

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Paris Est

**Propriétés mécaniques et fonctionnelles des cellules
épithéliales respiratoires exposées à une toxine
bactérienne : l'adénylate cyclase**

Présentée publiquement par

Christelle ANGELY

le 29 Juin 2018

devant le jury composé de:

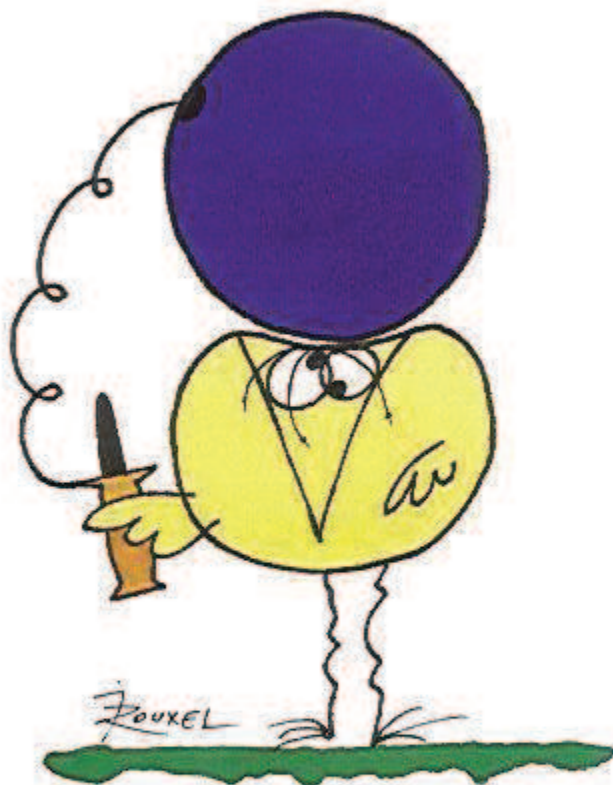
René-Marc Mège	Directeur de Recherche – Université Paris Diderot	Rapporteur
Julien Husson	Maitre de Conférences – École Polytechnique	Rapporteur
Catherine Picart	Professeur – Université de Grenoble	Examineur
Arthur Brouillet	Maitre de Conférences – Université Paris Est	Examineur
Daniel Isabey	Directeur de Recherche – Université Paris Est	Directeur de thèse
Emmanuelle Planus	Maitre de Conférences – Université de Grenoble	Co-directrice de thèse
Alexandre Chenal	Directeur de Recherche – Institut Pasteur Paris	Membre invité

Institut Mondor de Recherche Biomédicale

Inserm UPEC, UMR955, Équipe 13- CNRS ERL 7000,

Faculté de Médecine, Créteil, France

Les devises Shadok



EN ESSAYANT CONTINUUELLEMENT
ON FINIT PAR RÉUSSIR. DONC:
PLUS ÇA RATE, PLUS ON A
DE CHANCES QUE ÇA MARCHE.

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier **Madame et Messieurs les membres de mon jury** de me faire l'honneur de leur présence lors de ma soutenance, de faire une lecture attentive et avisée de mon travail et ainsi que pour toutes les remarques qu'ils me feront afin d'améliorer mon travail.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, **Daniel Isabey**. Merci pour la confiance que vous avez eue en moi ainsi que pour votre accompagnement enrichissant au-delà de mes espérances. Le climat à la fois professionnel et amical qui s'est établi entre nous a grandement participé à mon épanouissement au sein de l'équipe, a à chaque instant renforcé ma conviction d'avoir fait le bon choix et a encore un peu plus ancré mon intérêt pour la recherche. Je souhaite sincèrement que nos chemins se recroisent encore de nombreuses fois.

Je souhaite également remercier ma co-directrice de thèse, **Emmanuelle Planus**, qui m'a formée à certaines techniques de biologie qui ont considérablement améliorées mon travail.

Un grand merci à **Daniel Ladant** et **Alexandre Chenal**, nos chers collaborateurs de l'Institut Pasteur sans qui cette étude n'aurait pas été possible. Merci pour votre bienveillance envers moi et tous vos conseils avisés. Alexandre je salue toutes ces convictions que tu défends avec ardeur et que je partage entièrement.

Ce climat où l'on fait bon vivre (et que d'autres équipe nous envie) n'aurait pas été ainsi sans la présence des membres de l'équipe (officiels ou non) qui me sont chers. À **Bruno Louis**, à **Marcel Filoche**, à **Gabriel Pelle** et bien sur à **Gilbert Desmarais** pour sa légendaire bonne humeur. Je vous remercie pour tous vos conseils, votre aide et votre grande sympathie.

Je remercie les médecins de l'équipe **Estelle Escudier**, **Emilie Béquignon**, **André Coste** et **Jean François Papon**, pour votre disponibilité, vos conseils et votre soutien si précieux.

À **Patricia Zadigue**, merci de m'avoir formée à la culture cellulaire dès mon arrivée à l'IMRB. Merci pour ta grande gentillesse, ta disponibilité et ton soutien tout au long de ces années.

À **Mathieu Bottier**, merci de m'avoir formée en partie à la culture des CENH et à la vidéomicroscopie.

Un grand merci à **Minh Nguyen** qui a pris le temps de me transmettre son savoir et son expertise de la microscopie à force atomique. Cet outil fait la force de mon travail. Merci infiniment.

À mes demoiselles d'honneur (c'est pour bientôt... !) **Sofia André Dias** et **Sarah Bourass** qui ont apporté la gaité et la bonne humeur dans le bureau. Un sincère merci, vous m'avez fait passer des moments inoubliables, sans oublier nos fous rires juste mémorables !!

To **Ali Kazemi**, I don't have enough word to thank you. Thanks to you, I really improve the quality of my speech in english. For all talking about iranian food and iranian culture. Now I want absolutely to eat the delicious traditional meat of your city!! You became a very good friend.

Merci à **David Mangin**, pour toutes ces balades postprandiales entre la poste, le CHIC et la fac. J'ai passé de bons moments avec toi.

Remerciements

À **Justine Bécaud**, la fille la plus impressionnante que je connaisse. Je te connais depuis si peu de temps et pourtant j'ai l'impression de te connaître depuis toujours. On a partagé tant de choses en si peu de temps. Tu as déjà changé considérablement ma vie (entre C, le TBC (rdv dans 12 semaines) et S qui s'est imposé à moi...) et pour ça, je n'aurais jamais assez d'une seule vie pour te remercier. J'espère sincèrement qu'on gardera contact en dépit de nos avenir différents.

Je n'oublierai pas de remercier les membres de l'équipe 8 (**Amal, Marielle, Shariq, Nora et Elisabeth**) que j'ai si souvent sollicités dans des situations de grand désespoir : plus de produit en plein milieu d'une manip, problème de pompe d'aspiration ou de hotte. J'ai fait plus que de partager un couloir avec vous. Merci pour votre sympathie.

À **Thomas Zaoui** et à l'**ONCF**, je n'oublierai jamais tout ce que vous avez fait pour moi. Merci Thomas pour ton humour, pour ton soutien, et d'avoir rendu ces quelques années beaucoup plus agréables.

Je voudrai remercier la **Fondation pour la Recherche Médicale** qui a permis de financer mes 3 années de thèse.

Vient le moment de remercier les personnes les plus importantes au monde pour moi...

À **ma mère**, ma plus grande supportrice... je n'ai pas assez de mots pour te dire ce que je ressens pour toi, alors je te dirai juste que ma plus grande réussite c'est de voir dans tes yeux à quel point tu es fière de moi.

À **mon père**, je donnerai tout pour pouvoir partager ce moment avec toi. Tu me manques tellement mais je sais au fond que tu es avec moi tous les jours.

Maman, Papa, je vous aime.

À **Ulo**, tu nous as fait sacrément peur ! Mais tu t'es si bien remis qu'il faut que je découvre ton secret et que j'en face un Nature !

Enfin, mes derniers mots vont à **Ciprian, mon amour** : viitorului meu soț, tatălui copiilor mei, mi-ai făcut un vis. Vă mulțumesc pentru sprijinirea dispozițiilor mele de zi cu zi. Te iubesc din toată inima... (Și în această seară...te fut ?!)

1. INTRODUCTION	1
2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
2.1. BORDETELLA PERTUSSIS, AGENT INFECTIEUX DE L'APPAREIL RESPIRATOIRE	5
2.1.1. CARACTERISTIQUES DE <i>BORDETELLA PERTUSSIS</i>	5
2.1.2. POUVOIR PATHOGENE DE <i>BORDETELLA PERTUSSIS</i>	7
2.1.2.1. Adhésines	9
2.1.2.1.1. L'hémagglutinine filamenteuse (FHA)	9
2.1.2.1.2. Les fimbriae (FIM)	9
2.1.2.1.3. La pertactine (P.69 ou PRN)	10
2.1.2.2. Toxines	10
2.1.2.2.1. La toxine cytotrachéale (TCT)	10
2.1.2.2.2. La toxine pertussique (PT)	10
2.1.2.2.3. L'adénylate cyclase (CyaA)	11
2.1.3. CYAA : UNE TOXINE-MODELE DE L'ATTEINTE DE L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE	13
2.2. STRUCTURE ET FONCTION DE L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE	15
2.2.1. COMPOSANTS DE L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE	15
2.2.1.1. Au niveau des voies aériennes supérieures et bronchiques	15
2.2.1.1.1. Les cellules ciliées	15
2.2.1.1.2. Les cellules caliciformes	15
2.2.1.1.3. Les cellules basales	16
2.2.1.1.4. Les cellules neuroendocrines	16
2.2.1.2. Au niveau des voies aériennes inférieures	17
2.2.1.2.1. L'unité principale du poumon profond : l'alvéole pulmonaire	17
2.2.1.2.2. Les cellules de l'épithélium alvéolaire : les pneumocytes I et II (PI et PII)	17
2.2.1.2.3. Les autres éléments	18
2.2.1.2.3.1. Les cellules endothéliales	18
2.2.1.2.3.2. Le tissu interstitiel	18
2.2.1.2.3.3. Les cellules mobiles	18
2.2.2. FONCTIONS DE L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE	19
2.2.2.1. Fonctions de l'épithélium respiratoire des voies supérieures	19
2.2.2.1.1. Fonction d'humidification et réchauffement de l'air	19
2.2.2.1.2. Fonction de purification de l'air	20
2.2.2.2. Fonctions de l'épithélium respiratoire des voies inférieures	21
2.2.2.2.1. Fonction d'échanges gazeux	21
2.2.2.2.2. Fonction de barrière	22
2.2.2.2.3. Fonction de réparation épithéliale	23
2.3. STRUCTURES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE LA CELLULE ADHERENTE DANS SON ENVIRONNEMENT	23
2.3.1. LA MATRICE EXTRACELLULAIRE (MEC)	23
2.3.2. LE CYTOSQUELETTE (CSQ)	25
2.3.2.1. Les microtubules	26

