize the biological and mechanical differences between the two techniques, by using spherical probes

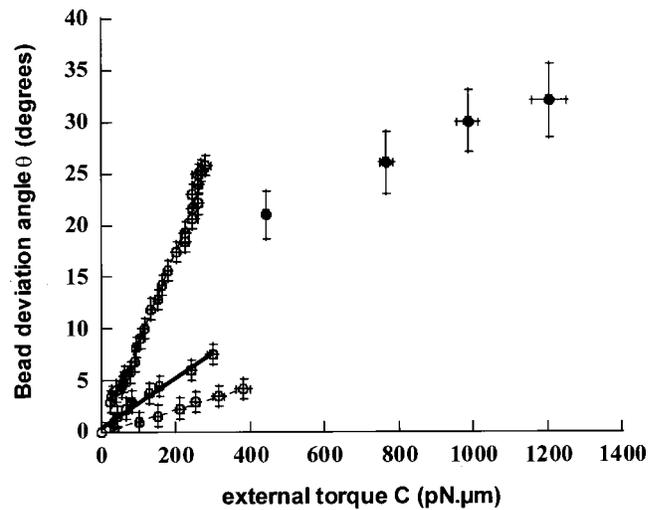


Fig. 11 Experimental comparison of the data obtained with magnetic twisting cytometry and optical tweezers: the rotation component θ° (bead deviation angle in degrees) is plotted against the external torque C (in $\text{pN} \times \mu\text{m}$) applied at equilibrium, for each micromanipulation technique. For optical tweezers, the results obtained for three different measurements (upper (\square); intermediate (\times); lower values (\circ) of equivalent Young modulus) are shown and exhibit three linear θ° - C relationships, e.g., from bottom to top: $E = 230$ Pa (close to the highest value of E measured with optical tweezers), $E = 140$ Pa (close to the average value), $E = 30$ Pa (close to the lowest measured value). The estimated accuracy is about $\pm 1^{\circ}$ for the deviation angle θ° . Magnetic twisting cytometry generally generates larger bead deviations θ° (values in degrees are mean \pm SE and correspond to dark circles \bullet), associated with a larger range of applied external torque C . Accordingly, the corresponding θ° - C relationship appears to be fairly nonlinear with twisting magnetic cytometry (see Discussion).

of similar dimensions (about $5 \mu\text{m}$ in diameter) and linked to the actin cytoskeleton via the same specific receptors (integrins). Secondly, we analyzed the data within a same theoretical description, accounting for the degree of bead immersion in each particular situation. However, there is a residual discrepancy of the data, probably because a number of differences persist between the experimental conditions. They concern:

- (i) *direction and nature of the effort*: a torque is applied during magnetic twisting while a force and a torque are applied with optical tweezers, as already indicated in the section Methods.
- (ii) *magnitude of the effort*: the torque exerted by magnetic twisting is actually greater than the torque exerted by optical tweezers as shown in Fig. 11.
- (iii) *dynamic conditions*: magnetic twisting cytometry is characterized by a transient torque which initiates 1 min of displacement towards the equilibrium state (at which rigidity modulus is measured), while the force applied by optical tweezers increases slowly, following a succession of quasi-equilibrium states. Although the rigidity modulus has recently been shown to be frequency-dependent [29,37], the data from both techniques were analyzed in the quasi-static approximation, which is a reasonable assumption taking into account the typical experimental time scales, and makes easier the comparison with standard results of the literature.
- (iv) *transcellular variability*: $5 \cdot 10^4$ cells with a mean of 2 beads bound per cell are used for a given magnetic twisting cytometry experiment, while a single bead bound to an isolated cell is used in optical tweezers experiments. Optical tweezers and magnetic twisting cytometry definitely differ in terms of number of implicated probing beads, e.g., around 10^6 implicated beads for 9 twisting magnetic cytometry measurements and only 24 implicated

beads for 24 optical tweezers experiments.

(v) *apico-basal variability*: the beads are bound over the entire apical surface of the cells in magnetic twisting, while, with optical tweezers, the cell is seen from the top and only beads bound to the side of the cell could be manipulated, i.e., close to the substrate and to the basal surface.

Despite the differences reported above, it is enlightening to compare the results obtained by the two techniques considering their common rotation component. The experimental relationship between the rotation angle θ and the applied torque C , measured by magnetic twisting near equilibrium state and by optical tweezers cytometry, are plotted in Fig. 11. In the case of optical tweezers, the torque component C associated with the exerted force F was calculated from $C = -RF \cos \alpha$ (see Appendix and above), whereas the rotation angle θ was deduced from the measured overall bead displacement x using the following equation (derived from Eq. (14)) which predicts the magnitude of the rotation component, according to α :

$$\theta = \frac{x}{R} \left[1 + \frac{3 \sin^2 \alpha}{2 \cos \alpha} \right]^{-1} \quad \text{where } \alpha < 90^\circ \quad (15)$$

This equation ensures the equivalence between Eq. (13) and Eq. (A8), used to describe bead rotation in magnetic twisting and optical tweezers, respectively. Eq. (15) means that the entire motion is almost a rotation at the smallest α values, whereas the proportion of rotation decreases as α increases, e.g., $\theta = 95\% (x/R)$ for $\alpha = 10^\circ$ and $\theta = 20\% (x/R)$ for $\alpha = 70^\circ$. Figure 11 indicates that the values of bead deviation angle and external torque obtained with the two techniques are comparable, but, on average, are larger in magnetic twisting cytometry ($\theta^\circ = 21\text{--}32^\circ$; $C = 444\text{--}1205 \text{ pN} \times \mu\text{m}$) than in optical tweezers experiments ($\theta^\circ = 0\text{--}35^\circ$; $C = 0\text{--}400 \text{ pN} \times \mu\text{m}$). Moreover, the $\theta^\circ - C$ relationships obtained with optical tweezers for three different cases (intermediate/upper/lower values of equivalent Young modulus) remain linear, while the $\theta^\circ - C$ relationship obtained with magnetic twisting cytometry is nonlinear, which is consistent with the higher values of external torque applied. This is discussed in detail in the following section.

It was shown in the Results section that measurement of the equivalent Young modulus E by magnetic twisting cytometry leads to values ranging from 34 to 58 Pa, as magnetic torque increases from 444 to 1205 $\text{pN} \times \mu\text{m}$. Parallel measurements with optical tweezers gave $29 \text{ Pa} \leq E \leq 258 \text{ Pa}$, with an average value of 125 Pa over the 24 cells tested. Noteworthy, the order of magnitude of E obtained with the two techniques is roughly the same. It is interesting to note that magnetic twisting cytometry measurements in previous studies [7,8,14,15] provided values of E generally one order of magnitude smaller than the present ones. This is because the partial bead immersion into the cytoplasm was not considered in early studies. Thus, once CSK elastic modulus is carefully recalculated based on the knowledge of theoretical relationship between bead displacement, force/torque applied to the bead and E (as shown in Tables 1 and 2), the order of magnitude of rigidity modulus is clearly higher and thus magnetic twisting cytometry data do appear closer to rigidity values measured by other techniques, e.g., micropipette aspiration [16,17] or microplate manipulation. Note also that micromanipulation techniques such as laser tracking microrheology [29] which uses fully internalized particles of very small sizes, lead to rigidity values falling in the range of values presently obtained with optical tweezers.

However, as epithelial alveolar cells were probed under similar conditions with the two techniques, in this study, a better agreement between the results could have been expected. The average Young modulus measured by magnetic twisting was found lower than that measured by optical tweezers, and several explanations can be proposed for these differences:

(i) As mentioned above, the stresses are not exerted in the same region of the cell: magnetic beads are rather bound to the apical surface of the cell, while beads trapped with optical tweezers are

located close to the basal surface. The distribution of actin filaments is known to be non-homogeneous inside the cell, as the density of polymerized actin is higher close to the basal surface [28]. Measurements by magnetic tweezers [20], Atomic Force Microscopy (AFM) [38,39], Laser Tracking Microrheology (LTM) [29] have consistently shown that the rigidity modulus is not uniform within a cell. A cell is stiffer close to its basal surface than on its apical surface [38,39]. Moreover, a higher density in F-actin is correlated with a higher viscoelastic modulus, as measured at sub-cellular level with $0.5 \mu\text{m}$ -polystyrene particles [29]. These observations help to explain the higher rigidity values measured in the present study with optical tweezers. Note that apico-basal polarity could be reinforced in the case of laser trapping due to lower cellular density, meaning more isolated and thus more attached cells (see Materials and Methods).

(ii) Similarly, the rigid plane boundary supporting the cell may influence measurement of the elastic modulus, as, in the theoretical section, the elastic intracellular medium is assumed to be infinite or semi-infinite, but in practice the cell body is limited by the rigid glass plate used as growing support. Qualitatively, it can be shown that the presence of a rigid boundary tends to increase the apparent rigidity of the intracellular medium, with a more marked effect as the measuring probe approaches this boundary. The equivalent Young modulus measured with optical tweezers could therefore be overestimated. However in magnetic twisting cytometry the proximity of the beads from the nucleus, which is known to be stiffer than the cell cytoplasm [40], could play the same role.