Table des Matières

2.3.2.2.	Les filaments intermédiaires.....	28
2.3.2.3.	Les filaments d'actine	29
2.3.3.	STRUCTURES D'ADHESION INTEGRINE-DEPENDANTES	32
2.3.4.	ROLE DE LA FORCE DANS LA STABILISATION DES STRUCTURES D'ADHESION	37
2.4.	CONCEPTS MECANOBIOLOGIQUES ESSENTIELS A L'ETUDE DE LA REPONSE CELLULAIRE	40
2.4.1.	LA MECANOTRANSDUCTION	40
2.4.2.	PROPRIETES MECANIQUES DE LA CELLULE ET MECANOTRANSDUCTION	50
2.4.3.	LA MECANOBIOLOGIE EN PHYSIOPATHOLOGIE ET BIOMEDECINE	52
2.5.	OBJECTIFS DE LA THESE.....	54
3.	MATERIELS ET METHODES	57
3.1.	MODELES CELLULAIRES.....	57
3.1.1.	MODELE DE CELLULES EPITHELIALES ALVEOLAIRES HUMAINES (LIGNEE A549).....	57
3.1.2.	MODELE DE CELLULES EPITHELIALES NASALES HUMAINES (CENH PRIMAIRES)	58
3.1.3.	MODELE DE MACROPHAGES	59
3.2.	MODELE D'INVASION A LA TOXINE BACTERIENNE CYAA	60
3.3.	TESTS BIOLOGIQUES	61
3.3.1.	TESTS DE VIABILITE CELLULAIRE	62
3.3.1.1.	Test au MTT	62
3.3.1.2.	Test au bleu de Trypan.....	63
3.3.2.	MESURE DU TAUX D'ADENOSINE MONOPHOSPHATE CYCLIQUE (AMPC)	63
3.3.3.	MODELE DE MIGRATION ET DE REPARATION CELLULAIRES D'UNE BLESSURE.....	64
3.3.4.	MESURE DE LA FREQUENCE DU BATTEMENT CILIAIRE PAR MICROSCOPIE A HAUTE VITESSE	65
3.3.5.	EVALUATION DE LA PERMEABILITE CELLULAIRE PAR MESURE DE LA RESISTANCE ELECTRIQUE TRANS-EPITHELIALE (TEER).....	67
3.3.6.	MARQUAGE DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE ET DES POINTS FOCALUX D'ADHESION	67
3.4.	SONDER LA REPONSE MECANIQUE SUR CELLULES VIVANTES : MESURES EXPERIMENTALES ET OUTILS THEORIQUES	68
3.4.1.	ASPECTS THEORIQUES COMMUNS	70
3.4.1.1.	Analyse de l'adhésion multiple.....	70
3.4.1.2.	Analyse des propriétés microrhéologiques	75
3.4.2.	LA MAGNETOCYTOMETRIE (MTC)	76
3.4.2.1.	Versant expérimental	77
3.4.2.2.	Versant modélisation.....	83
3.4.3.	LA MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE (AFM).....	87
3.4.3.1.	VERSANT EXPERIMENTAL	89
3.4.3.2.	Versant théorique	99
3.5.	TESTS STATISTIQUES	102
4.	RESULTATS ET DISCUSSION	103
4.1.	ÉTUDE PRELIMINAIRE : EVALUATION DE LA TOXICITE DE CYAA ET DE SON ACTIVITE ADENYLATE CYCLASE SUR LES CELLULES EPITHELIALES ALVEOLAIRES	104

Table des Matières

4.1.1.	CHOIX DE LA FORME DE CYAA	104
4.1.2.	CHOIX DES CONCENTRATIONS ET TEMPS D'EXPOSITION OPTIMAUX DE CYAA	106
4.1.3.	MESURE DU TAUX D'AMPC INTRACELLULAIRE APRES UNE EXPOSITION A LA TOXINE	109
4.2.	ROLE DE CYAA SUR CERTAINS PROCESSUS CELLULAIRES EPITHELIAUX	112
4.2.1.	FONCTIONS DE MIGRATION/REPARATION.....	112
4.2.2.	ANALYSE DU BATTEMENT CILIAIRE APRES EXPOSITION A LA TOXINE CYAA.....	118
4.2.3.	PERMEABILITE CELLULAIRE DES CENH EXPOSEES A CYAA.....	121
4.3.	REMODELAGES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DES CELLULES EPITHELIALES ALVEOLAIRES EXPOSEES A CYAA	
	123	
4.3.1.	CYTOSQUELETTE D'ACTINE ET ADHESION CELLULAIRE	123
4.3.2.	REVERSIBILITE PARTIELLE DES EFFETS DE CYAA SUR L'ADHESION.....	126
4.4.	PROPRIETES MECANIQUES ET D'ADHESION DES CELLULES EPITHELIALES ALVEOLAIRES EXPOSEES A CYAA....	128
4.4.1.	MAGNETOCYTOMETRIE	128
4.4.2.	MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE (AFM).....	134
5.	<u>DISCUSSION GENERALE.....</u>	<u>151</u>
5.1.	CONTRIBUTION A LA CONNAISSANCE DES EFFETS PHYSIOPATHOLOGIQUES DE CYAA	151
5.2.	CONTRIBUTION A L'ETUDE DES EFFETS MECANOBIOLOGIQUES INDUITS PAR LA TOXINE CYAA	157
5.3.	MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES MIS EN JEU PAR CYAA	159
5.4.	LES AUTRES CIBLES POTENTIELLES DE CYAA (PERSPECTIVES)	161
6.	<u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</u>	<u>164</u>

Liste des Figures et Tableaux

Figure 1 : Carte génomique de *Bordetella pertussis*

Figure 2 : Les facteurs virulents de *Bordetella pertussis*

Figure 3 : Organisation structurale de la toxine adénylate cyclase de *Bordetella pertussis*.

Figure 4 : Schéma de coupe d'une alvéole montrant les cellules qui la composent et détail de l'anatomie de la membrane alvéolo-capillaire

Figure 5 : Schéma des processus de polymérisation et dépolymérisation des microtubules

Figure 6 : Schéma des processus de polymérisation et dépolymérisation des filaments intermédiaires

Figure 7 : Schéma des processus de polymérisation et dépolymérisation de l'actine

Figure 8 : Schéma de l'organisation du cytosquelette dans une cellule épithéliale

Figure 9 : (A) Schéma simplifié de l'intégrine (vert) liant à la fois les éléments de la MEC et le cytosquelette d'actine (bleu) via des protéines adaptatrices (violet). (B) Association des différentes sous-unités α (rouge) et β (vert) des intégrines et leurs ligands spécifiques (bleu).

Figure 10 : Modèle de recrutement mécano-régulé des protéines de structure et de signalisation au niveau des adhésions focales

Figure 11 : Organisation de l'actine et de l'adhésion à différent stades de maturation des sites d'adhésion

Figure 12 : (A) Modèle d'adhésion initiale avec reconnaissance initiale du ligand, activation puis regroupement (clustering) des intégrines grâce aux complexes PI(4,5)P2 situés sous la membrane plasmique. (B) Différents modes alternatifs d'activation des intégrines et du clustering notamment en présence de manganèse

Figure 13 : Représentation schématique des contacts d'adhésion à la matrice extracellulaire communément trouvés dans la cellule adhérente sur un substrat rigide en 2 dimensions

Figure 14 : Corrélation entre le flux rétrograde, la taille des adhésions et la force de traction durant l'assemblage des sites d'adhésion

Figure 15 : Modèle de tenségrité cellulaire

Figure 16 : Mise en évidence sur cellules vivantes de la proportionnalité entre rigidité cellulaire et tension interne

Figure 17 : Connexions moléculaires de la matrice au noyau

Figure 18 : La tenségrité, le mécanisme physique de la mécanotransduction

Liste des Figures et Tableaux

Figure 19 : Puits double chambre permettant de mettre les cellules épithéliales nasales humaines en interface air-liquide

Figure 20 : Réaction enzymatique du MTT dans les cellules vivantes

Figure 21 : Principe de kymographie

Figure 22 : Modèle multi-échelle comprenant les paramètres d'adhésion et les propriétés microrhéologiques pour analyser sur un même signal (i) la réponse de l'interface cellule-matrice et (ii) la réponse du cytosquelette après application d'un couple magnétique sur la bille

Figure 23 : Les différents éléments du dispositif expérimental utilisé pour les mesures par magnétocytométrie. Banc construit au laboratoire selon les principes de la méthode initialement proposée par Wang et al. 1993

Figure 24 : Les trois étapes de la mesure par magnétocytométrie

Figure 25 : Courbes de mesure du champ rémanent suite à l'application du couple magnétique

Figure 26 : Tête AFM de type Nano-Wizard 1 de la marque JPK Instruments montée sur un microscope inversé de type AxioObserver Z1 de la marque Zeiss

Figure 27 : Stratégie de mesure des paramètres de mécanique et d'adhésion par une spectroscopie de force dédiée aux liens multiples en AFM

Figure 28 : Courbe force-distance utilisée pour calculer la rigidité cellulaire sur une cellule donnée

Figure 29 : Courbe force-distance dans la phase de rétraction montrant les paramètres d'adhésion sont obtenus à l'échelle globale pour une cellule donnée et à l'échelle locale pour un évènement de rupture donnée

Figure 30 : Mesure de l'absorbance moyenne du MTT pour différentes concentrations de CyaA multimérique pour un temps d'exposition de 1 heure sur une culture de A549

Figure 31 : Mesure de l'absorbance moyenne du MTT pour différentes concentrations de CyaA monomérique pour un temps d'exposition de 1 heure sur une culture de A549

Figure 32 : A- D) Images des cellules épithéliales alvéolaires exposées pendant 60 min à la condition contrôle et aux différentes concentrations de CyaA dont la viabilité a été évaluée au bleu de Trypan et E) quantification du test de viabilité au bleu de Trypan pour différentes concentrations et différents temps d'exposition à la toxine CyaA

Figure 33: Test de viabilité au bleu de Trypan pour différentes concentrations et différents temps d'exposition à CyaAE5

Liste des Figures et Tableaux

Figure 34 : Mesure du taux d'AMPc intracellulaire des A549 pour différents temps d'exposition et différentes concentrations de CyaA

Figure 35 : Mesure du taux d'AMPc intracellulaire des A549 pour différents temps d'exposition et différentes concentrations de CyaAE5

Figure 36 : A) Images à 0, 30 et 40 heures des blessures faites sur une monocouche de cellules épithéliales alvéolaires (A549) après une exposition d'une heure aux trois concentrations de CyaA et B) évolution de la fermeture des blessures faites sur les mêmes cellules dans les mêmes conditions.

Figure 37 : Évolution de la fermeture des blessures faites dans une monocouche de cellules épithéliales alvéolaires (A549) après exposition d'une heure aux trois concentrations de CyaAE5.

Figure 38 : A) Images à 0 et 20 heures des blessures faites sur une co-culture de cellules épithéliales alvéolaires (A549) /macrophages adhérents après une exposition d'une heure aux trois concentrations de CyaA et B) évolution de la fermeture des blessures faites sur la même co-culture de cellules et dans les mêmes conditions.

Figure 39 : Évolution de la fermeture des blessures faites dans un épithélium différencié de cellules épithéliales nasales humaines (CENH) après exposition d'une heure aux trois concentrations de CyaA.

Figure 40 : Mesure de la fréquence du battement ciliaire (Hz) des cellules épithéliales nasales humaines (CENH) après exposition à différentes concentrations de CyaA

Figure 41 : Mesure de la fréquence du battement ciliaire (Hz) des cellules épithéliales nasales humaines (CENH) après exposition à différentes concentrations de CyaAE5

Figure 42 : Mesure de la résistance électrique trans-épithéliale (TEER) avant et après exposition aux différentes concentrations de CyaA

Figure 43 : A-D) Profils des hauteurs de cellules épithéliales alvéolaires (A549) exposées 30 min aux trois concentrations de CyaA et E) évolution des hauteurs moyennes de ces mêmes cellules A549 exposées aux mêmes conditions

Figure 44 : Quantification du nombre et de la taille des points focaux d'adhérence des cellules A549 exposées 1 heure aux trois concentrations de CyaA

Figure 45 : Marquages et quantification du nombre et de la taille des points focaux d'adhérence des cellules A549 exposées respectivement aux trois concentrations de CyaA puis 30 minutes au Mn^{2+}

Liste des Figures et Tableaux

Figure 46 : Mesure par MTC des paramètres d'adhésion et des propriétés mécaniques des cellules A549 exposées 30 min à différentes concentrations de CyaA

Figure 47 : Mesure par MTC des paramètres d'adhésion et des propriétés mécaniques des cellules A549 exposées 24 heures à différentes concentrations de CyaA

Figure 48 : Étude de quatre conditions différentes utilisées pour le traitement des sondes AFM (A) par observation des courbes force-distance et (B) par mesure des forces de détachement relative à chaque condition

Figure 49 : Évaluation statistique de la force de détachement F^* , du travail d'adhésion W_{adh} et du module d'élasticité E_{cell} mesurés pour trois vitesses différentes de déplacement de la sonde en rétraction (F^* et W_{adh}) ou en indentation (E_{cell})