(iii) It has been pointed out that a precise knowledge of the degree of bead immersion into the intracellular medium is crucial for the determination of its elastic properties. In the optical tweezers experiment, this degree of bead immersion is known for each cell by measuring the half angle α limiting the adherence cone of the bead to the cell (Fig. 1). For the 24 selected cells, the measured α values ranged from 35° to 90° , with a mean value at 62° . In magnetic twisting cytometry, $\alpha = 67^\circ$ was used as the average value over the $\sim 10^5$ beads of a culture well, but in fact α is randomly distributed over a finite range of typical width $\Delta\alpha$. Consequently, the rotation angle θ_{eq} is also scattered around its average value $\langle \theta_{\text{eq}} \rangle$, with a distribution width $\Delta\theta_{\text{eq}}$ given by deriving Eq. (13). The magnetic twisting set-up actually measures the average projection $\langle \cos \theta_{\text{eq}} \rangle = B_{\text{eq}}/B_0$, from which the apparent angle of rotation $\theta'_{\text{eq}} = \cos^{-1}(B_{\text{eq}}/B_0)$ (see Eq. (12)) is deduced. In a recent study, Fabry et al. [41] showed that $\theta'_{\text{eq}} = \cos^{-1}(\langle \cos \theta_{\text{eq}} \rangle)$ is an overestimation compared to the true average angle of rotation $\langle \theta_{\text{eq}} \rangle$. Consequently, the equivalent Young modulus E calculated from θ'_{eq} in Eq. (13) is underestimated compared to the true value calculated from $\langle \theta_{\text{eq}} \rangle$. Assuming a given α -distribution, it is possible to estimate its effect on elastic modulus measured by magnetic twisting cytometry as previously proposed by Ben Fabry et al. [41]. Moreover this scattering on the values of θ_{eq} is enhanced by the fact that the applied magnetic torque is not the same for all the beads, since it is equal to $C_0 \cos \theta_{\text{eq}}$ (see Eq. (13)). For example, using the α -distribution obtained from 3D-reconstructions, as given in Fig. 3(a), leads to underestimate E by a factor of up to 2, with a reduced but non negligible non linearity with increasing the applied stress. Clearly, the number of measured α , i.e., 25, remains largely below the total number of implicated beads in each experiment, i.e., 10^5 , rendering questionable the accuracy of these simulations. Nevertheless, these effects related to heterogeneous α -distributions contribute to explain the discrepancies between magnetic twisting and optical tweezers results.

(iv) In magnetic twisting cytometry, plots of the rotation angle θ_{eq} versus torque C clearly exhibit a nonlinear behavior (Fig. 11), while plots obtained by optical tweezers are fairly linear. This may be due to several causes. First, the applied torque is, on average, larger with magnetic twisting ($400\text{--}1200 \text{ pN} \times \mu\text{m}$) than with optical tweezers ($5\text{--}400 \text{ pN} \times \mu\text{m}$). Magnetic twisting probably in-

duces deformations in the cell which can no longer be described in terms of the linear elastic theory: either large stresses (up to 40° rotation) lie outside of the range of small deformations, or there is a structural origin for these non-linearities, as in the tensegrity model [23,34]. Second irreversible plastic deformations are clearly observed during magnetic twisting (bead magnetization does not return to its initial orientation after the magnetic field has been switched off). If the rotation angle of the bead results in superimposition of elastic and plastic deformations in the cell, then this would help to explain both the nonlinear behavior of $\theta_{eq} - C$ and the difference in the measured values of the equivalent Young modulus. The exact nature of the mechanisms leading to plastic deformation during magnetic twisting, while these mechanisms do not seem to occur during laser trapping, remains not fully understood. Since the bead coating was the same with both techniques, differences in F-actin or integrin recruitment could not be evoked. It is possible that the bead deviation, significantly higher during magnetic twisting, results in a local damage to the CSK and thereby contributes to plasticity. Moreover, highly dynamic features of F-actin polymerization/organization in response to large applied stress [9,42,43] might lead to local CSK remodeling. Another argument could be a higher degree of bead immersion secondary to larger bead twisting, reinforcing non linearity.

Apparent discrepancies between the two techniques were also observed for cell viscosity η . Viscosity was in the range 4–41 Pa·s with a mean value of 23 Pa·s in magnetic twisting experiments, and in the range 10–406 Pa·s with an average value at 145 Pa·s in optical tweezers cytometry. However, since η is calculated as the product $(E \times \tau)/3$ (see Eq. (5)), these apparent differences are not relevant, as they mainly reflect differences in the measured equivalent Young modulus E . The relevant physical parameter here is the time constant τ describing the exponential relaxation of the cell toward equilibrium, after releasing the stress. This relaxation time was fairly comparable in the two techniques, in the range 0.2–2.9 s for magnetic twisting (see Table 3) and 1–6.7 s for optical tweezers (see Table 4). The observed difference in mean τ -values, i.e., 1.3 s in magnetic twisting and 3.1 s laser trapping, is not sufficiently significant to allow a detailed interpretation. The exponential behavior of relaxation means that, in both cases, the dissipative contribution to the viscoelastic force (resp. torque) appears proportional to the velocity (resp. angular velocity). At this stage, it can be concluded that the dissipative mechanisms in the cell are probably similar in the two types experiments.

Conclusion

In this study, we performed micromanipulation experiments on pulmonary epithelial cells using two different techniques which share a number of common features: in both cases, the stiffness of the cell cytoskeleton was tested via similar probes (microbeads) bound to cytoskeleton-connected mechanoreceptors (integrins), and submitted to a torque (magnetic twisting cytometry) or a force (optical tweezers). Comparative analysis of the values of equivalent Young modulus E measured by the two techniques, once corrected on the basis of the presently developed bead immersion theory, show that the two ranges of values overlap ($29 \leq E \leq 250$ Pa) with however values for magnetic twisting in the bottom range. The obtained values, and particularly those obtained in magnetic twisting cytometry, now appear consistent with measurements from previously published experiments [29]. Thus, the present study contributes to unify experimental data obtained in cells and reduces unexplained discrepancies by a careful description of the bead as a probe to study cell response. Mechanical dissipation was also probed by looking at the cell relaxation toward equilibrium, after releasing the stress. The characteristic time scales were not very different with the two techniques, mean-

ing similar dissipative effects which appears to be a reasonable conclusion considering the almost identical sizes of the ferromagnetic and silica probes used.

However, a number of systematic differences were observed between the two experiments: (i) on average, the measured value of E was larger with optical tweezers than with magnetic twisting cytometry, and (ii) the strain-stress relationship was linear with optical tweezers, and nonlinear with magnetic twisting. The possible origins of these differences are carefully listed in the discussion: nature and amplitude of applied stresses, location of the probe over the cell, distribution of the degree of immersion of the rotated/translated microprobes, possible occurrence of plastic deformations, etc. In conclusion, we would like to emphasize the key role played by all these parameters in the global understanding of all micromanipulation experiments performed on living cells in order to probe their mechanical properties.

Acknowledgments

Authors gratefully thank Jean-Claude Bacri and Florence Gazeau for helpful advice concerning the magnetic calibration of beads by the Foner method, Antoine Mary and Matthieu Rambaudon for technical assistance on magnetic twisting cytometry. This study was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM, France, contrat n°4M106C, Intercommission n°1) and by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, Program Physique et Chimie du Vivant, PCV98-097).

Nomenclature

- a = arbitrary small distance or radius of thin disc in contact with intracellular medium
- $i = (-1)^{1/2}$
- \mathbf{n} = unit vector
- r = radial coordinate
- \mathbf{u}_1 = local elastic deformation in infinite medium
- \mathbf{u}_2 = local elastic deformation in semi-infinite medium
- \mathbf{u}_{1x} = x -component of the local elastic deformation in infinite medium
- $\mathbf{u}_{2x}, \mathbf{u}_{2y}, \mathbf{u}_{2z}$ = x, y, z -components of the local elastic deformation in semi-infinite medium
- x = bead displacement and first coordinate
- x_1 = global translation in the x -direction for a bead immersed in infinite medium
- x_2 = global translation for a bead half-immersed in semi-infinite medium
- x' = averaged bead displacement
- x_3 = global bead translation for a bead in contact by a small area with semi-infinite medium
- \dot{x} = bead velocity
- y, z = second and third coordinates
- B_t, B_0 = horizontal remanent magnetic field at time t , and at time $t=0$
- C = external torque applied
- C' = opposing torque exerted by the intracellular medium
- C_v = viscoelastic torque
- C_e, C_d = elastic and dissipative contributions to C_v
- d = deviation of bead center from optical trap center
- E = equivalent Young Modulus
- F = external force applied
- F_v = viscoelastic force (vector)
- F_e, F_d = elastic and dissipative contributions to F_v
- \mathbf{H} = external magnetic field (vector)
- R = bead radius
- m = bead magnetic moment
- M = bead magnetization

P_{\max} = maximum power of the optical tweezers laser
 T = tension
 V = bead volume
 α = half-angle of bead immersion
 α_m = mean half-angle of bead immersion
 β_e, β_d = numerical coefficients for elastic and dissipative contributions to F_v
 γ_e, γ_d = numerical coefficients for elastic and dissipative contributions to C_v
 η = equivalent viscosity
 ν = Poisson modulus
 $\pi = 3.14159 \dots$
 $\theta, \theta_t, \theta', \theta_{eq}$ = bead angular deviation in radians, at time t, in degrees, at equilibrium
 θ'_{eq} = apparent bead deviation at equilibrium
 θ_1 = global bead rotation in infinite medium
 θ_2 = global bead rotation in semi-infinite medium
 θ_3 = global rotation of a bead in contact by a small area with a semi-infinite medium
 $\dot{\theta}$ = time derivative of bead deviation
 σ = stress tensor
 $\langle \sigma \rangle$ = averaged shear stress exerted by the bead on the intracellular medium
 τ = time constant of the relaxation response
 ω = angular frequency

Appendix

1 Elastic Response. At equilibrium, or in a quasi static approximation, we calculate the displacement (translation or rotation) of a rigid spherical bead, surrounded by a homogeneous elastic medium, and submitted to a known mechanical effort (either a force F , or a torque C , applied to its center). To ensure mechanical balance, the medium also exerts a force $F_e = -F$ or a torque $C_e = -C$ on the bead. We consider the three geometric configurations described in the text (Fig. 1(a), 1(b) and 1(c)). We assume small deformations of the medium, so that linear elasticity applies. The elastic properties of the medium are determined by its Young modulus E and its Poisson modulus ν . We also assume that the medium is incompressible ($\nu=0.5$), which is a realistic hypothesis in the case of the cellular cytoplasm. In this case, a single coefficient $E=3\mu$ characterizes the medium elastic behavior, where μ is the shear modulus. Extending the calculation to the case of a compressible medium would be more complex, but would not present any additional algebraic difficulty.

The boundary conditions are such that the displacement of the medium is the same for all points of the bead surface (either a global translation or rotation). However, as the analytical solution matching these conditions is not known, we approximate the exact solution in the following way: we assume that the real displacement of a bead of radius R localized in the elastic medium at the origin of coordinates O is close to the average displacement of the same medium, in the absence of bead, but submitted to a single force F (or torque C) localized at O . The displacement is averaged over a portion of the spherical surface of same radius R as the bead. This approximation assumes a small dispersion of the deformations on the sphere surface, and its validity will be discussed at the end of this section.

1 Bead Immersed in an Infinite Medium. Let us first consider the case of an infinite, incompressible medium (Fig. 1(a)). The elastic deformation u_1 generated at the point M ($OM = r$) by a force F localized at O is given by [35,44]:

$$u_1 = \frac{3}{8\pi E} \frac{F + (n \cdot F)n}{r} \quad (A1)$$

The global (averaged) translation x_1 of a bead of radius R is given by averaging $u_{1,x}$ over the entire spherical surface $r=R$:

$$x_1 = \frac{1}{2\pi E} \frac{F}{R} = -\frac{1}{2\pi E} \frac{F_e}{R} \quad (A2)$$

Similarly, the deformation induced by a torque C is the sum of the deformations induced by two opposite forces F and $-F$, both localized close to the origin, at a small distance a from each other ($a \ll R$), such that $C = a \otimes F$. The result was found not to depend on the direction of the forces F and $-F$. At a distance R from the origin, it may be decomposed into a radial displacement, averaging zero over all directions, and a tangential displacement, independent of the direction n , equivalent to a global rotation of the bead by an angle θ_1 :

$$\theta_1 = \frac{3}{8\pi E} \frac{C}{R^3} = -\frac{3}{8\pi E} \frac{C_e}{R^3} \quad (A3)$$

2 Bead Half-Immersed in a Semi-Infinite Medium. A similar approach is used in the case represented on Fig. 1(b). The deformation u_2 generated at distance r by a force F parallel to Ox is [45]:

$$u_{2,x} = \frac{3F}{4\pi E} \left(\frac{1}{r} + \frac{x^2}{r^3} \right); \quad u_{2,y} = \frac{3F}{4\pi E} \frac{xy}{r^3}; \quad u_{2,z} = \frac{3F}{4\pi E} \frac{xz}{r^3} \quad (A4)$$

For a spherical surface of radius $r=R$, we find that the average translation in the plane $z=0$ is larger than the translation at the lower pole $z=-R$; the force F actually generates both translation of the bead in the x -direction and rotation around the y -axis. The displacement x_2 averaged along the circle of radius R located in the $z=0$ plane is assumed to be equal to the global translation of the bead center, and is given by:

$$x_2 = -\frac{9}{8\pi E} \frac{F_e}{R} \quad (A5)$$

The deformation induced by a torque C is the combination of the responses generated by two opposite forces, as shown above. The resulting rotation angle of the bead is:

$$\theta_2 = -\frac{3}{4\pi E} \frac{C_e}{R^3} \quad (A6)$$

which is exactly twice the rotation angle θ_1 of the bead in an infinite medium.

3 Bead in Contact by a Small Area with a Semi-Infinite Medium. The same approach as in case i) and ii) can be used for the last configuration (Fig. 1(c)). If the force F was applied to the center O' of the circular contact area of radius $r=R \sin \alpha$ ($\alpha \ll 1$), the average translation x' would be (as in case ii)

$$x' = -\frac{9}{8\pi E} \frac{F_e}{R \sin \alpha} \quad (A7)$$

However, when F is applied to the center O of the bead, the equilibrium condition of the bead implies that the elastic medium exerts an extra torque C_e , roughly given by $C_e = -RF \cos \alpha$, onto the bead via the contact region. The rotation corresponding to the torque C_e may be calculated as in cases i) and ii), giving the equation:

$$\theta_3 = -\frac{3}{4\pi E} \frac{C_e}{R^3 \sin^3 \alpha} \quad (A8)$$

Finally, the total displacement x_3 of the bead center O in this configuration is the sum of a global translation x' of the bead and a displacement $x'' = R\theta_3$ of the center due to bead rotation, in the same direction as x' :

$$x_3 = -\frac{3}{4\pi E} \frac{F_e}{R} \left(\frac{3}{2 \sin \alpha} + \frac{\cos \alpha}{\sin^3 \alpha} \right) \quad (A9)$$

Let us now discuss the validity of the approximation consisting in replacing the true displacement of the bead of radius R immersed in the medium by the free displacement of the medium alone, submitted to a local force (or torque), and averaged over a sphere (or a portion of a sphere) with the same radius R . In the case of a force F , equations (A1) and (A4) show that the free displacements differ only by a numerical factor (at most by 50%) from one point of the sphere to another. In the case of a torque C , the approximation is better since the rotation angle induced by the torque is the same over all points of the sphere. We therefore conclude that the proposed formula accurately reflects the behavior of x (or θ) versus F_e (or C_e), R and α , and provides reasonably reliable numerical prefactors (the error is estimated to be less than 20%).

2 Dissipative Response. In this section, we assume that, on the experimental time scale, the dissipation is correctly described by a viscosity coefficient $\eta = \eta(\omega=0)$ extrapolated at zero frequency. In the case of bead translation, we recall below the relationships reported in the literature between the drag force F_d and the velocity \dot{x} of a bead generating a Poiseuille flow in a continuous medium of viscosity η , under the same geometric configurations as above (Fig. 1(a), (b), and (c)).

When the spherical bead is immersed in the infinite medium, the well known Stokes formula applies:

$$F_d = -6\pi R\eta\dot{x} \quad (A10)$$

If the bead is half immersed in a semi-infinite medium, the flow profile is the same as if the medium was infinite, but the total drag force is half that of the above conditions:

$$F_d = -3\pi R\eta\dot{x} \quad (A11)$$

For a bead in contact with a small area, the problem is equivalent to the displacement of a thin disc with radius $a = R \sin \alpha$ at the surface of a viscous medium. The result is [46]:

$$F_d = -\frac{16}{3} R \sin \alpha \eta \dot{x} \quad (A12)$$

Finally, the relationship between the dissipative torque C_d and the angular velocity $\dot{\theta}$ of a bead rotating in an infinite medium is known to be [46]:

$$C_d = -8\pi R^3 \eta \dot{\theta} \quad (A13)$$

No analytical expression was found between the dissipative torque and the bead angular velocity for the other two configurations.