Figure 50 : Évaluation statistique des paramètres d'adhésion (F^* et W_{adh}) et de mécanique (E_{cell}) mesurés par la méthode MFS sur des cellules A549 exposées aux trois concentrations de la toxine CyaA

Figure 51 : Évaluation statistique des paramètres d'adhésion et de mécanique par la méthode MFS de cellules A549 exposées à toxine CyaA 0.5 nM pour trois vitesses d'indentation/rétraction (échelle globale ou cellulaire)

Figure 52 : Relation entre la force maximale de détachement F^* et le taux de chargement r_f à l'échelle globale (cellulaire) pour les cellules exposées à la toxine CyaA 0,5 nM

Figure 53 : Évaluation statistique des forces de rupture à partir des événements locaux pour les cellules A549 exposées à la toxine CyaA 0,5 nM pour différentes vitesses de rétraction

Figure 54 : Relation entre la force de rupture f^* et le taux de chargement $\ln r_f$ à l'échelle locale

Figure 55 : Schéma synthétique des effets cellulaires et moléculaires de la toxine CyaA sur les cellules épithéliales respiratoires adhérentes

Figure 56 : Schéma illustrant la différence entre les efforts appliqués sur les liens à l'interface sonde-cellule en AFM (à gauche) et en MTC (à droite)

Liste des Figures et Tableaux

Tableau 1 : Valeurs moyennes des paramètres globaux de mécanique et d'adhésion, estimation de la distance caractéristique de la déformation cellulaire et calcul du loading rate global pour différentes vitesses d'indentation ou de séparation

Tableau 2 : Valeurs moyennes des forces de rupture et du taux de chargement à l'échelle locale estimées pour trois vitesses de séparation prédéterminées

Tableau 3 : Relation linéaire entre force et le taux de chargement globalement à l'échelle cellulaire et localement pour chaque évènement de rupture

Tableau 4: Paramètres d'adhésion obtenus par l'analyse des régressions linéaires aux échelles globale et locale sur cellules exposées à la toxine et cellules non exposées

Liste des Abréviations

A

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AFM : Microscopie à Force Atomique

AMPc/cAMP : Adénosine MonoPhosphate cyclique

ATP : Adénosine TriPhosphate

B

B. pertussis/ Bp: *Bordetella pertussis*

BSA : Sérum Bovin Albumine

C

CaM : Calmoduline

CENH : Cellules Epithéliale Nasale Humaine

CSQ : cytosquelette

CyaA : toxine Adénylate Cyclase

CyaAE5 : mutant inactif pour l'activité adénylate cyclase

CytoD : Cytochalasine D

D

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

F

FA : Adhésions Focales

FAK : Kinase des Adhésions Focales

G

GTP : Guanosine TriPhosphate

H

HPMEC : Human Pulmonary Microvascular Endothelial cells

M

MEC : Matrice ExtraCellulaire

MFS : Spectroscopie de Force des liens Multiples

MTC : MagnéToCytométrie

MTT : sel de tétrazolium (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)

P

PI : Pneumocyte de type I

PII : Pneumocyte de type II

R

RGD : tripeptide Arginine-Glycine-Acide aspartique

S

SVF : Sérum de Veau Foetal

T

TRCs : Tumor Repopulating Cells

TEER : Résistance Electrique TransEpithéliale

1. INTRODUCTION

Parce que sa fonction est d'assurer les échanges gazeux entre le sang circulant et l'air ambiant, le poumon, en tant qu'organe à l'interface avec le milieu extérieur, est soumis à de multiples agressions par des agents organiques et inorganiques variés. Si l'on considère le volume d'air inspiré au repos à chaque inspiration, un adulte en bonne santé inhale 0.5 litre d'air, soit, à raison de 16 inspirations par minute, 23 000 inspirations par période de 24 heures, ce qui correspond à 12 000 litres d'air nécessairement chargés d'une multitude de particules, bactérie, virus, champignons et poussières filtrés. Ce volume se répartit sur une surface alvéolaire développée atteignant environ 70 m², ce qui multiplie les risques de contact avec les cellules épithéliales au niveau alvéolaire. Les plus grosses particules (diamètre supérieur à 10 µm) sont retenues par la cavité nasale et le naso-pharynx contrairement aux petites particules (diamètre inférieur à 5 µm) qui parcourent les voies aériennes supérieures, atteignent les voies inférieures, se déposent sur la paroi de l'arbre trachéo-bronchique et peuvent atteindre les alvéoles d'autant plus facilement que leur taille est petite. Bien que cette exposition aux microorganismes soit permanente, les voies aériennes inférieures restent stériles grâce à la deuxième grande fonction remplie par le poumon qu'est l'épuration mucociliaire. L'épuration est assurée par le battement ciliaire qui constitue l'un des axes forts de mon équipe d'accueil. Cette épuration est également assurée par des mécanismes de défense immunitaire largement assurés par des cellules spécialisées appelées macrophages qui jouent un rôle fondamental dans le nettoyage et la protection des territoires alvéolaires. Ces mécanismes proviennent soit de l'immunité acquise (qui se met en place au cours de la vie de l'individu par la fabrication d'anticorps et de lymphocytes spécifiques), soit de l'immunité innée (grâce aux éléments constitutifs de l'individu comme la peau, les muqueuses mais également par des réactions biologiques telles que la phagocytose et

l'opsonisation). Dans certaines circonstances, des bactéries peuvent toutefois infecter la cellule ciblée. En effet, l'infection peut résulter d'une déficience des mécanismes de défense de l'hôte comme dans le cas de la dyskinésie ciliaire ou de la mucoviscidose. Cette infection peut également résulter de la rencontre avec une bactérie à fort potentiel virulent (Wilson and Jackson 1996).

Les infections des voies respiratoires représentent aujourd'hui l'une des causes majeures de mortalité. Elles semblent aussi avoir une importance dans la physiopathologie de maladies chroniques inflammatoires telles que l'asthme, la bronchite chronique, la fibrose pulmonaire ou la polypose nasosinusienne (Woodhead et al. 2011). Une meilleure connaissance des réponses de l'hôte à l'agression bactérienne permettrait de révéler de nouveaux mécanismes cellulaires participant au contrôle de l'agent infectieux et d'exploiter de nouvelles cibles thérapeutiques (Coraux et al. 2005).

La bactérie *Bordetella pertussis* a pour stratégie de coloniser l'épithélium respiratoire. Elle est connue pour être l'agent responsable de la coqueluche, une maladie aux conséquences graves, voire fatales chez le jeune enfant. Cette bactérie possède un panel de toxines qui ont chacune un rôle spécifique pour altérer la fonction de la cellule cible. L'une d'entre elle, connue sous le nom d'adénylate cyclase (CyaA), agit dans la phase précoce d'intoxication par un mécanisme tout à fait original de translocation de son domaine catalytique au travers de la membrane plasmique induisant des taux supraphysiologiques d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) aux conséquences fonctionnelles réputées majeures. Cette translocation s'opère selon deux modalités : l'une est récepteur-dépendant car CyaA se fixe aux cellules de l'immunité (neutrophiles, macrophages et natural killer) par liaison au récepteur-intégrine $\alpha_M\beta_2$ (ou CD11b/CD18) présent à la surface de ces cellules puis transloque son domaine catalytique au travers de la membrane plasmique, l'autre est récepteur-indépendant et donc susceptible d'agir sur tous les autres types cellulaires en transloquant son domaine catalytique

directement à travers la membrane plasmique de ces cellules (Ladant and Ullmann 1999). Or, il a été montré qu'une cellule infectée par une toxine bactérienne (par exemple : les toxines *Clostridium botulinum* C2 ou *Salmonella enterica* SpvB) subit des remaniements du cytosquelette d'actine (Aktories et al. 2011; Benanti et al. 2015; Euckler and Konkel 2012; Kühn and Mannherz 2017), ce qui s'accompagne de changements de la structure et de la forme de la cellule. Nous nous interrogeons dans ce travail sur les retentissements de ces changements en termes d'évolution des propriétés mécaniques, de l'adhérence à la matrice extracellulaire et finalement de la fonction des cellules infectées. En effet, les bactéries à l'origine d'infection des voies aériennes lèsent l'épithélium à travers différents mécanismes responsables notamment du réarrangement du cytosquelette d'actine (Aktories et al. 2011; Benanti et al. 2015; Euckler and Konkel 2012; Kühn and Mannherz 2017). Les éléments internes responsables de l'intégrité du cytosquelette et les éléments membranaires, responsables du remodelage de l'adhésion de la cellule-cible à son environnement matriciel et cellulaire, peuvent également être modifiés, ce qui peut aboutir à des dommages cellulaires, ainsi qu'à l'inhibition de la fonction et de la multiplication des cellules spécialisées dans la défense immunitaire. Les facteurs microbiologiques impliqués sont par ailleurs susceptibles d'altérer le battement ciliaire et le transport mucociliaire conduisant à la dyskinésie ciliaire acquise (Tilley et al. 2015).

Il est important de souligner que les effets mécaniques et physiologiques induits par ces atteintes virulentes ne sont pas encore bien décrits. Ici réside l'une des motivations fortes de cette étude, à savoir, déterminer les effets cellulaires sur les plans mécanique, structure et fonction, de l'invasion bactérienne dans la phase précoce d'intoxication des cellules épithéliales respiratoires en regardant précisément une toxine dont la virulence est majeure en raison du mécanisme d'incursion dans la cellule mis en œuvre.

Mon travail a consisté, dans un premier temps, à développer un système cellulaire-modèle d'agression bactérienne de l'épithélium respiratoire permettant d'étudier les stades précoces de l'atteinte virulente.

L'adénylate cyclase (fournie par l'équipe « Biochimie des interactions macromoléculaires » dirigée par D. Ladant et A. Chenal de l'Institut Pasteur, spécialiste de cette toxine pour sa purification, son repliement et son mécanisme de translocation), l'une des toxines produites par *Bordetella pertussis* a été retenue pour tester les effets de cette agression toxique sur des cellules épithéliales respiratoires au travers d'une évaluation biophysique et biomécanique de ces effets. Dans ce travail, nous réunissons pour la première fois des méthodes classiques de biologie cellulaire (étude de la toxicité, mesure du taux d'AMPc, contrôle des phénomènes de migration/réparation, perméabilité cellulaire) et de nouvelles méthodes issues de la bioingénierie cellulaire (microscopie à force atomique ou la magnétocytométrie) permettant une analyse encore jamais effectuée de l'adhésion cellulaire et de la mécanique (rigidité, force de rupture des liens, ...) en réponse à une atteinte virulente.

2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1. *Bordetella pertussis*, agent infectieux de l'appareil respiratoire

2.1.1. Caractéristiques de *Bordetella pertussis*

Bordetella pertussis est un agent pathogène respiratoire responsable de la maladie de la coqueluche, une infection spécifiquement localisée au niveau de l'épithélium respiratoire. L'agent pathogène produit des toxines qui provoquent des altérations du battement ciliaire et des fonctions épithéliales. Cette infection est présente dans le monde entier et peut exister sous la forme d'un parasite résidant dans les voies respiratoires des mammifères. Chez l'Homme, on signale chaque année de 20 à 40 millions de cas de coqueluche dont 400 000 cas mortels (Tan 2005). Il est important de souligner que la coqueluche est une maladie strictement humaine (Loeffelholz and Sanden 2007).

D'un point de vu morphologique, *B. pertussis* est un petit coccobacille à Gram négatif de 0.2 à 0.3 μm sur 0.5 à 0.8 μm , à coloration bipolaire, immobile et asporulé. Dans des conditions favorables de cultures, les bactéries se présentent isolées, en diplocoque ou en petits amas. Dans des conditions moins favorables, il est possible d'observer des formes plutôt filamenteuses. La membrane bactérienne a la structure tri-lamellaire classique des bactéries à Gram négatif.

B. pertussis est une bactérie strictement aérobie ayant un métabolisme respiratoire et dont la température optimale de croissance correspond à environ 35°C.