References

- [1] Dai, J., and Sheetz, M. P., 1995, "Regulation of Endocytosis, exocytosis, and shape by Membrane Tension," *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **60**, pp. 567–571.
- [2] Davies, P. F., and Tripathi, S. C., 1993, "Mechanical Stress Mechanisms and the Cell, an Endothelial Paradigm," *Circ. Res.*, **72**, pp. 239–245.
- [3] Heidemann, S. R., and Buxbaum, R. E., 1994, "Mechanical Tension as a Regulator of Axonal Development," *Neurotoxicology*, **15**, pp. 95–107.
- [4] Ingber, D. E., Prusty, D., Sun, Z., Betensky, H., and Wang, N., 1995, "Cell Shape, Cytoskeletal Mechanics, and Cell Cycle Control in Angiogenesis," *J. Biomech.*, **28**, pp. 1471–1484.
- [5] Schmidt, C. E., Dai, J., Lauffenburger, D. A., Sheetz, M. P., and Horwitz, A. F., 1995, "Integrin-cytoskeletal Interactions in Neuronal Growth Cones," *J. Neurosci.*, **15**, pp. 3400–3407.
- [6] Stossel, T. P., 1993, "On the Crawling of Animal Cells," *Science*, **260**, pp. 1086–1094.
- [7] Wang, N., and Ingber, D. E., 1994, "Control of Cytoskeletal Mechanics by Extracellular Matrix, Cell Shape and Mechanical Tension," *Biophys. J.*, **66**, pp. 1–9.
- [8] Wang, N., Butler, J. P., and Ingber, D. E., 1993, "Mechanotransduction Across the Cell Surface and Through the Cytoskeleton [see comments]," *Science*, **260**, pp. 1124–1127.
- [9] Choquet, D., Felsenfeld, D. P., and Sheetz, M. P., 1997, "Extracellular Matrix Rigidity Causes Strengthening of Integrin-Cytoskeleton Linkages," *Cell*, **88**, pp. 39–48.
- [10] Heidemann, S. R., 1993, "A New Twist on Integrins and the Cytoskeleton," *Science*, **260**, pp. 1080–1081.
- [11] Ingber, D. E., Dike, L., Hansen, L., Karp, S., Liley, H., Maniotis, A., McNamee, H., Mooney, D., Plopper, G., Sims, J., and Wang, N., 1994, "Cellular Tensegrity: Exploring How Mechanical Changes in the Cytoskeleton Regulate Cell Growth, Migration, and Tissue Pattern During Morphogenesis," *Int. Rev. Cytol.*, **150**, pp. 173–224.
- [12] Janmey, P. A., 1998, "The Cytoskeleton and Cell Signaling: Component Localization and Mechanical Coupling," *Physiol. Rev.*, **78**, pp. 763–781.
- [13] Planus, E., Galiacy, S., Matthey, M., Laurent, V., Gavrilovic, J., Murphy, G., Clérici, C., Isabey, D., Lafuma, C., and d'Ortho, M. P., 1999, "Role of Collagenase in Mediating In Vitro Alveolar Epithelial Wound Repair," *J. Cell. Sci.*, **112**(Pt. 2), pp. 243–252.
- [14] Potard, U. S., Butler, J. P., and Wang, N., 1997, "Cytoskeletal Mechanics in Confluent Epithelial Cells Probed through Integrins and E-cadherins," *Am. J. Physiol.*, **272**, pp. C1654–1663.
- [15] Hubmayr, R. D., Shore, S. A., Fredberg, J. J., Planus, E., and Wang, N., 1996, "Pharmacological Activation Changes Stiffness of Cultured Human Airway Smooth Muscle Cells," *Am. J. Physiol.*, **271**, pp. C1660–C1668.
- [16] Sato, M., Theret, D. P., Wheeler, L. T., Ohshima, N., and Nerem, R. M., 1990, "Application of the Micropipette Technique to the Measurement of Cultured Porcine Aortic Endothelial Cell Viscoelastic Properties," *J. Biomech. Eng.*, **112**, pp. 263–268.
- [17] Sato, M., Ohshima, N., and Nerem, R. M., 1996, "Viscoelastic Properties of Cultured Porcine Aortic Endothelial Cells Exposed to Shear Stress," *J. Biomech.*, **29**, pp. 461–467.
- [18] Petersen, N. O., McConnaughey, W. B., and Elson, E. L., 1982, "Dependence of Locally Measured Cellular Deformability on Position on the Cell, Temperature, and Cytochalasin B," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, pp. 5327–5331.
- [19] Thoumine, O., Ott, A., Cardoso, O., and Meister, J. J., 1999, "Microplates: A New Tool for Manipulation and Mechanical Perturbation of Individual Cells," *J. Biochem. Biophys. Methods*, **39**, pp. 47–62.
- [20] Bausch, A. R., Möller, W., and Sackmann, E., 1999, "Measurement of Local Viscoelasticity and Forces in Living Cells by Magnetic Tweezers," *Biophys. J.*, **76**, pp. 573–579.
- [21] Shroff, S. G., Saner, D. R., and Lal, R., 1995, "Dynamic Micromechanical Properties of Cultured Rat Atrial Myocytes Measured by Atomic Force Microscopy," *Am. J. Physiol.*, **269**, pp. C286–292.
- [22] Stamenovic, D., and Coughlin, M. F., 2000, "A Quantitative Model of Cellular Elasticity Based on Tensegrity," *J. Biomech. Eng.*, **122**, pp. 39–43.
- [23] Wendling, S., Oddou, C., and Isabey, D., 1999, "Stiffening Response of a Cellular Tensegrity Model," *J. Theor. Biol.*, **196**, pp. 309–325.
- [24] Svoboda, K., and Block, S. M., 1994, "Biological Applications of Optical Forces," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **23**, pp. 247–285.
- [25] Hénon, S., Lenormand, G., Richert, A., and Gallet, F., 1999, "A New Determination of the Shear Modulus of the Human Erythrocyte Membrane Using Optical Tweezers," *Biophys. J.*, **76**, pp. 1145–1151.
- [26] Lenormand, G., Hénon, S., and Gallet, F., 1999, "Measurement of the Elastic Coefficients of an Isolated Red Blood Cell Membrane Skeleton with Optical Tweezers," *Arch. Physiol. Biochem.*, **107**, pp. 69.
- [27] Wang, N., and Ingber, D. E., 1995, "Probing Transmembrane Mechanical Coupling and Cytomechanics Using Magnetic Twisting Cytometry," *Biochem. Cell Biol.*, **73**, pp. 327–335.
- [28] Wendling, S., Planus, E., Laurent, V., Barbe, L., Mary, A., Oddou, C., and Isabey, D., 2000, "Role of Cellular Tone and Microenvironmental on Cytoskeleton Stiffness Assessed by Tensegrity Model," *Eur. Phys. J.: Appl. Phys.*, **9**, pp. 51–62.
- [29] Yamada, S., Wirtz, D., and Kuo, S. C., 2000, "Mechanics of Living Cells Measured by Laser Tracking Microrheology," *Biophys. J.*, **78**, pp. 1736–1747.
- [30] Foner, S., and Macniff Jr, E. J., 1968, *The Review of Scientific Instrument.*, **39**, pp. 171–181.
- [31] Sheetz, M. P., 1998, "Laser Tweezers in Cell Biology, Introduction," *Methods Cell Biol.*, **55**, pp. xi–xii.
- [32] Simmons, R. M., Finer, J. T., Chu, S., and Spudich, J. A., 1996, "Quantitative Measurements of Force and Displacement Using an Optical Trap," *Biophys. J.*, **70**, pp. 1813–1822.
- [33] Wang, N., 1998, "Mechanical Interactions Among Cytoskeletal Filaments," *Hypertension*, **32**, pp. 162–165.
- [34] Stamenovic, D., and Coughlin, M. F., 1999, "The Role of Prestress and Architecture of the Cytoskeleton and Deformability of Cytoskeleton Filaments in Mechanics of Adherent Cells: A Quantitative Analysis," *J. Theor. Biol.*, **201**, pp. 63–74.
- [35] Ziemann, F., Rädler, J., and Sackmann, E., 1994, "Local Measurements of Viscoelastic Moduli of Entangled Actin Networks Using an Oscillating Magnetic Bead Micro-rheometer," *Biophys. J.*, **66**, pp. 2210–2216.
- [36] Bausch, A. R., Ziemann, F., Boulbitch, A. A., Jacobson, K., and Sackmann, E., 1998, "Local Measurements of Viscoelastic Parameters of Adherent Cell Surfaces by Magnetic Bead Microrheometry," *Biophys. J.*, **75**, pp. 2038–2049.
- [37] Maksym, G. N., Fabry, B., Butler, J. P., Navajas, D., Tschumperlin, D. J., Laporte, J. D., and Fredberg, J. J., 2000, "Mechanical Properties of Cultured Human Airway Smooth Muscle Cells from 0.05 to 0.4 Hz," *J. Appl. Physiol.*, **89**, pp. 1619–1632.
- [38] Rotsch, C., Braet, F., Wisse, E., and Radmacher, M., 1997, "AFM Imaging and Elasticity Measurements on Living Rat Liver Macrophages," *Cell Biol. Int.*, **21**, pp. 685–696.
- [39] Goldmann, W. H., Galneder, R., Ludwig, M., Lu, W., Adamson, E. D., Wang, N., and Ezzell, R. M., 1998, "Differences in Elasticity of Vinculin-deficient F9

Cells Measured by Magnetometry and Atomic Force Microscopy," *Exp. Cell Res.*, **239**, pp. 235–242.

- [40] Maniotis, A. J., Chen, C. S., and Ingber, D. E., 1997, "Demonstration of Mechanical Connections Between Integrins, Cytoskeletal Filaments, and Nucleoplasm that Stabilize Nuclear Structure," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, pp. 849–854.
- [41] Fabry, B., Maksym, G. N., Hubmayr, R. D., Butler, J. P., and Fredberg, J. J., 1999, "Implications of Heterogeneous Bead Behavior on Cell Mechanical Properties Measured with Magnetic Twisting Cytometry," *J. Magn. Magn. Mater.*, **194**, pp. 120–125.
- [42] Richelme, F., Benoliel, A. M., and Bongrand, P., 2000, "Dynamic Study of Cell Mechanical and Structural Responses to Rapid Changes of Calcium Level," *Cell Motil. Cytoskeleton*, **45**, pp. 93–105.
- [43] Wang, J. S., Pavlotsky, N., Tauber, A. I., and Zaner, K. S., 1993, "Assembly Dynamics of Actin in Adherent Human Neutrophils," *Cell Motil. Cytoskeleton*, **26**, pp. 340–348.
- [44] Landau, L., and Lifchitz, E., 1959, *Theory of Elasticity*, Pergamon Press, London.
- [45] Love, A. E. H., 1944, *A Treatise on the Mathematical Theory of Elasticity (4th edition)*, Dover Publications, New York.
- [46] Landau, L., and Lifchitz, E., 1971, *Fluid Mechanics*, Bergamon Press, London.

Martial Balland · Alain Richert · François Gallet

The dissipative contribution of myosin II in the cytoskeleton dynamics of myoblasts

Received: 6 August 2004 / Revised: 6 November 2004 / Accepted: 11 November 2004 / Published online: 18 December 2004
© EBSA 2004

Abstract We have determined the microrheological response of the actin meshwork for individual cells. We applied oscillating forces with an optical tweezer to a micrometric bead specifically bound to the actin meshwork of C2 myoblasts, and measured the amplitude and phase shift of the induced cell deformation. For a non-perturbed single cell, we have shown that the elastic and loss moduli G' and G'' behave as power laws f^α and f^β of the frequency f ($0.01 < f < 50$ Hz), α and β being in the range 0.15–0.35. This demonstrates that the dissipation mechanisms in a single cell involve a broad and continuous distribution of relaxation times. After adding blebbistatin, an inhibitor of myosin II activity, the exponent of G' decreases to about 0.10, and G'' becomes roughly constant for $0.01 < f < 10$ Hz. The actin meshwork appears less rigid and less dissipative than in the control experiment. This is consistent with an inhibition of ATPase and reduction of the gliding mobility of myosin II on actin filaments. In this frequency range, the actomyosin activity appears as an essential mechanism allowing the cell to adapt to an external mechanical stress.

Keywords Actin meshwork viscoelasticity · Myosin · Microrheology · Optical tweezers · Blebbistatin

Introduction

The cytoskeleton plays a crucial role in the cell's mechanical behaviour. It can withstand large stresses, and enables the cell to resist external stresses and to maintain its structural integrity. Also, the cytoskeleton's dynamical properties and interactions with associated proteins, especially molecular motors, makes it an essential regulatory element in many functions such as cell adhesion, migration and division. Moreover, the cytoskeleton filaments can both transmit mechanical efforts and carry chemical charges from the cell's periphery towards the inner cell parts and nucleus, and thus participate in several mechanotransduction processes (Janmey 1998). This explains why the mechanical properties of the cytoskeletal network are the subject of many experimental studies. These works have been made possible by the development of numerous quantitative micromanipulation techniques, such as micropipettes (Sato et al. 1996), cell poking (Petersen et al. 1982), shear flow cytometry (Dewey et al. 1981; Barbee et al. 1994), atomic force microscopy (AFM) (Rotsch et al. 1997; Sato et al. 2000; Alcaraz et al. 2003), microplates (Thoumine and Ott 1997; Caille et al. 2002), optical tweezers (Laurent et al. 2002) and stretchers (Guck et al. 2001), magnetic tweezers (Bausch et al. 1999; Wilhelm et al. 2003) and twisters (Laurent et al. 2002; Fabry et al. 2001) and particle tracking (Tseng et al. 2002). These techniques are complementary, in the sense that they probe the behaviour of the intracellular medium at different length scales and time scales, and implement stresses and strains of different nature and having different orders of magnitude. Although the microtubule and intermediate filament networks are known to participate in the response of the cellular medium (Janmey et al. 1991; Caspi et al. 2002), many results focus on the mechanical behaviour of the actin meshwork, which is made possible by specifically directing the probe towards actin filaments.

M. Balland · A. Richert · F. Gallet
Laboratoire de Biorhéologie et Hydrodynamique Physico-chimique, UMR 7057 associée au CNRS et à l'Université Paris 7, Case courrier 7056—2, place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France

M. Balland · A. Richert · F. Gallet (✉)
Fédération de Recherche "Matière et Systèmes Complexes" FR 2438, associée au CNRS et à l'Université Paris 7, Case courrier 7056—2, place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France
E-mail: frgallet@ccr.jussieu.fr
Tel.: + 33-1-44277782
Fax: + 33-1-44274335

As a consequence of the diversity of the techniques used, one does not expect the results of the various experiments to match exactly, but some general features may be drawn: (1) the apparent elastic modulus that was measured seems to decrease with the probe size (Maksym et al. 2000), and its dispersion reflects the heterogeneous density of the actin meshwork inside the cell (Wilhelm et al. 2003; Yamada et al. 2000); (2) dissipation phenomena inside the cell cannot be assigned to a single time relaxation, nor to a finite number of time relaxations. Practically, this means that it is not possible to accurately model the cell's mechanical behaviour by associating several springs and dashpots, respectively accounting for elastic restoring forces and viscous damping. In other words, a simple picture of the cellular medium as a Maxwell viscoelastic liquid or a Kelvin–Voigt solid, or any finite combination of them, is not realistic. This conclusion is supported by several microrheological experiments. Fabry et al. (2001) have measured the complex viscoelastic response $G(f) = G'(f) + iG''(f)$ of human airway smooth muscle cells submitted to an oscillating force at frequency f . They showed that, on average, both the storage (G') and loss (G'') moduli behave as the same power law f^α of the frequency, in the range $0.01 < f < 100$ Hz. The exponent α is found between 0.15 and 0.30. The same kind of power-law behaviour was observed in lung epithelial cells by an oscillating indentation experiment with AFM (Alcaraz et al. 2003). Moreover, the free motion of particles microinjected in a cell's cytoplasm exhibits non-standard sub-diffusive or super-diffusive behaviour (Tseng et al. 2002) at different time scales, which cannot be interpreted within a classical viscous fluid picture. These results tend to show that the dissipation processes inside the cell involve a continuous distribution of relaxation times. It has also been noted that the viscoelastic response of cells is on average similar to that of soft glassy materials (Sollich et al. 1997; Sollich 1998), but the elementary mechanisms possibly explaining this analogy have not been identified.

At this stage, several questions arise. Prior to any interpretation of the dissipative mechanisms in the actin meshwork, a precise knowledge of the viscoelastic response of a single cell is required. The power laws G' , $G'' \propto f^\alpha$ were established by analyzing the average response of several cells, and this averaging may mask some individual features. It has been reported that power laws remain valid on a cell-by-cell basis (Fabry et al. 2003; Puig-de-Morales et al. 2004; Lenormand et al. 2004), but no demonstrative data on single cells have ever been published. Thus, this point still needs to be carefully investigated.

Another key issue is to understand the origins of the dissipation inside the cell. Considering a continuous range of relaxation times, it is crucial to identify the respective contribution to the mechanical response of the different dissipative mechanisms, such as actin polymerisation and depolymerisation, filament cross-linking, and molecular motor activity. This can be

done by specifically enhancing or inhibiting one of these processes, and measuring how the meshwork's viscoelastic response is affected. Concerning the dynamics of actin filaments, it has already been shown that the depolymerising action of cytochalasin D makes the meshwork softer and more fluid (Fabry et al. 2001), and prevents the cell from reorganising over a large time scale (> 15 min) after uniaxial stretching (Thoumine and Ott 1997). Similar effects were observed with latrunculin, an actin-disrupting agent (Wilhelm et al. 2003; Yamada et al. 2000). On the other hand, the role played by molecular motors is far from being fully elucidated. Recent studies have shown that the viscoelastic coefficient $G(f) = G' + iG''$ of in vitro actin gels also scales with frequency f as a power law f^α , where α is close to 0.75 in the passive state (Amblard et al. 1996; Palmer et al. 1999), and increases to 0.87 when myosin is ATP-activated (Le Goff et al. 2002). This indicates that, in vitro, the activity of the actomyosin complex enhances the longitudinal filament fluctuations, and makes the gel response closer to that of a purely viscous fluid. In living cells, adding myosin inhibitors changes the mechanical answer to a stress under static conditions (An et al. 2002). However, to our knowledge, no study has yet been reported concerning the frequency-dependent microrheological response of the actin meshwork in living cells, while specifically blocking the actomyosin complex activity in a controlled way.

The present work brings two distinct contributions to the discussion above. In this experimental study, we used an optical tweezer to apply controlled mechanical forces to the actin meshwork in C2 myoblasts, via silica microbeads bound to transmembrane integrins. Firstly, for each individual cell, the dynamical viscoelastic response $G(f) = G'(f) + iG''(f)$ was measured as a function of frequency f , in the range $0.05 < f < 50$ Hz. We show that power laws G' , $G'' \propto f^\alpha$ accurately describe the mechanical behaviour of individual cells. Secondly, we used blebbistatin to specifically block the myosin II activity inside the living cell (Straight et al. 2003, Kovacs et al. 2004). Blebbistatin has been shown to inhibit the adenosine triphosphatase (ATPase) and the gliding mobility of myosin II in human platelets, but it does not modify the activity of myosin light-chain kinase. Comparing the individual mechanical response of control cells and of cells treated with blebbistatin, we show that their behaviours are noticeably different. The elastic and loss moduli $G'(f)$ and $G''(f)$ of treated cells are both smaller than for control cells. Moreover, for treated cells, $G'(f)$ still exhibits a power law f^α , but with α' of the order of 0.1, smaller than for control cells. At the same time, the loss modulus $G''(f)$ of the treated cells remains nearly constant in the range 0.05–10 Hz, and increases rapidly for $f > 10$ Hz. Thus, inhibiting the actomyosin complex by blebbistatin simultaneously induces a decrease in rigidity and a more elastic behaviour of the actin meshwork. This result shows that the myosin activity makes the meshwork more rigid and

more dissipative, especially in the range of time scales larger than 100 ms.

Methods

The muscular cell line C2 (kindly provided by M. Lambert and R.M. Mège, INSERM U440, Institut du Fer à Moulin, Paris) was maintained in a stock callus culture in Dulbecco's Modified Essential Medium with 4.5 g/l glucose, 200 mM glutamine, 20% heat-inactivated FCS and penicillin–streptomycin (penicillin = 10,000 U/ml, streptomycin = 10 mg/ml). Cells were grown at 37°C under a humidified 5% CO₂ atmosphere. Every 3 days, just before confluent state, cells were subcultivated in a volume of 5 ml of fresh medium. The day before experiments, cells were detached (1% trypsin and 1 mM EDTA) and were grown on 22×22-mm glass coverslips coated with 5 µg/ml fibronectin.

To probe the dynamic properties of the actin cytoskeleton, carboxylated silica microbeads (3.47-µm diameter, Bangs Laboratories Inc., IN, USA) were specifically bound to integrin and used as handles to apply mechanical stress to the cell with an optical trap. The specific binding was achieved by coating the beads with arginine–glycine–aspartic tripeptide (RGD), according to the manufacturer's procedure (Telios pharmaceuticals, CA, USA). To prevent non-specific binding, coated beads were incubated in a serum-free culture medium supplemented with 1% BSA at 37°C. Thirty minutes before starting the experiment, the bead suspension (50 µg/ml) was added to the cells at 37°C, in order to bind between 1 and 5 beads to each cell (see Fig. 1a). Unbound beads were washed away with serum-free culture medium 1% BSA. A closed experimental chamber was made by sealing the coverslip to a microscope slide, separated by a plastic film spacer (80 to 150 µm thick). This chamber was mounted on a piezoelectric stage (model P-780 Polytec PI), allowing constant or variable displacements, in the range 0–100 Hz (maximum excursion 80 µm). The whole set-up was placed on the plate of an inverted microscope (Leica DMIRB). All measurements were performed in a 37°C thermalisation box (Life Imaging services, Switzerland).

As a blocker of the actomyosin complex, we used a molecular tool that specifically targets myosin II. It has been shown that blebbistatin exclusively acts on myosin II, inhibiting ATPase and gliding motility of myosin in human platelets (Straight et al. 2003). We prepared a 75-mM stock solution in DMSO of (±) blebbistatin—a racemic mixture of both enantiomers—(Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France). We checked the concentration by using the extinction coefficient 7,400 M⁻¹ cm⁻¹ at 422 nm (Straight et al. 2003). The stock solution was diluted 1,000 times in the culture medium in which the cells were grown. At this concentration (75 µM), the relative ATPase activity and the gliding filament velocity are reduced to 5 and 20% of their initial value, respectively (Straight et al. 2003).