D'un point de vue biochimique, les bactéries du genre *Bordetella* n'ont pas d'activité glucidolytique. Elles utilisent certains acides aminés comme source de carbone, tels que l'acide glutamique, l'asparagine, l'alanine ou la sérine. Les caractères biochimiques permettant de distinguer les différentes espèces de *Bordetella* sont l'oxydase, la nitrate-réductase, l'uréase et l'utilisation du citrate. Il faut noter que dans le cas de *B. pertussis*,

l'aérobiose stricte s'accompagne de la présence d'une catalase et d'une réaction à l'oxydase positive.

Enfin, d'un point de vue génétique, l'ADN des membres du genre *Bordetella* possède les acides nucléiques glycine et cystéine (G+C) en pourcentage important, c'est-à-dire, entre 61 et 70 %. Des réactions d'hybridation, ADN-ADN permettent de mettre en évidence un degré de similitude entre les différentes espèces de *Bordetella* telles que *B. pertussis*, *B. parapertussis* et *B. bronchiseptica*. Le pourcentage de réassociation entre ces 3 espèces est supérieur à 80% (Kloos et al. 1981).

Si l'on s'intéresse de plus près à *B. pertussis*, il a été mis en évidence, à l'aide de la constitution d'une carte physique du génome d'une souche de *B. pertussis* d'origine japonaise (Tohama I), que le chromosome a une taille de 3750 kb (Figure 1) (Andrade et al. 2014; Stibitz and Garletts 1992). Le génome de *B. pertussis* comporte de nombreuses séquences répétées spécifiques appelées séquences d'insertion comme IS481. Ces éléments, qui ont la capacité de s'insérer dans différentes positions et orientations dans le génome bactérien, ont souvent évolué avec leur hôte et présentent donc une spécificité d'espèce (Zee et al. 1993).

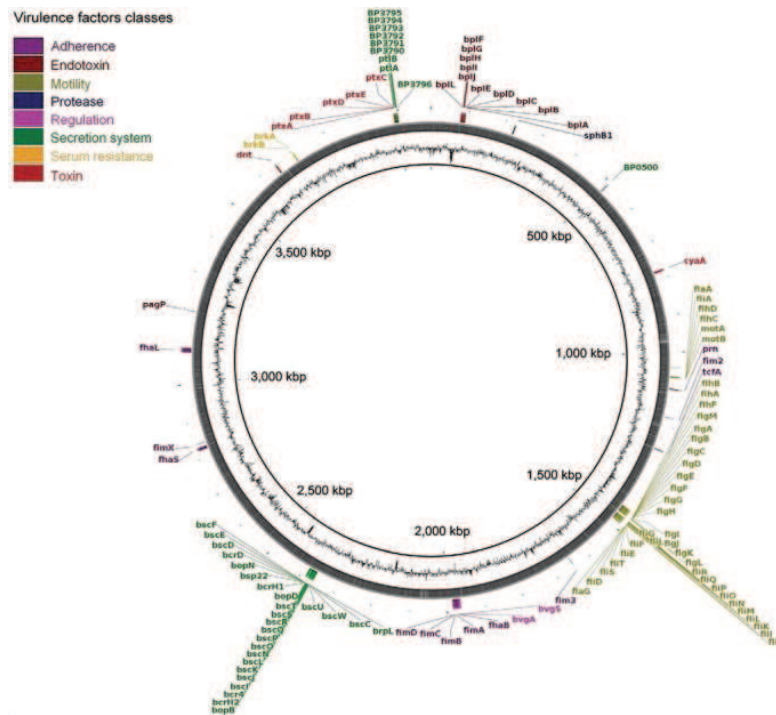


Figure 1 : Carte génomique de *Bordetella pertussis*

Le cercle interne représente la séquence de référence de *Bordetella pertussis*, Tohama I, suivi du pourcentage de G+C. Le cercle externe en couleur représente la localisation des facteurs de virulence.

(D'après Andrade et al. 2014)

2.1.2. Pouvoir pathogène de *Bordetella pertussis*

La virulence d'une bactérie se définit par son aptitude à se multiplier dans la cellule hôte, ce qui induit des degrés différents de maladie. Pour cela, la bactérie doit disposer d'une porte d'entrée afin d'envahir l'hôte. Dans le cas de *B. pertussis*, le pouvoir pathogène réside dans l'expression de ses déterminants de virulence constitués d'adhésines et de toxines (Figure 2). L'infection par *B. pertussis* implique dans un premier temps, l'adhésion de la bactérie sur les cellules de l'appareil respiratoire. L'adhésion est une interaction spécifique entre une adhésine bactérienne, définie comme un antigène situé à la surface du pathogène et un récepteur de surface des cellules hôtes. Il existe 2 types d'adhésines : les adhésines fimbriales (des pilli) et les adhésines non fimbriales. Les adhésines non fimbriales (de la membrane ou de la paroi bactérienne) sont généralement impliquées dans les liaisons de type protéine-protéine avec leurs récepteurs cellulaires que sont les intégrines, par l'intermédiaire du motif

peptidique RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique). La colonisation de l'appareil respiratoire est alors facilitée par l'action de ces adhésines et est suivie d'une multiplication bactérienne au niveau local. Ces adhésines permettent aussi le contact avec les cellules du système immunitaire de la cellule-cible comme l'émblématique macrophage.

Dans un second temps, il survient ce que l'on appelle le syndrome toxinique. Ce syndrome se définit par le fait que la bactérie sécrète des toxines qui vont entrer dans les cellules-cibles (cellules épithéliales respiratoires) et altérer leurs fonctions.

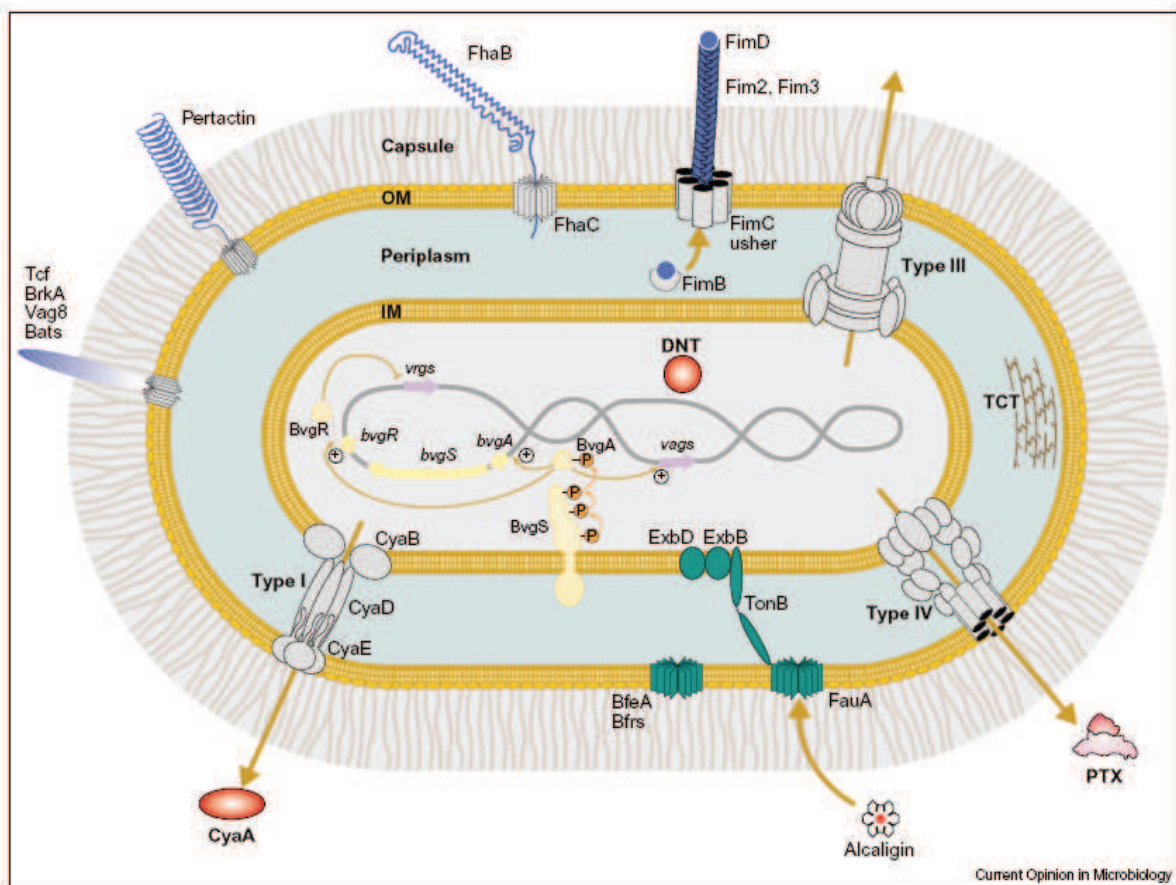


Figure 2 : Les facteurs virulents de *Bordetella pertussis*

B. pertussis est décrite comme un organisme Gram négatif avec une membrane externe et une membrane interne (OM et IM), un périsplasme et une capsule. Les adhésines Fim, FhaB, pertactine, Tcf, BrkA, Vag8 et Bats apparaissent en bleu ; les toxines PTX, CyaA et DNT sont en rouge ; les protéines accessoires FhaC, FimB, FimC, Type III, Type IV et Type I sont en gris ; les systèmes d'absorption du fer ExbB/ExbD, TonB, FauA, BfeA et Bfrs sont en vert ; et les systèmes de régulation BvgA, BvgS et BvgR sont en beige. Les larges flèches marron représentent respectivement l'orientation de l'export et de l'import des facteurs virulents et des sidérophores. Les fines flèches marron montrent le phosphorelais et le circuit de régulation.

(D'après Loch et al. 2001)

2.1.2.1. Adhésines

2.1.2.1.1. L'hémagglutinine filamenteuse (FHA)

Son gène de structure *phaB* code un précurseur de 367 kDa appelé PhaB (Arico et al. 1993). La biosynthèse de FHA dépend d'une protéine auxiliaire membranaire FHA C qui intervient dans la protéolyse et la sécrétion de la FHA. L'interaction entre ces 2 protéines est spécifique et fait intervenir le domaine amino-terminal de la FHA. Ce domaine et la protéine FHA appartiennent à une famille de systèmes de sécrétion des bactéries à Gram négatif appelé Two-Partner Secretion système (TPS) (Jacob-Dubuisson, Locht, and Antoine 2001). La FHA exprime 3 sites d'adhésion aux cellules cibles. Premièrement, le motif RGD favorise la liaison aux cellules de l'immunité (monocytes, macrophages) *via* LRI/IAP pour leukocyte response integrin/integrin associated protein et le CR3 pour complement receptor 3 (Saukkonen et al. 1991). La liaison de la bactérie au macrophage *via* l'interaction FHA/CR3 provoque l'internalisation du pathogène sans toutefois déclencher de réaction oxydative (Sandros and Tuomanen 1993). Enfin, FHA possède un domaine de reconnaissance de carbohydrates qui permet l'attachement de la bactérie aux cellules épithéliales et aux macrophages.

2.1.2.1.2. Les fimbriae (FIM)

Les fimbriae FIM2 et FIM3 sont composées de sous-unités identiques de poids moléculaires 22,5 et 22kDa. Ils possèdent à leur extrémité une sous-unité de 40 kDa appelée FIM D (Geuijen et al. 1997). La biosynthèse de FIM2 et FIM3 dépend de 2 autres protéines: FIM B, une protéine chaperon péri-plasmique et FIM C, une protéine membranaire (Willems et al. 1994). Les sous-unités FIM2 et FIM3 se fixent sur les sucres sulfatés de l'appareil respiratoire (Geuijen and Willems 1996). La sous-unité FIM D se fixe sur l'intégrine VLA-5 pour Very Late Antigen-5 localisée à la surface des monocytes (Hazenbos et al. 1995) ce qui

entraîne l'activation du CR3, récepteur de la FHA ce qui est la preuve d'une coopération entre les fimbriae et FHA.

2.1.2.1.3. La pertactine (P.69 ou PRN)

La pertactine est considérée comme un auto-transporteur ; c'est-à-dire qu'elle assure son propre transport à la surface de la bactérie et la protéolyse de son domaine carboxy-terminal. Elle est sécrétée à la surface de la bactérie dérivant d'une protéine précurseur de 94 kDa. Elle possède un motif RGD responsable de la liaison aux cellules-cibles suggérant une certaine redondance avec le rôle de FHA (Khelef et al. 1994).

2.1.2.2. Toxines

2.1.2.2.1. La toxine cytotrachéale (TCT)

Cette toxine est constituée d'un fragment d'un peptidoglycane, et plus précisément, un muramyl peptide qui est responsable de la destruction des cellules ciliées ce qui entraîne une diminution de la fréquence du battement ciliaire (Wilson et al. 1991). Il en résulte alors une altération d'un des processus de défense, à savoir, la clairance mucociliaire. Selon Smith et al., cette défaillance serait à l'origine de la toux, symptomatique de la maladie de la coqueluche (Smith, Guzman, and Walker 2001).

2.1.2.2.2. La toxine pertussique (PT)

La toxine pertussique joue un rôle dans les phases précoces de colonisation de l'appareil respiratoire par *B. pertussis* (Carbonetti et al. 2005) et un rôle tardif dans l'inflammation des voies respiratoires (Andreasen, Powell, and Carbonetti 2009). PT est une toxine dite AB₅, composée de sous-unités allant de S1 à S5. La sous-unité S1 est une ADP-ribosyltransférase qui inhibe la signalisation à partir des récepteurs couplés aux protéines G_i sur la face interne des membranes plasmiques des cellules hôtes. Les autres sous-unités (S2 à S5), quant à elles,

permettent la liaison de PT aux récepteurs glycoprotéiques ou glycolipidiques présents à la surface des cellules (Brennan et al. 1988).

2.1.2.2.3. L'adénylate cyclase (CyaA)

L'adénylate cyclase (CyaA), encore appelée adényl-cyclase est l'une des principales toxines produites par *B. pertussis*. Il s'agit d'un agent majeur dans l'infection de la coqueluche. Cette enzyme, identifiée depuis plus de 20 ans exprime 3 caractéristiques principales : 1- elle est sécrétée par une bactérie virulente, 2- elle est activée par la calmoduline eucaryote (CaM), 3- elle peut pénétrer dans les cellules eucaryotes où, lors de l'activation endogène par la CaM, elle catalyse une forte synthèse de l'Adénosine MonoPhosphate cyclique (ou AMPc) qui va à son tour induire une perturbation des réponses immunitaires de la cellule cible (Ladant and Ullmann 1999) ainsi qu'une altération des fonctions des cellules épithéliales. CyaA joue un rôle important lors des phases précoces de la colonisation des voies respiratoires par la bactérie.

CyaA, toxine codée par le gène CyaA, est une protéine constituée de 1706 résidus. Par ailleurs, il s'agit d'une protéine bifonctionnelle ayant des activités adénylate cyclase et hémolytique (Malik et al. 2016). Dans un premier temps, la protéine est synthétisée sous la forme d'un précurseur inactif. Celui-ci subit alors une palmitoylation sur la lysine 983 *via* une CyaC acyltransférase. Cette modification post-traductionnelle induit l'activation de la protéine (Ladant and Ullmann 1999). L'organisation structurale de la protéine est résumée sur la Figure 3.

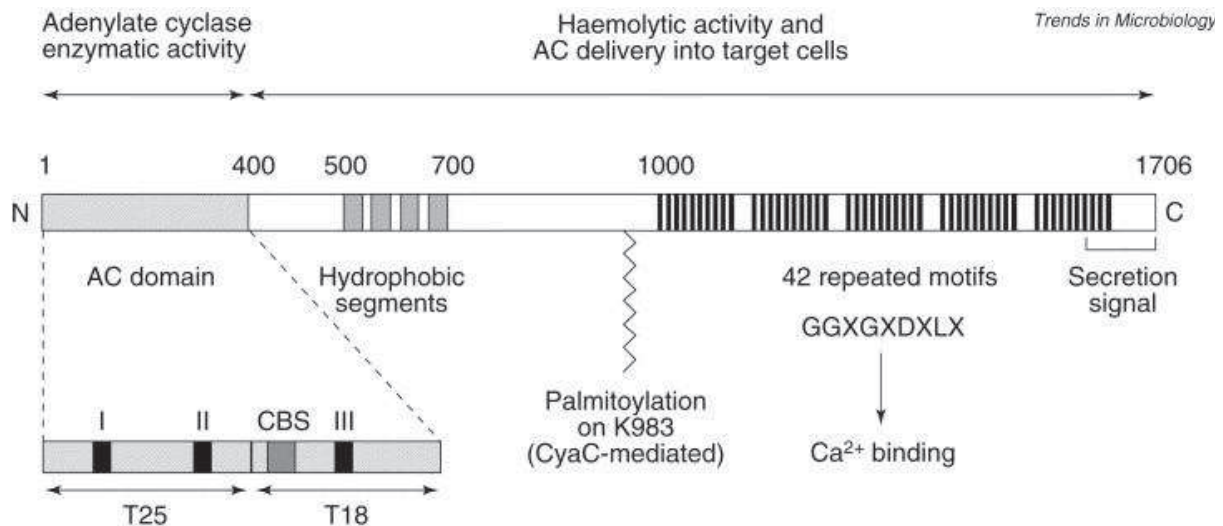


Figure 3 : Organisation structurale de la toxine adénylate cyclase de *Bordetella pertussis*.

Les nombres représentent les résidus amino-acides. Le domaine catalytique (AC) est élargi pour montrer les sous-domaines T25 et T18. CBS correspond au site principal de liaison à la calmoduline et les boîtes I, II et III représentent les régions impliquées dans la catalyse. (D'après Ladant et Ullmann, 1999).

La partie N-terminale, composée de 400 acides aminés, est composée de : 1- le domaine catalytique (ou AC) qui est transloqué dans la cellule-cible, 2- le domaine de liaison à la calmoduline, 3- le site de liaison à l'ATP (Ladant and Ullmann 1999). La partie C-terminale constituée de 1306 acides aminés, permet la translocation de l'AC et du phénotype hémolytique de CyaA. Elle est considérée comme étant un domaine de liaison à la cellule cible. Comme le montre la Figure 3, la partie C-terminale contient, d'une part un domaine appelé CyaA-Hly qui est constitué d'une partie hydrophobe (500-700 acides aminés) et qui a la capacité de former un canal laissant passer les cations de manière sélective. Ce phénomène est à l'origine de la lyse de certaines cellules. D'autre part, il existe un domaine riche en répétition de glycine et d'aspartate, ce qui est caractéristique d'un motif commun à une large famille de toxine bactérienne : le motif RTX (pour Repeat-in-ToXin). Ces motifs, répétés 42 fois, sont organisés en 5 blocs de structure similaire et connectés entre eux par des séquences linkers de longueur variable. Ils correspondent également aux sites de liaison du calcium. En l'absence de calcium, ces sites sont perturbés. En effet, ces sites qui sont chargés négativement et désordonnés, sont stabilisés et neutralisés par les ions Ca^{2+} . De plus, les ions

calcium permettent à ce domaine de se replier en une structure appelée β -roll (Ladant and Ullmann 1999). Le sous-domaine CyaA-RTX possède une forte affinité pour les intégrines $\alpha_M\beta_2$ (ou CD11b/CD18) exprimées à la surface des cellules de la lignée myéloïde (macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques, cellules natural killer). L'infection par CyaA de ces cellules est plus virulente et bien caractérisée dans la littérature. CyaA intoxique ces cellules selon un processus en 3 étapes : la liaison, l'insertion et la translocation. L'étape d'insertion peut avoir lieu entre 4 et 36°C. La translocation de son domaine catalytique à travers la membrane plasmique de la cellule cible se fait à 20°C et est calcium-dépendante. Cela permet alors d'activer la calmoduline endogène qui va induire à son tour la conversion d'ATP en AMP cyclique à des niveaux supraphysiologiques (Karst et al. 2014; Ladant and Ullmann 1999; Wolff et al. 1980).

Il a été montré également que CyaA peut infecter d'autres types cellulaires dépourvus de cette intégrine telles que les cellules épithéliales (Bassinet et al. 2000; Ewanowich et al. 1989; Friedman et al. 1992; Lamberti et al. 2010).

Ce phénomène suggère que CyaA *via* son peptide RGD peut être reconnu par d'autres récepteurs intégrines ($\alpha_6\beta_1$, α_8 , α_v , $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$) ou qu'il existe une voie alternative permettant à CyaA de reconnaître ces cellules. En effet, la nature amphipathique de CyaA permettrait une liaison à une grande variété de membranes plasmiques de cellules dépourvues du récepteur intégrine $\alpha_M\beta_2$ en suivant une voie cholestérol et cavéole-dépendante impliquant la machinerie endocytaire des cellules non-phagocytaires, contournant ainsi une action du système immunitaire, et donc une potentielle mort cellulaire (Martín et al. 2015).

2.1.3. CyaA : une toxine-modèle de l'atteinte de l'épithélium respiratoire

Comme nous l'avons dit précédemment, *B. pertussis* cible essentiellement l'appareil respiratoire, ce qui est en accord avec le thème général de l'équipe. L'association d'outils de bioingénierie originaux et des méthodes de biologie plus classiques nous a permis d'étudier

l'une des toxines de *B. pertussis*, CyaA, dotées de multiples talents. Outre ses multiples activités (i) d'invasion, (ii) d'adénylate cyclase renforcée par sa liaison à la calmoduline, (iii) hémolytique, et (iv) sa capacité à former des pores membranaires, la toxine CyaA dispose d'un mécanisme de translocation directe de son domaine catalytique à travers la membrane plasmique d'une grande variété de cellules. De plus, CyaA est connue pour agir dans la phase précoce de l'infection par *B. pertussis*, ce qui est approprié à notre étude, puisqu'elle vise l'évaluation des changements fonctionnels, des propriétés mécaniques et d'adhérence de la cellule épithéliale respiratoire au cours de l'agression initiale par un facteur virulent.

Ainsi, l'un des changements potentiels qui peut être opéré par CyaA, et qui est commun à plusieurs espèces bactérienne, peut se produire au niveau du cytosquelette de la cellule-cible. Pour être plus précise, après interaction spécifique entre le ligand bactérien et le récepteur cellulaire, il apparaît des réarrangements du cytosquelette des cellules cibles aboutissant à l'invasion de la toxine bactérienne dans la cellule. En effet, il a été montré que l'entrée de CyaA dans la cellule cible est concomitante avec une restructuration du réseau actinique localisé essentiellement sous la membrane plasmique de la cellule (Martín et al. 2015). Les facteurs qui conditionnent l'internalisation de la toxine dans la cellule cible sont la nature du récepteur cellulaire, l'affinité de liaison des ligands pour ce récepteur et le type de signal déclenché par l'interaction bactérie-cellule cible. Le récepteur de la cellule cible peut être une intégrine, c'est-à-dire, une glycoprotéine transmembranaire, également connue pour être un mécanorécepteur présent dans les sites d'adhésion (Wang, Butler, and Ingber 1993). Le ligand bactérien se fixe alors *via* sa séquence RGD sur les intégrines situées à la surface de nombreuses cellules eucaryotes : macrophages, leucocytes, cellules épithéliales, entre autres (Isberg 1991). C'est donc ce polymorphisme qui fait de CyaA un candidat potentiel comme cible thérapeutique à de nombreux niveaux (Guiso 2017).

Pour toutes ces raisons, nous avons fait de CyaA notre toxine-modèle de l'atteinte virulente de l'épithélium respiratoire.

2.2. Structure et fonction de l'épithélium respiratoire

L'épithélium respiratoire forme une interface entre l'individu et l'environnement extérieur. Il présente une structure complexe constituée d'un grand nombre de types cellulaires. Cependant, leur distribution n'est pas homogène.

2.2.1. Composants de l'épithélium respiratoire

2.2.1.1. Au niveau des voies aériennes supérieures et bronchiques

Cet épithélium hautement spécialisé et polarisé comporte une face basale en contact avec les tissus et une face apicale dans la lumière des voies aériennes.