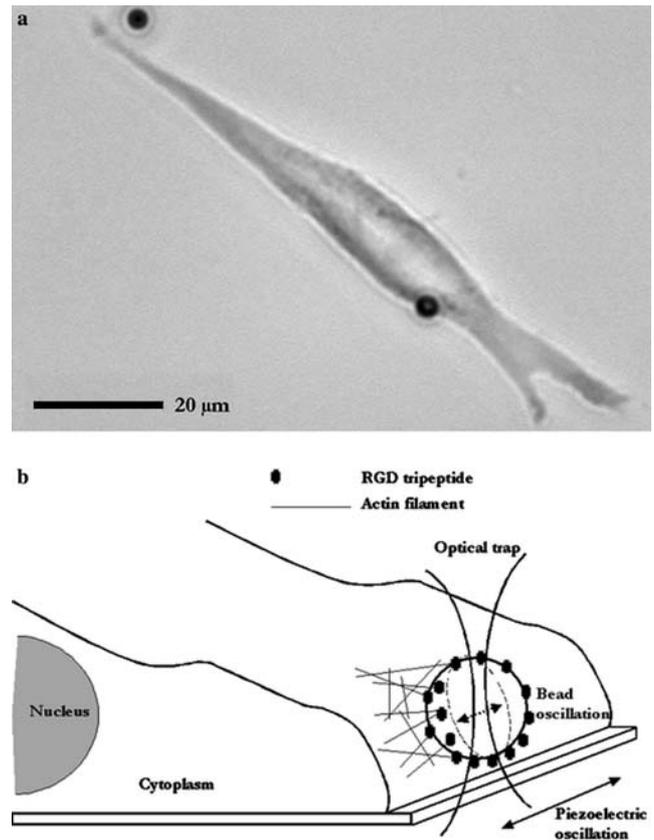


Fig. 1 **a** View of a C2 myoblast grown on a fibronectin-coated coverslip. A 3.47-µm-silica bead, coated with RGD peptide, specifically binds to the transmembrane integrins and thus can be used as a handle to apply calibrated forces to the actin network. **b** Principle of the microrheology experiment: the piezoelectric stage makes the chamber oscillate at frequency f , while the bead is trapped in the optical tweezer. The bead position x_b and the stage position x_c are recorded with a fast camera. The viscoelastic modulus $G(f)$ is deduced from the complex ratio of the force exerted by the trap $F(x_b)$ over the cell deformation $x_c - x_b$

The experiments were performed with a dynamic optical tweezers set-up. The set-up used for optical trapping has been described in detail elsewhere (Lenormand et al. 2001), and the principle is schematically represented in Fig. 1b. Briefly, the electric-field gradient created by an infrared laser beam ($P_{\text{max}} = 600$ mW) strongly focused through the oil immersion objective of the microscope ($\times 100$, $\text{NA} = 1.25$) generates a trapping force on a dielectric micrometric particle, for instance a silica or a latex microbead. In the absence of any external force, the bead is at equilibrium at the trap centre. The trapping force depends on the bead-trap distance Δx , on the laser beam total power, and also on the size and shape of the trapped object. Its precise characterisation requires an independent calibration. A widely used calibration method consists in trapping a free bead and submitting it to a counterflow of known velocity v . At the new equilibrium position Δx , the trapping force $F(\Delta x)$ equilibrates the viscous drag force, given by the Stokes formula $F = 6\pi\eta Rv$, R denoting the

particle radius and η the viscosity of the surrounding liquid.

For a cell, the force-deformation relationship is obtained by applying to the experimental chamber a sinusoidal displacement x_c at frequency f , and simultaneously trapping a bead bound to the cell membrane in the optical trap at a fixed position. At any time, the force exerted on the bead is related to the bead-trap distance $\Delta x = x_b$, while the cellular deformation is measured by the relative displacement $x_c - x_b$ between the chamber and the bead. Lateral bead motion x_b and chamber motion x_c are detected by using a fast camera (Kodak SR500). A Labview program was written to synchronously generate a sequence of successive sinusoidal trains at different frequencies, which control the piezoelectric ceramic motion, and a sequence of pulses, which trigger the image acquisition. This ensures that the phase shift between the applied force and the measured deformation is accurately determined. Typically, the amplitude of the stage motion is $1.55 \mu\text{m}$, its frequency f is swept from 0.05 to 41.5 Hz, and about 5–20 images are recorded during each period. The images, sampled with a 16 bits video-acquisition card (IMAQ PCI/PXI-1407, exposure time 2 ms), were analysed using a pattern-matching algorithm (Imaq vision Builder, Texas Instrument NI, USA) in which subpixel arithmetic allows a spatial resolution of 20 nm. To avoid a possible actin meshwork remodelling at the bead periphery on a large time scale, or a slow drift of the bead on the cell surface, the measurements' total duration on the same single cell never exceeds 2.5 min.

To analyse the optical tweezers' cytometry data, we need a mechanical model. We consider the spherical bead as a probe of the viscoelastic properties of the actin cytoskeleton. The intracellular medium is assumed to be semi-infinite, incompressible, and characterised in the zero frequency limit either by its Young elastic modulus E (purely elastic solid case) or its viscosity η (purely viscous fluid case). As shown in a previous paper (Laurent et al. 2002), we have established, in the small deformation regime, the linear relationships between the relative bead-cell displacement $x = x_c - x_b$ and the restoring elastic force F exerted by the stressed medium, for different geometric configurations. In this model, we took into account the angle of immersion θ ($0 < \theta < 180^\circ$) of the bead into the cell (this angle can be measured for each cell by videomicroscopy). In current experimental situations, it lies between 20° and 50° . We have shown that the relation between x and F can be written as either $F = 2\pi RE h(\theta) x$ (purely elastic medium) or $F = 6\pi R\eta h'(\theta) dx/dt$ (purely newtonian viscous liquid). The two functions $h(\theta)$ and $h'(\theta)$ are geometric factors depending on the angle θ of immersion of the bead into the cell. For instance, when the force F is applied tangentially to the cell membrane, we have calculated that $h(\theta) = [9/(4 \sin\theta) + 3 \cos\theta / (2 \sin^3\theta)]^{-1}$. Here, we generalise the above description for a complex viscoelastic medium as follows: assuming that the bead is submitted to an oscillating force $F = F_0 \exp(2i\pi ft)$ at frequency f , the displacement induced

may be written as $x = x_0 \exp(2i\pi ft)$, and the static relationship $F = 2\pi RE h(\theta) x$ is generalised into $F_0 = 2\pi R G(f) h(\theta) x_0$. Here, $G(f) = G'(f) + i G''(f)$ represents the frequency-dependant complex elastic modulus, split into its real part G' (storage modulus) and G'' (loss modulus). G' and G'' are, respectively, the in-phase and out-of-phase answers to an applied specific stress of amplitude unity.

In a typical run, we measure for each single cell the amplitude of the oscillating force applied to the cell's actin cytoskeleton via the trapped bead, and the induced cell deformation, and also their relative phase shift. From this, we deduce the complex elastic modulus $G(f)$ for each frequency of the sequence.

Results

Control C2 cells in culture

We have plotted for each individual cell both the elastic modulus $G'(f)$ and the loss modulus $G''(f)$ as a function of frequency f , in the range 0.05–50 Hz. An example of such a plot on logarithmic scale is shown in the inset of Fig. 2. For this cell, G' and G'' behave as power laws of the frequency, over three decades, with respective exponents $\alpha = 0.29$ and $\beta = 0.33$. This power-law behaviour is found to be valid for each individual cell; the exponents α and β show slight variations from one cell to the other, but they remain in the following ranges:

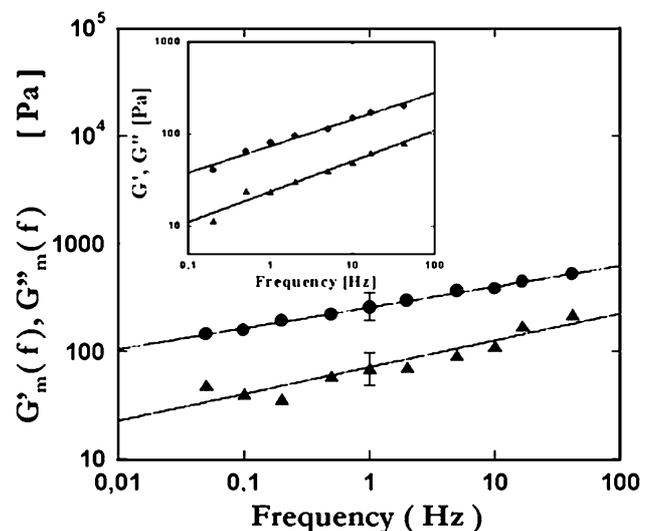


Fig. 2 Plots of the elastic modulus G' (circles) and loss modulus G'' (triangles) of the cytoskeletal network versus frequency f for unperturbed C2 cells. The inset reports the values of G' and G'' measured for a single typical cell. The main plot represents the geometrical averages G'_m and G''_m ($n = 21$ cells). The best power-law fits $G'_m \propto f^\alpha$ and $G''_m \propto f^\beta$ are also drawn. One finds $\alpha = 0.29$ and $\beta = 0.33$ for the single cell, $\alpha_m = 0.19$ and $\beta_m = 0.25$ for the average curves. This shows that $G'(f)$ and $G''(f)$ are accurately represented by power laws, with $\alpha \approx \beta$, and that the dissipation mechanisms in a single cell involve a continuous distribution of relaxation times

$0.1 < \alpha < 0.4$ and $0.1 < \beta < 0.5$. Their average values over 21 cells are $\langle \alpha \rangle = 0.20 \pm 0.02$ and $\langle \beta \rangle = 0.29 \pm 0.04$. For each cell, the exponents α and β generally remain close together, although most of the time β is found slightly larger than α : on average, $\langle \beta - \alpha \rangle = 0.09 \pm 0.03$. The main graph in Fig. 2 represents the geometrical averages $G'_m(f) = [\prod G'_i(f)]^{1/21}$ and $G''_m(f) = [\prod G''_i(f)]^{1/21}$ over the same 21 cells, plotted versus frequency. G'_m and G''_m also exhibit a power law versus frequency, with respective exponents $\alpha_m = 0.19$ and $\beta_m = 0.25$. The magnitudes of G'_m and G''_m may be characterised by their geometrical averages and standard errors at $f = 1$ Hz: $G'_m(1 \text{ Hz}) = 260 \pm 80$ Pa and $G''_m(1 \text{ Hz}) = 70 \pm 25$ Pa.