2.2.1.1.1. Les cellules ciliées

À la surface de l'épithélium des voies aériennes proximales, les cellules ciliées prédominent. Ces cils battants jouent un rôle fondamental dans l'épuration pulmonaire car ils assurent la clairance mucociliaire. Les cils (environ 200 par cellule) se situent à la face apicale avec une densité de 5 à 8 cils par μm^2 (Sleigh, Blake, and Liron 1988). Ils mesurent entre 5 et 7 μm de long pour un diamètre de 0.25 μm et battent à une fréquence de 10 à 20 battements par seconde. La structure interne du cil est majoritairement formée de microtubules et de moteurs moléculaires (dynéines et kinésines). Cette structure axiale est motrice, elle constitue l'axonème. Elle est le support du mouvement ciliaire. Enfin, entre chaque cil, il existe des microvillosités.

2.2.1.1.2. Les cellules caliciformes

Les cellules caliciformes ont un noyau situé à la base laissant la place à des vacuoles de sécrétion contenant du mucigène. Cette substance participe avec les sécrétions des glandes

séro-muqueuses à la formation du mucus dans la limite de 10 à 30 ml par jour. Le mucus permet d'emprisonner les particules inhalées lors de la respiration. Il possède des propriétés rhéologiques et anti-bactériennes. Il se compose essentiellement d'eau et d'électrolytes (95%), de mucines (2%) de protéines (1%), de lipides (1%) et de sels inorganiques (1%). Il est important de noter que le nombre de cellules caliciformes augmente avec celui des impuretés de l'air inspiré.

2.2.1.1.3. Les cellules basales

Ces cellules sont de petite taille et sont situées dans la partie profonde de l'épithélium au niveau de la membrane basale. Elles ont un rôle primordial dans le renouvellement cellulaire des épithéliums car ce sont des cellules dites de « réserve ». En effet, elles sont capables d'évoluer vers n'importe quel type cellulaire bronchique. La membrane plasmique des cellules basales est riche en desmosomes, ce qui permet un attachement aux autres cellules épithéliales et à la lame basale (Thompson et al. 1995). Ces cellules sont à l'origine de l'aspect pseudostratifié de l'épithélium bronchique.

2.2.1.1.4. Les cellules neuroendocrines

Les cellules neuroendocrines sont minoritaires. Ces cellules se lient de façon spécifique à la partie basale de l'épithélium et comportent de fines extensions cytoplasmiques jusqu'à la surface luminale. Leur densité est maximale au niveau des bronchioles. Elles représentent une source riche en produits de sécrétion tels que la somatostatine, la sérotonine, l'endothéline et la calcitonine. Enfin, ces cellules sont capables de s'organiser en groupe afin de former des corps neuro-épithéliaux, c'est-à-dire, des chémorécepteurs capables de détecter les variations de teneur en O₂ ou en CO₂.

2.2.1.2. Au niveau des voies aériennes inférieures

Comparé à l'épithélium des voies de conduction, la spécificité de l'épithélium alvéolaire est son implication directe dans les échanges gazeux. Le rôle du surfactant est majeur pour ces échanges gazeux et pour la protection mécanique de l'épithélium alvéolaire.

2.2.1.2.1. L'unité principale du poumon profond : l'alvéole pulmonaire

Les alvéoles pulmonaires forment des polyèdres qui constituent la partie finale de l'arbre bronchique sont situées en sortie des bronchioles terminales. Les parois des alvéoles sont formées par les septa inter-alvéolaires et comportent un épithélium monocouche très aminci sur chaque face, un réseau capillaire central et un tissu interstitiel réduit au minimum (quelques centaines de μm) et très élastique afin de permettre l'expansion et la rétraction alvéolaire au cours du cycle respiratoire.

2.2.1.2.2. Les cellules de l'épithélium alvéolaire : les pneumocytes I et II (PI et PII)

L'épithélium alvéolaire est bordé de cellules spécialisées, les pneumocytes. Il en existe 2 types : les pneumocytes de type I (PI) et les pneumocytes de type II (PII). Les PI sont des cellules très aplaties (comme un lamellipode), très étalées, puisqu'elles peuvent atteindre un diamètre de 100 μm . Bien que les PI et les PII soient en proportions équivalentes, les PI couvrent 90% de la surface alvéolaire. Les PI sont des cellules en différenciation terminale, plus capables de se diviser. Leur caractère très étalé et la finesse qui en découle expliquent largement leur susceptibilité aux agressions. Leur renouvellement particulièrement lent (demi-vie allant de 40 à 120 jours) est assuré par les PII.

Les PII ont une morphologie très différente des PI. En effet, ce sont des cellules cuboïdales, situées plutôt au niveau des angles des septa alvéolaires. Leur face basolatérale repose sur une lame basale, qui présente des discontinuités à travers lesquelles des prolongements cytoplasmiques, les podocytes, viennent s'accoler aux cellules fibroblastiques interstitielles.

Contrairement au PI, les PII sont des cellules riches en organites et notamment en mitochondries. Elles possèdent également un réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi très développés. Enfin, les PII possèdent des vésicules de stockage et de sécrétion du surfactant appelées corps lamellaires. Elles ont la capacité de proliférer et de se différencier en pneumocytes de type I.

2.2.1.2.3. Les autres éléments

2.2.1.2.3.1. Les cellules endothéliales

Les capillaires alvéolaires sont constitués de cellules endothéliales reposant sur une lame basale. Ces cellules forment avec les PI la barrière alvéolo-capillaire. Les capillaires alvéolaires sont très peu perméables aux grosses molécules car les cellules endothéliales formant la paroi des capillaires sont jointives et capables de constituer des jonctions serrées. Pour cette raison, seules l'eau et les petites protéines sont susceptibles de passer cette barrière (Verkman 2002).

2.2.1.2.3.2. Le tissu interstitiel

Le tissu interstitiel est considéré comme un espace continu et commun à toutes les structures pulmonaires. Il correspond à une zone de circulation des liquides pulmonaires et des cellules migrantes. Il est composé de fibroblastes, de cellules musculaires lisses, de myofibroblastes, de péricytes et de cellules indifférenciées.

2.2.1.2.3.3. Les cellules mobiles

Il existe également des cellules de l'immunité présentes dans les espaces alvéolaires interagissant avec l'épithélium alvéolaire dont la mission sentinelle est de protéger l'épithélium alvéolaire des agressions extérieures. Parmi ces cellules de l'immunité, on retrouve majoritairement des macrophages alvéolaires à hauteur de 85% et des lymphocytes T.

L'ensemble des cellules composant l'alvéole pulmonaire décrites ci-dessus est représenté en figure 4.

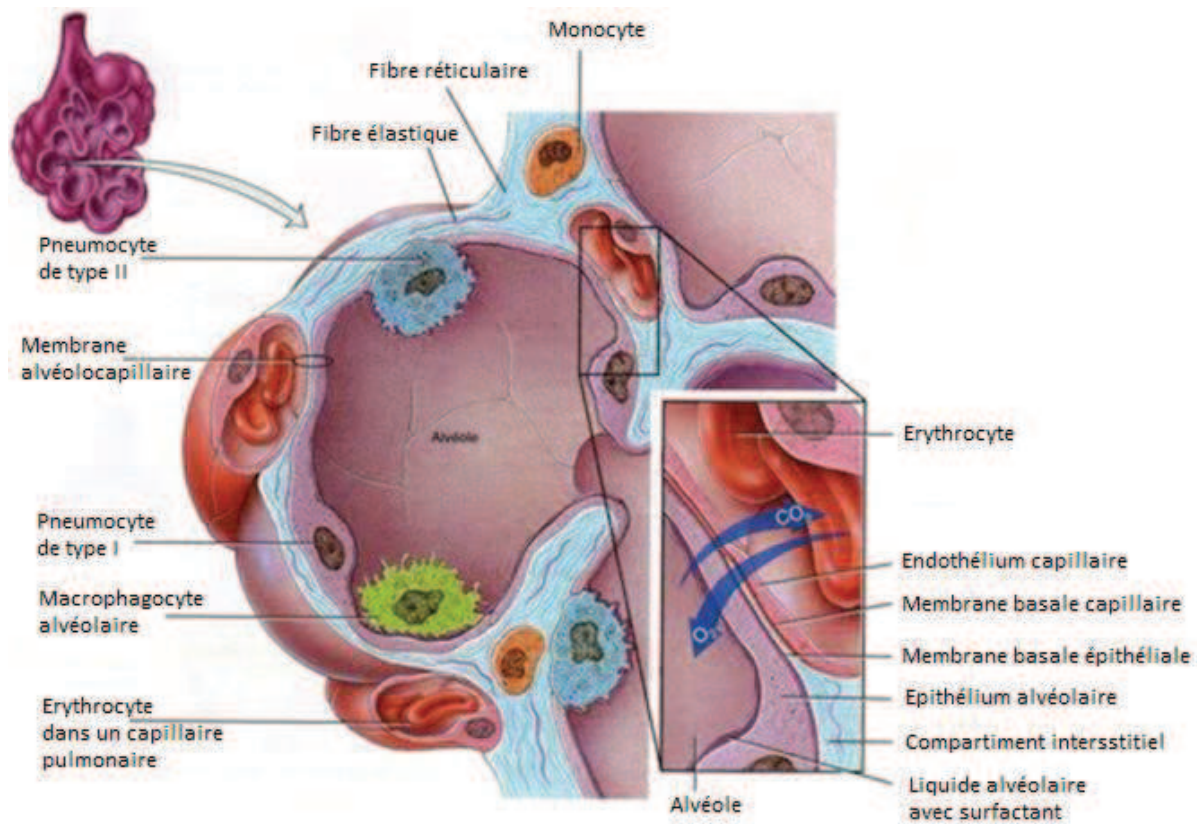


Figure 4 : Schéma de coupe d'une alvéole montrant les cellules qui la composent et détail de l'anatomie de la membrane alvéolo-capillaire

(D'après Y. Cloutier, 2013)

2.2.2. Fonctions de l'épithélium respiratoire

L'épithélium respiratoire a pour fonction principale d'apporter l'oxygène dans la zone d'échanges gazeux des poumons par diffusion à travers la paroi alvéolaire pour oxygéner le sang circulant dans les capillaires et cela en fonction de la variété des besoins physiologiques.

2.2.2.1. Fonctions de l'épithélium respiratoire des voies supérieures

2.2.2.1.1. Fonction d'humidification et réchauffement de l'air

Le conditionnement de l'air est assuré par plusieurs mécanismes. Premièrement, la muqueuse nasale présente de nombreuses villosités et la forme en fente de la cavité nasale assurent un

contact étroit entre l'air inhalé et la muqueuse de la paroi. Ces premières caractéristiques impliquent également que la cavité nasale présente une grande surface d'échange. De plus, l'échange de chaleur est facilité par la grande quantité de sang artériel circulant dans les anastomoses artério-véneuses. Enfin, il se produit une humidification au niveau des fosses nasales en raison des cellules à mucus.

Ce conditionnement nasal a pour objectif de préparer l'air aux échanges gazeux qui sont réalisés dans les alvéoles à une température de 37°C associé à un taux d'humidité de 100%. Dans le naso-pharynx, la température de l'air avoisine les 34°C, soit une différence de 3°C avec l'air contenu dans les poumons. Autrement dit, la plus grande partie du processus de réchauffement et d'humidification de l'air s'accomplit bien avant que ce dernier n'atteigne les poumons (Keck et al. 2000).

2.2.2.1.2. Fonction de purification de l'air

La purification de l'air est réalisée en premier lieu par filtration à travers les vibrisses (poils tapissant dans la cavité nasale). Le nez est le principal site de dépôt des particules dans les voies aériennes, mais l'efficacité du filtre dépend du diamètre des particules inhalées : plus leur diamètre est grand, plus le dépôt initial est important. Les particules ayant un diamètre supérieur à 12 µm sont stoppées alors que les particules de 2 à 12 µm sont éliminées *via* un second mécanisme appelé « épuration mucociliaire » (Jones 2001).

L'épuration mucociliaire - assurée par le transport mucociliaire - permet d'acheminer les aéro-contaminants en direction du système digestif. Ce transport est donc bidirectionnel : descendant au niveau des voies aériennes nasales et montant au niveau des voies aériennes sous-pharyngées (trachée, bronches).

Le transport mucociliaire est assuré par le battement des cils présents à la surface apicale des cellules ciliées. Chacune d'elles possède environ 200 cils avec une densité d'environ 5 à 8

cils par μm^2 (Hill et al. 2010; Sleigh et al. 1988). Le battement des cils mobiles respiratoires s'effectue principalement dans la sous couche du liquide épithélial de surface. Ce dernier se compose de deux couches (Wanner, Salathe, and O'Riordan 1996) : une couche supérieure de mucus très visqueuse et non-Newtonienne composée à 98% d'eau sécrétée par les cellules spécialisées et une couche inférieure lubrificatrice, hydrique et peu visqueuse nommée "liquide péri-ciliaire" (Widdicombe and Widdicombe 1995).

2.2.2.2. Fonctions de l'épithélium respiratoire des voies inférieures

2.2.2.2.1. Fonction d'échanges gazeux

L'épithélium alvéolaire est recouvert d'un film situé entre la surface des cellules alvéolaires et le surfactant. L'homéostasie de ce film fin résulte de l'équilibre entre les forces mécaniques, hydrostatiques et osmotiques s'exerçant au travers de la barrière entre l'espace interstitiel et l'espace alvéolaire, et d'un mécanisme de résorption active.

Le surfactant est essentiel au bon déroulement des échanges gazeux. En effet, il empêche le collapsus des alvéoles lors du cycle respiratoire considérant que les très petits diamètres alvéolaires (environ 300 μm chez l'Homme) favorisent les effets de collapsus alors que le surfactant favorise leur dilatation. Par ailleurs, le surfactant diminue les forces d'adhérence des parois et s'oppose aux forces de compression qui tendent à rétracter les alvéoles pendant l'expiration. Il se compose principalement de phospholipides et de protéines, parmi lesquels on compte des molécules tensioactives qui abaissent la tension superficielle en se concentrant à l'interface air-liquide, ce qui permet de diminuer considérablement la tension superficielle entre l'air alvéolaire et la surface alvéolaire (André Dias 2017). Ces molécules tensioactives permettent d'homogénéiser les différences loco-régionales en équilibrant les pressions gazeuses dans des alvéoles de tailles différentes. En effet, la quantité de surfactant restant constante à l'intérieur de chaque alvéole durant le cycle respiratoire, le nombre de molécules de surfactant par unité de surface devient d'autant plus grand que le volume de l'alvéole

diminue. Enfin, la tension superficielle au sein du film alvéolaire diminuant lorsque l'alvéole se contracte et augmentant quand elle se dilate, le surfactant permet un équilibre des pressions exercées par les surfaces alvéolaires au cours du cycle respiratoire.

2.2.2.2.2. Fonction de barrière

La membrane alvéolo-capillaire est un site important pour les échanges gazeux (voir paragraphe Fonction d'échanges gazeux), mais en tant qu'interface entre l'air et le sang, cette membrane constitue aussi une barrière sélective pour de nombreuses substances. Les micro-organismes et un grand nombre de substances présentant une plus ou moins grande toxicité, sont filtrés par cette membrane. À cet effet, les pneumocytes sont reliés entre eux par des complexes jonctionnels. Les jonctions intercellulaires sont de 3 types : les *zonula adherens* qui contiennent des molécules d'adhésion intercellulaire contribuant à l'adhésion intercellulaire et à la reconnaissance épithéliale, les desmosomes composés de protéines et impliqués dans l'intégrité de l'épithélium et enfin, les jonctions serrées. Elles confèrent à l'épithélium respiratoire son rôle de barrière physique.

De plus, cette zone d'échange ne tolère pas l'accumulation de liquide. Ainsi, l'une des fonctions essentielles de cet épithélium est de s'opposer à toute accumulation de liquide qui pourrait augmenter la distance de diffusion entre le gaz alvéolaire et le sang.

D'autre part, c'est une petite partie du surfactant, composée de protéines SP pour Surfactant Protein de type A, B, C et D, qui réalise le plus grand rôle protecteur de la paroi alvéolaire. Alors que les protéines SP-B participent à l'action que le surfactant exerce pour empêcher le collapsus alvéolaire, les SP-A et SP-D sont capables de se fixer sur des bactéries, des virus, des allergènes et des cellules apoptotiques dans le but de faciliter leur phagocytose par les macrophages. Récemment, il a été montré que la SP-C est capable de fixer le lipopolysaccharide (LPS) bactérien.

2.2.2.2.3. Fonction de réparation épithéliale

La réparation a pour but de reconstruire complètement les structures lésées. Le processus de réparation tissulaire se fait par une série d'évènements communs à la plupart des organes. Au niveau du site de lésion, il se produit en premier lieu ce que l'on appelle une extravasation plasmatique avec la formation d'un réseau de fibrine et de fibronectine. Il s'en suit alors une activation des facteurs de croissance de la coagulation et l'agrégation plaquettaire. Dans le même temps, les cellules de l'inflammation (neutrophiles, monocytes et macrophages) sont activées et recrutées ainsi que les fibroblastes et les cellules endothéliales qui contribuent à la formation de néo-vaisseaux sanguins. Enfin un tissu fibreux est formé sous l'action des myofibroblastes : c'est le tissu de granulation. Les cellules épithéliales proches de la lésion s'étalent, migrent, prolifèrent et se différencient afin de restaurer le tissu épithélial d'origine (Aepfelbacher et al. 1997).

2.3. Structures cellulaires et moléculaires de la cellule adhérente dans son environnement

2.3.1. La matrice extracellulaire (MEC)

La matrice extracellulaire (MEC) se définit comme un réseau complexe très organisé constitué de macromolécules polymérisées, en étroit contact avec les cellules qui les sécrètent. La MEC joue un rôle primordial dans l'architecture tissulaire, mais également dans des processus cellulaires multiples et variés au travers de la régulation des fonctions cellulaires et notamment, la différenciation et la prolifération. Ce réseau complexe se construit et évolue en se spécialisant au cours du développement. Sa composition change en fonction des conditions physiologiques (croissance, remodelage du tissu au cours du processus de réparation) (Garat et al. 1996; Karim 1998) et/ou pathologiques (fibroses, arthroses) (Li, Zhao, and Kong 2017).

La grande diversité des structures de la MEC est liée notamment au nombre de molécules qui la composent ainsi qu'à leurs capacités d'interaction. Ces macromolécules peuvent être classées en 3 groupes distincts :

- les protéines fibreuses qui sont très volumineuses comme les collagènes ou l'élastine ;
- les glycoprotéines, de taille inférieure, comme la fibronectine ou la laminine qui jouent un rôle important dans l'adhésion cellulaire ;
- les chaînes polysaccharidiques appelées glycosaminoglycanes, qui sont souvent fixés de façon covalente à des protéines pour former ce que l'on appelle les protéoglycanes, qui constituent un gel hydraté de remplissage de la matrice en piégeant les molécules d'eau.

Comme il a été dit plus haut, les macromolécules matricielles sont synthétisées par les cellules placées au sein de cette matrice. Ainsi, les fibroblastes et les cellules dérivées comme les ostéoblastes ou les chondrocytes, sont situés dans la matrice conjonctive / interstitielle et la synthétisent. Les cellules épithéliales et endothéliales reposent sur une matrice spécialisée appelée lame basale sécrétée en coopération avec les fibroblastes.

Aussi, la MEC est une structure dynamique en perpétuel remaniement, qui résulte d'un équilibre entre la synthèse de ses constituants et leur dégradation par des enzymes spécialisées appartenant au système activateur du plasminogène (l'urokinase) ou le système des métalloprotéases de la MEC (MMPs). Le système membranaire de l'activateur du plasminogène (UPAR/UPA/PAI-1) est un complexe tripartite composé de son récepteur, UPAR, son ligand UPA et l'inhibiteur spécifique PAI-I impliqué indirectement dans la dégradation des éléments de la MEC mais également dans l'adhésion des cellules à la MEC (Planus et al. 1997). Les MMPs sont surexprimées lors de phénomènes pathologiques d'invasion ou lors de la réparation des cellules alvéolaires par exemple (Planus et al. 1999). La structure matricielle est adaptée à l'organisation du tissu qu'elle compose, que ce soit en

termes de molécules, de signalisation, de diffusion ou de propriétés mécaniques. L'ensemble formé par les cellules et la MEC doit être appréhendé comme étant un système régi par des forces physiques en perpétuel ajustement pour permettre un équilibre mécanique entre ses différents composants.

Les interactions mécaniques entre les cellules et la MEC passent par des points de convergence particuliers (comme les contacts focaux par exemple) qui impliquent des récepteurs transmembranaires spécialisés appelés intégrines capables de se lier chimiquement – avec toutefois des affinités différentes – à des ligands matriciels. Ces interactions mécano-chimiques jouent un rôle fondamental dans l'adhérence des cellules à la MEC, dans l'intégrité cellulaire et la cohésion tissulaire. En effet, ces interactions déterminent la force d'interaction cellule-matrice mais aussi la sensibilité cellulaire à l'environnement car elles sont le siège d'une signalisation bidirectionnelle entre cellules et matrice (Aplin, Howe, and Juliano 1999; Hynes 2002).

2.3.2. Le cytosquelette (CSQ)

Les cellules sont dotées d'une structure spatiale avec un très haut niveau d'organisation et de propriétés mécaniques spécifiques qui dépendent d'un système exceptionnel de filaments (polymères) que l'on appelle le cytosquelette (CSQ). Les cellules ont en commun trois types de filaments qui jouent un rôle fondamental dans leur organisation spatiale et leurs propriétés mécaniques et fonctionnelles. Les filaments intermédiaires fournissent par exemple la résistance mécanique aux forces de cisaillement. Les microtubules déterminent la position des organites dans le cytoplasme et dirigent le transport intracellulaire. Enfin, le réseau des filaments d'actine détermine le tonus cellulaire ou tension interne ainsi que les capacités d'étalement et de contraction qui sont nécessaires à la locomotion de la cellule.

Il est important de noter que le CSQ est le siège de remaniements permanents qui sont dus aux processus de polymérisation et dépolymérisation continus qui caractérisent les 3 types

de filaments. Les composants moléculaires du CSQ existent en effet sous trois états différents: des monomères libres, des polymères instables et des polymères stables organisés sous forme de filaments. Ce sont ces derniers qui, une fois assemblés en réseaux ou en fibres par des protéines de liaison, jouent le rôle de véritable squelette cellulaire, car ils conditionnent la forme et la fonction de la cellule mais structurent aussi ses extensions telles que les filopodes, les lamellipodes, les microvillosités, les cils et les flagelles. Quant aux polymères instables, ils sont responsables de plusieurs phénomènes physiologiques tels que la contraction musculaire, la migration cellulaire au cours de la vie embryonnaire, le déplacement des organites dans le cytosol et les mouvements de la membrane plasmique (endocytose, exocytose, pseudopodes, radeaux lipidiques...).

2.3.2.1. Les microtubules

Les microtubules possèdent une structure creuse de 24nm de diamètre. Ils sont présents dans toutes les cellules eucaryotes à l'exception des érythrocytes. Les microtubules sont formés de 13 protofilaments de tubuline-F. La tubuline est constituée de deux sous-unités α et β (55kDa chacune) qui peuvent s'associer pour former un dimère de tubuline G. Ce dimère finit par se polymériser de façon polarisée en hydrolysant du GTP (Figure 5). Cependant, une forte concentration de Ca^{2+} peut entraîner la dépolymérisation du microtubule.