Such a power-law behaviour is not unusual. In a magnetic twisting experiment, Fabry et al. (Fabry et al. 2001) have already observed that the values of G' and G'' , averaged over a large number of cells, vary like f^α , the exponent $\alpha \approx 0.15$ – 0.30 being the same for G' and G'' in a first approximation. In another experiment (Lau et al. 2003), the time-fluctuation spectrum of endogenous tracers embedded in the cytoplasm and the two-point spatial correlation spectrum were also found to behave as power laws. In the same way, creep experiments on single cells (Desprat et al. 2005) exhibit a power-law creep response, with similar exponents $\alpha \approx 0.15$ – 0.30 . The significantly new result brought by our experiment—and by the creep experiment—is that this behaviour is clearly stated not only for an ensemble average, but also for individual cells. Indeed, due to the dispersion from one cell to the other, an ensemble average generally smooths individual features, and the average response may not reflect the different individual responses. This does not occur in a cell-by-cell analysis. The fact that the mechanical response of each cell is correctly represented by power laws can be directly related to the dissipation mechanisms in the cytoskeleton. In a discrete elements model associating springs and dashpots, the mechanical response of a cell would reduce to a finite sum of exponential curves and there would exist a finite number of relaxation times in the system (Thoumine and Ott 1997; Bausch et al. 1999). In contrast, a wide range of dissipation mechanisms, and thus a continuous distribution of relaxation time, lead to other types of responses, like power laws. This is not surprising because in a living cell various mechanisms contribute to cytoskeleton remodelling: dynamical polymerisation of actin and treadmilling, filament cross-linking and actomyosin complex activity, each of them corresponding to specific spatial and temporal scales. Of course, modelling the mechanical response by enough discrete elements (of the order of six) may fit the single cell data as well. Besides the fact that this requires more parameters than a simple power-law fit, a small number of relaxation times is hardly compatible with the above picture, which involves a wide range of dissipation phenomena. Thus, the present data, together with other mechanical characterisations (Fabry et al. 2003; Lau et al. 2003; Puig-de-Morales et al. 2004; Lenormand et al. 2004; Desprat et al. 2005), rule out a possible

modelling in terms of discrete elements, and demonstrate that the dissipation mechanisms involve a continuous range of relaxation times.

C2 cells with blebbistatin added

The microrheological response of cells treated with blebbistatin is significantly different from that of unperturbed cells. The inset of Fig. 3 shows a typical plot of $G'(f)$ and $G''(f)$ for an individual cell with blebbistatin added. The elastic modulus $G'(f)$ still behaves like f^α , but the exponent $\alpha' = 0.11$ is smaller than the exponent $\alpha \approx 0.20$ measured for unperturbed cells. On the other hand, the loss modulus G'' remains almost constant in the frequency range 0.1–10 Hz, and rapidly increases with f when $f > 10$ Hz. The same behaviour is observed in a sample of 15 C2 cells. The average value of α' over these cells is $\langle \alpha' \rangle = 0.07 \pm 0.02$, and one finds the same two regimes for $G''(f)$. This single cell behaviour identically reproduces the geometrical averages $G'_m(f)$ of $G'(f)$ and $G''_m(f)$ of $G''(f)$, calculated over 15 cells (see Fig. 3). $G'_m(f)$ is accurately fitted by a power law $f^{\alpha'_m}$, with $\alpha'_m = 0.06$, significantly smaller than the exponent $\alpha_m = 0.19$ measured for unperturbed cells. Similarly, $G''_m(f)$ remains constant in the range 0.01–10 Hz, before rapidly increasing above 10 Hz. The magnitudes of G'_m and G''_m at $f = 1$ Hz are $G'_m(1 \text{ Hz}) = 57 \pm 22$ Pa and $G''_m(1 \text{ Hz}) = 13 \pm 6$ Pa, respec-

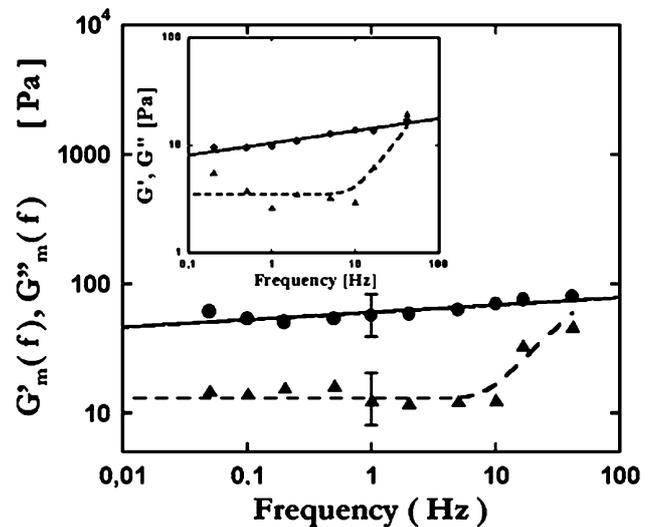


Fig. 3 Same plots of G' and G'' as in Fig. 2, for cells treated with blebbistatin, which inhibits the activity of the actomyosin complex. Both for an individual cell (*inset*) and for the ensemble average (main plot, $n = 15$ cells), the exponent of the fit $G' \propto f^{\alpha'}$ is reduced, respectively, to $\alpha' = 0.11$ and $\alpha'_m = 0.06$. The loss modulus G'' is roughly independent of the frequency in the range 0.05–10 Hz, and rapidly increases above 10 Hz (*dashed lines* are guides for the eye). The magnitudes of G' and G'' at $f = 1$ Hz are about five times lower than for control cells. This indicates that inhibiting the myosin motor activity by blebbistatin makes the network less dissipative, and simultaneously less rigid

tively. Both of these values are about five times lower than those measured for unperturbed cells. These sharp differences between control cells and cells treated with blebbistatin are a clear signature of actomyosin complex activity. A detailed interpretation of these results is proposed in the following discussion.

Discussion

Let us first comment on the power-law microrheological response of C2 cells in control experiments. A behaviour where both $G'(f)$ and $G''(f)$ vary like f^α is rather common in complex viscoelastic media, like micellar and polymer solutions, or colloidal suspensions, and reflects the wide distribution of relaxation times in these non-active systems. In this case, the exponent α represents the degree of fluidity of the system: α varies from 0 for a pure elastic solid to 1 for a pure viscous fluid. In a very crude picture, which does not take into account the biological activity, the intra-cellular medium can be compared to such a complex medium. This description seems adequate in the case of dilute in vitro actin solutions (Amblard et al. 1996; Palmer et al. 1999), where one measured $\alpha = 0.75$. Of course, the dynamics inside a living cell must include the out-of-equilibrium character of the biochemical activity. In a more elaborated approach (Fabry et al. 2001), the cytoplasm was compared to a “soft glassy material”, a class of disordered out-of-equilibrium systems, including foams, slurries, and granular materials, in which the dissipation is controlled by active, non-viscous mechanisms (Sollich et al. 1997; Sollich 1998). Assuming that the distribution of relaxation times in such a system is a power law, one predicts that both $G'(f)$ and $G''(f)$ behave like f^α , which is compatible with experimental observations. However, this model is based on very general assumptions, and the link to the microscopic mechanisms regulating the cytoskeleton dynamics is not explicit. Moreover, such a general model cannot predict small deviations from the standard f^α law, like the fact that we measure two slightly different exponents for G' and G'' . More phenomenological models exist, based on a linear response theory of an active gel, and which take into account the polymerisation/depolymerisation of actin filaments, and the activity of molecular motors (Kruse et al. 2004). After having included the present data, such models are expected to be more appropriate to accurately describe the mechanical response of the cytoskeleton’s active meshwork.

Now we turn to the comparison between control cells and blebbistatin-treated cells. Two main features appear: (1) the mechanical response of treated cells is closer to a pure elastic solid, as the exponents of $G'(f)$ and $G''(f)$ decrease when blebbistatin is added (from 0.19 to 0.06 for G' and from 0.25 to about 0 for G'' , at least in the domain $f < 10$ Hz); (2) control cells are more rigid than treated ones, as both the magnitudes of G' and G'' are about five times larger in the first case. This can be

understood by analysing the mechanism by which blebbistatin inhibits the actomyosin activity. Blebbistatin was shown to act on myosin II by inhibiting adenosine triphosphatase activity (Straight et al. 2003). Thus, with blebbistatin, ATP is less easily hydrolysed, and remains bound to the myosin head for a longer time than in control conditions. The effect of blebbistatin is not only to decrease the motor activity of the myosin, but furthermore to keep the myosin heads detached from the actin filament for a longer time (Kovacs et al. 2004). Then, one understands that blebbistatin makes the actin meshwork more elastic by preventing the filaments gliding and inhibiting this active dissipation process, and simultaneously less rigid by decreasing the average number of cross-links in the meshwork. This is in quite good agreement with our observations. It is interesting to note that our results are also consistent with the experiments concerning in vitro actin gels with myosin added (Le Goff et al. 2002). In this case, when ATP is depleted, the actomyosin complex passes from the active state to the rigor state, and the exponent α of the power law $|G| \propto f^\alpha$ decreases. At the same time, one observes an increase in $|G|$, because ATP depletion causes myosin to remain bound to the actin filaments, increasing the average number of cross-links and thus the rigidity of the meshwork.

Finally, let us briefly comment on the behaviour of G'' above 10 Hz. The rapid increase in G'' with frequency f suggests that the dissipation in this range may be dominated by a viscous mechanism. Adjusting the G'' data above 10 Hz with a viscous damping $G''(f) = 6\pi\eta f$ leads to $\eta \approx 0.07$ Pa.s, a value comparable to the measurements of the intrinsic viscosity of the cytosol (Yamada et al. 2000; Fabry et al. 2001; Wilhelm et al. 2003).

A comparison between the mechanical behaviours of the actin meshwork reported in Figs. 2 and 3 suggests that most of the active dissipative mechanisms are inhibited when blebbistatin is added. Indeed, the elastic modulus G' becomes almost frequency independent, while the loss modulus G'' decreases, and meets a pure viscous fluid behaviour at high frequency. This suggests that, in a living cell, the activity of the actomyosin complex is the main source of active dissipation, at least in the frequency range (0.01–50 Hz) investigated. It is largely responsible for the power-law behaviour measured for both $G'(f)$ and $G''(f)$ in control cells. Also, modelling the mechanical contribution of this molecular mechanism could enlighten the comparison of the cytoskeletal meshwork with a “soft glassy material”, because this model is appropriate to describe out-of-equilibrium systems, in which the stress relaxation is controlled by an active dissipative process.

To conclude, we would like to emphasise that our optical tweezer set-up allows one to determine the microrheological response of the cytoskeletal meshwork in a single cell. For the first time, we discovered that the response of a single myoblast is identical to the ensemble average over several cells. In control experiments, both the elastic modulus $G'(f)$ and the loss modulus $G''(f)$

behave as power laws of the frequency f , in the range 0.05–50 Hz. The two exponents are close to 0.25; however, slightly larger for G'' . Adding blebbistatin, which inhibits the myosin activity, makes the meshwork simultaneously more elastic and less rigid. Our interpretation is that the filament gliding generated by the myosin activity is the main dissipation mechanism in this frequency range. The experimental data, both for control cells and cells treated with blebbistatin, are consistent with the expected behaviour of a soft glassy material, all the more as we have identified the principal mechanism of active dissipation in this out-of-equilibrium system. We are currently expecting quantitative predictions from more phenomenological models, which take into account the detailed mechanisms of the cytoskeletal dynamics, and which should corroborate this general description.

Acknowledgments We are grateful to Cécile Sykes and Ewa Paluch for sharing the blebbistatin protocol, and Atef Asnacios, Nicolas Desprat and Jean-François Joanny for helpful discussions. This work was partly supported by grants from the French Ministère de la Recherche (ACI Jeune chercheur), the Université Paris 7 (Bonus Qualité Recherche) and the Centre National de la Recherche Scientifique (bourse de docteur-ingénieur).

References

- Alcaraz J, Buscemi L, Grabulosa M, Trepas X, Fabry B, Farré R, Navajas D (2003) Microrheology of human lung epithelial cells measured by atomic force microscopy. *Biophys J* 84:2071–2079
- Amblard F, Maggs AC, Yurke B, Pargellis AN, Leibler S (1996) Subdiffusion and anomalous local viscoelasticity in actin networks. *Phys Rev Lett* 77:4470–4473; Erratum *Phys Rev Lett* 81:1136
- An SS, Laudadio RE, Lai J, Rogers RA, Fredberg JJ (2002) Stiffness changes in cultured airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C792–C801
- Barbee KA, Davies PF, Lal R (1994) Shear stress-induced reorganization of the surface topography of living endothelial cells imaged by atomic force microscopy. *Circ Res* 74:163–171
- Bausch AR, Möller W, Sackmann E (1999) Measurement of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers. *Biophys J* 76:573–579
- Caille N, Thoumine O, Tardy Y, Meister J-J (2002) Contribution of the nucleus to the mechanical properties of endothelial cells. *J Biomech* 35:177–187
- Caspi A, Granek R, Elbaum M (2002) Diffusion and directed motion in cellular transport. *Phys Rev E* 66:011916-1; 011916-12
- Dewey CF Jr, Bussolari SR, Gimbrone MA Jr, Davies PF (1981) The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng* 103:177–188
- Desprat N, Richert J, Siméon J, Asnacios A (2005) Creep function of a single living cell. *Biophys J* Vol 88, March 2005 (In press)
- Fabry B, Maksym GN, Butler JP, Glogauer M, Navajas D, Fredberg JJ (2001) Scaling the microrheology of living cells. *Phys Rev Lett* 87:148102-1;148102-4
- Fabry B, Maksym GN, Butler JP, Glogauer M, Navajas D, Taback NA, Millet EJ, Fredberg JJ (2003) Time scale and other invariants of integrative mechanical behaviour in living cells. *Phys Rev E* 68(041914):1–18
- Guck J, Ananthakrishnan R, Mahmood H, Moon TJ, Cunningham C C, Käs J (2001) The optical stretcher: a novel laser tool to micromanipulate cells. *Biophys J* 81:767–784
- Janmey PA (1998) The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev* 78:763–780
- Janmey PA, Euteneuer U, Traub P, Schliwa M (1991) Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *J Cell Biol* 113:155–160
- Kovacs M, Toth J, Hetényi C, Malnasi-Csizmadia A, Sellers JR (2004) Mechanism of blebbistatin inhibition by myosin II. *J Biol Chem* 279:35557–35563
- Kruse K, Joanny JF, Jülicher F, Prost J, Sekimoto K (2004) Asters, vortices and rotating spirals in active gels of polar filaments. *Phys Rev Lett* 92:078101-1; 078101-4
- Lau AWC, Hoffmann BD, Davies A, Crocker JC, Lubensky TC (2003) Microrheology, stress fluctuations, and active behaviour of living cells. *Phys Rev Lett* 91(198101):1–4
- Laurent V, Hénon S, Planus E, Fodil R, Balland M, Isabey D, Gallet F (2002) Assessment of mechanical properties of adherent living cells by bead micromanipulation: comparison of magnetic twisting cytometry vs optical tweezers. *J Biomech Eng* 124:408–421
- Le Goff L, Amblard F, Furst EM (2002) Motor-driven dynamics in actin-myosin networks. *Phys Rev Lett* 88:018101-1; 018101-4
- Lenormand G, Hénon S, Richert A, Siméon J, Gallet F (2001) Direct measurement of the area expansion and shear moduli of the human red blood cell membrane skeleton. *Biophys J* 81:43–58
- Lenormand G, Millet E, Fabry B, Butler JP, Fredberg JJ (2004) Linearity and time-scale invariance of the creep function in living cells. *J R Soc Lond Interface* 1:91–97
- Maksym GN, Fabry B, Butler JP, Navajas D, Tschumberlin D J, Laporte JD, Fredberg JJ (2000) Mechanical properties of cultured human airway smooth muscle cells from 0.05 to 0.4 Hz. *J Appl Physiol* 89:1619–1632
- Palmer A, Mason TG, Xu J, Kuo SC, Wirtz D (1999) Diffusing wave spectroscopy microrheology of actin filament networks. *Biophys J* 76:1063–1071
- Petersen NO, McConnaughey WB, Elson EL (1982) Dependence of locally measured cellular deformability on position on the cell, temperature and cytochalasin D. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:5327–5331
- Puig-de-Morales M, Millet EJ, Fabry B, Navajas D, Wang N, Butler JP, Fredberg JJ (2004) Cytoskeletal mechanics in adherent human airway smooth muscle cells: probe specificity and scaling of protein-protein dynamics. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C643–C654
- Rotsch C, Braet F, Wisse E, Radmacher M (1997) AFM imaging and elasticity measurements on living rat liver macrophages. *Cell Biol Int* 21:685–696
- Sato M, Ohshima N, Nerem RM (1996) Viscoelastic properties of cultured porcine aortic endothelial cells exposed to shear stress. *J Biomech* 29:461–467
- Sato M, Nagayama K, Kataoka N, Sasaki M, Hane K (2000) Local mechanical properties measured by atomic force microscopy for cultured bovine endothelial cells exposed to shear stress. *J Biomech* 33:127–135
- Sollich P (1998) Rheological constitutive equation for a model of soft glassy materials. *Phys Rev E* 58:738–759
- Sollich P, Lequeux F, Hébraud P, Cates ME (1997) Rheology of soft glassy materials. *Phys Rev Lett* 78:2020–2023
- Straight AF, Cheung A, Limouze J, Chen I, Westwood NJ, Sellers JR, Mitchison TJ (2003) Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor. *Science* 299:1743–1747
- Thoumine O, Ott A (1997) Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation. *J Cell Sci* 110:2109–2116
- Tseng Y, Kole TP, Wirtz D (2002) Micromechanical mapping of live cells by multiple-particle-tracking microrheology. *Biophys J* 83:3162–3176
- Wilhelm C, Gazeau F, Bacri J-C (2003) Rotational magnetic endosome microrheology: viscoelastic architecture inside living cells. *Phys Rev E* 67:061908-1;061908-12
- Yamada S, Wirtz D, Kuo SC (2000) Mechanics of living cells measured by laser tracking microrheology. *Biophys J* 78:1736–1747

Résumé

L'objectif de cette thèse est de caractériser l'influence de facteurs protéiques sur la dynamique du cytosquelette cellulaire au moyen d'outils de micromanipulation contrôlés. Nous avons déterminé la réponse microrhéologique du réseau d'actine pour des cellules uniques. Nous avons appliqué grâce à un système de pinces optiques des forces statiques et oscillantes à des microbilles de verres attachées de manière spécifique au réseau d'actine de divers types cellulaires. Dans le cas statique nous avons mesuré des modules élastiques dans la gamme $29 < E < 260$ Pa. Dans le cas dynamique nous avons mesuré l'amplitude et le déphasage relatif de la déformation cellulaire induite. Pour une cellule non perturbée, nous avons montré que module élastique G' et module de perte G'' suivent des lois puissances de la fréquence f^α et f^β dans la gamme $0.01 < f < 50$ Hz, α et β étant dans la gamme 0.15-0.30. Ceci démontre que les mécanismes dissipatifs intra-cellulaires suivent une distribution large et continue de temps de relaxation. Après avoir ajouté de la blebbistatine, un inhibiteur de l'activité des myosines II, l'exposant de G' décroît jusqu'à environ 0.10, et G'' devient constant pour $0.01 < f < 10$ Hz. Le réseau d'actine apparaît alors moins rigide et moins dissipatif que dans les expériences de contrôles. Ceci est en accord avec l'inhibition de l'activité ATPasique et la réduction de motilité des myosines II sur les filaments d'actine. Ce travail a donc pour but de rapprocher modèles structuraux et comportementaux de la mécanique cellulaire par des mesures microrhéologiques sur cellules adhérentes en conditions biochimiques perturbées.

Abstract

The aim of this manuscript is to determine the influence of proteic factors on cytoskeleton dynamics using a micromanipulation tool. We have determined the microrheological response of the actin network for individual cells. We applied with an optical tweezer oscillating forces to a micrometric bead specifically bound to the actin network of C2 myoblasts, and measured the amplitude and phase shift of the induced cell deformation. For a non-perturbated single cell, we have shown that the elastic and loss moduli G' and G'' behave as power laws f^α et f^β of the frequency f ($0.01 < f < 50$ Hz), α and β being in the range 0.15 - 0.30. This demonstrates that the dissipation mechanisms in a single cell involve a broad and continuous distribution of relaxation times. After adding blebbistatin, an inhibitor of myosin II activity, the exponent of G' decreases to about 0.10, and G'' becomes roughly constant for $0.01 < f < 10$ Hz. The actin network appears less rigid and less dissipative than in the control experiment. This is consistent with an inhibition of ATPase and reduction of the gliding mobility of myosin II on actin filaments. In this frequency range, the actomyosin activity appears as the principal mechanism allowing the cell to adapt to an external mechanical stress. The goal of this work is to put in agreement both structural and behaviour cell mechanical models by the mean of microrheological measurements on adherent living cells in normal and disturbed conditions.