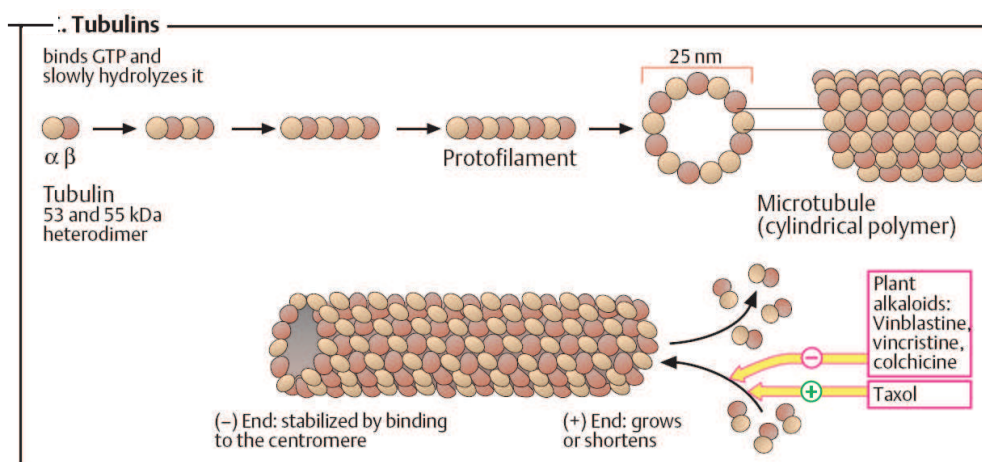


Figure 5 : Schéma des processus de polymérisation et dépolymérisation des microtubules
(Modifiée d'après Koolman, Röhm et al, 2005)

Les microtubules sont des structures très dynamiques (Valiron, Caudron, and Job 2001). En effet, ils oscillent régulièrement entre des phases dites d' « élongation » et des phases dites de « raccourcissement ». L'élongation a lieu aux deux extrémités du polymère mais néanmoins plus rapide à l'extrémité plus. Pour étayer ce propos, il a été montré par microscopie électronique que les extrémités en cours d'élongation présentent des protofilaments plus longs que d'autres. A l'inverse, lors du raccourcissement, les extrémités apparaissent beaucoup plus étalées et ont tendance à se recourber (Kirschner et al. 1974). Les microtubules peuvent également subir une élongation et un raccourcissement dans le même temps : c'est le phénomène de « treadmilling » ou tapis roulant. Les microtubules sont aussi sujet au phénomène d'instabilité dynamique (Mitchison and Kirschner 1984). Ce phénomène se définit par des périodes d'élongation jusqu'à une certaine longueur, puis les microtubules atteignent un point dit « critique » se traduisant par une forte dépolymérisation qui est ensuite rectifiée par la reprise de polymérisation.

Concernant la stabilité des microtubules, la présence de GDP ou de GTP au niveau des extrémités peuvent y contribuer. En effet, la présence en nombre de molécules de GDP signifie que le microtubule se trouve en phase de raccourcissement ou que l'incorporation de tubuline est faible. La formation de GDP entraîne un affaiblissement des liaisons entre le dimère et le polymère. A contrario, la richesse en GTP traduit une augmentation de l'incorporation des sous unités de tubuline, ce qui participe à la stabilisation du microtubule. Il apparaît comme protégé par une « GTP cap » (Erickson and O'Brien 1992). Les polymères de tubuline peuvent être également associés à des protéines motrices appelées MAP pour Microtubules Associated Protein telles que la dynéine, la nexine ou la kinésine. Certaines de ces protéines participent à la stabilisation du microtubule alors que d'autres permettent le transport et le déplacement des vésicules et des organites au sein de la cellule, le long de ces microtubules. Concernant leurs rôles, les microtubules participent au maintien

de l'intégrité cellulaire et interviennent également dans des phénomènes tels que la migration des chromosomes au cours de la mitose, le déplacement des cellules pourvues de flagelles mais aussi le déplacement des vésicules et des organites.

2.3.2.2. Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires, quant à eux, forment un réseau de polymères fibreux. Ils sont présents à la fois dans le cytoplasme et dans le nucléoplasme.

Dans le cytosol, les filaments intermédiaires forment un réseau fibreux et résistant qui s'étend de l'enveloppe nucléaire jusqu'à la membrane plasmique. Dans le nucléoplasme, ils forment plutôt un réseau périphérique relié à la face interne de l'enveloppe nucléaire par le biais de récepteurs. Ils possèdent un diamètre variant de 8 à 10 nm et sont formés de protofilaments. Chaque protofilament est formé d'unités tétramériques (Figure 6), formées chacune, comme leur nom l'indique, de 4 monomères fibreux. Il existe 4 familles de filaments intermédiaires qui dépendent du type cellulaire dans lequel ils peuvent être exprimés (Figure 6) :

- les lamines (A/C, $\beta 1$ et $\beta 2$) qui forment le réseau périphérique dans le noyau,
- la vimentine, la desmine, la GFAP (pour Glial Fibrillary Acidic Protein) : la vimentine est caractéristique des cellules d'origine mésoblastique épithéliale et non épithéliale, la desmine est caractéristique des cellules musculaires et la GFAP des cellules astrocytaires/gliales,
- les cytokératines (kératine acide et kératine basique) présentes dans les cellules épithéliales uniquement,
- les neurofilaments (L, M et H) spécifiques des neurones du système nerveux central.

Certains types cellulaires n'exprimeront qu'un seul type de filaments intermédiaires alors que d'autres peuvent en exprimer plusieurs. Par exemple, les kératines sont exprimées dans les cellules épithéliales. La desmine se retrouve dans les cellules musculaires, la nestine est

exprimée par les cellules neurales, tandis que d'autres types de protéines fibreuses comme la vimentine peuvent se retrouver dans différents types cellulaires (cellules mésenchymales, endothéliales, hématopoïétiques,...). De plus l'assemblage des filaments intermédiaires peut être individuel ou multiple et peuvent former des hétérofilaments.

Ainsi, leur présence est avérée au niveau des sites soumis à de grandes contraintes mécaniques, ce qui laisse supposer que les filaments intermédiaires offrent une grande capacité à résister mécaniquement à la déformation cellulaire. Les filaments intermédiaires sont des structures dynamiques qui se réorganisent au cours de nombreux processus biologiques tels que la mitose ou la migration (Herrmann and Aebi 2000).

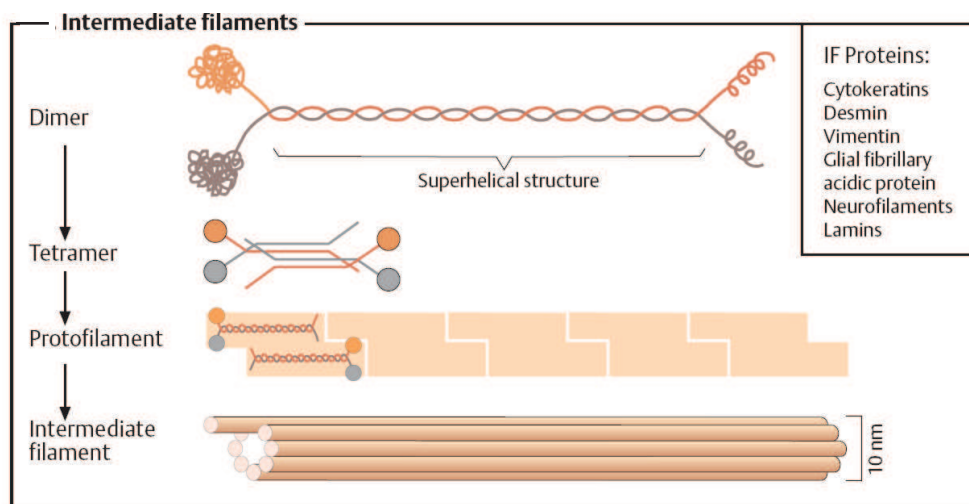


Figure 6 : Schéma des processus de polymérisation et dépolymérisation des filaments intermédiaires
(Modifiée d'après Koolman, Röhme et al, 2005)

2.3.2.3. Les filaments d'actine

Les filaments d'actine, également appelés microfilaments, sont de fines structures allongées qui ont un diamètre de 7 nm et qui résultent de la polymérisation de protéines globulaires d'actine G (Figure 7). En effet, l'actine se présente soit sous une forme soluble non polymérisée (actine G), soit sous une forme polymérisée en longs filaments fins d'actine F (Figure 7). Ces microfilaments d'actine sont constitués de deux chaînes enroulées en hélice :

il s'agit d'une structure polarisée instable. La dépolymérisation nécessite l'hydrolyse de l'ATP qui est associé à l'actine (Figure 7) (Svitkina 2018).

Il existe plusieurs types de protéines qui sont associées à l'actine F et permettent de contrôler les phénomènes de polymérisation/dépolymérisation. Par exemple, la thymosine bloque la polymérisation alors que la profiline la favorise. La tropomyosine est connue pour stabiliser les microfilaments. Ces microfilaments sont capables d'intervenir dans différentes sous-structures cellulaires. Notamment, le cortex cellulaire est un réseau de microfilaments d'actine situé sous la membrane plasmique auquel sont associés de nombreux points d'ancrage qui permettent alternativement l'expansion et la rétraction de la membrane plasmique et ainsi, le déplacement de la cellule sur son support (Carlier 1991; Féréol 2005; Pollard 1990).

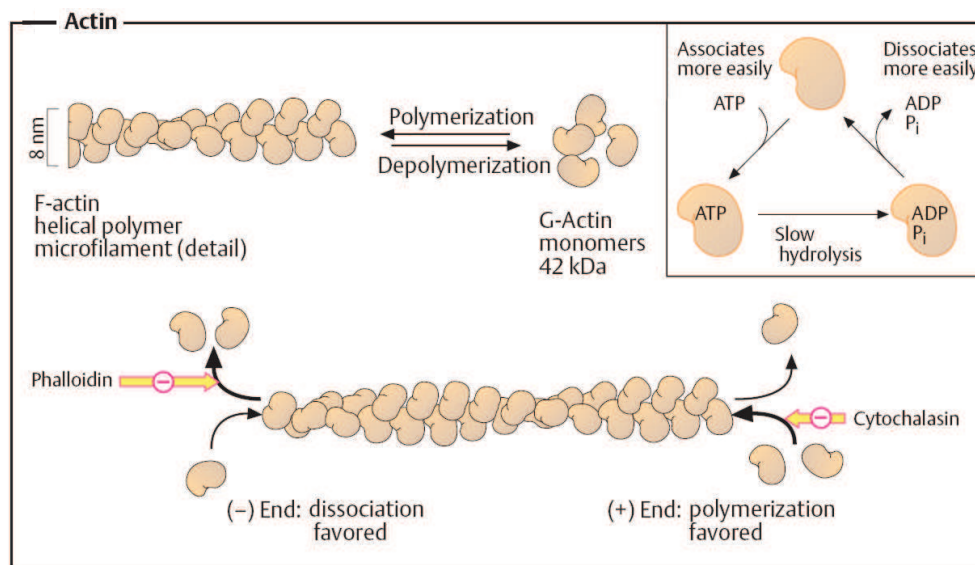


Figure 7 : Schéma des processus de polymérisation et dépolymérisation de l'actine

(Modifiée d'après Koolman, Röhm et al, 2005)

Le réseau de filaments d'actine interagit avec les autres réseaux décrits précédemment mais il est responsable - en association avec les moteurs acto-myosine présents à des degrés variables dans toutes les cellules - d'une tension interne au sein du CSQ (Harris, Bamburg, and Weeds 1980; Heidemann and Buxbaum 1990). Cette propriété, intrinsèquement liée à la

rigidité cellulaire, a été montré pour la première fois par l'équipe de Harris qui a cultivé des fibroblastes sur un gel déformable (silicone) et a observé que celui-ci se plissait sous la cellule à partir des zones d'adhésion, indiquant l'existence d'une tension en permanence dirigée vers l'intérieur de la cellule et responsable de cette déformation (Harris et al. 1980).

Il existe en outre un lien étroit entre la structure du CSQ et la forme de la cellule qu'Ingber, grâce à l'exploration d'un modèle architectural de tenségrité, s'est attaché à mettre en évidence tout comme le réarrangement spatial des filaments du cytosquelette qui permet les grandes déformations cellulaires (Ingber 1997). Enfin, les filaments du CSQ se réorganisent et génèrent des forces de protrusion à l'avant du lamellipode et des forces de traction au niveau des sites d'adhésion, permettant notamment l'étalement et le détachement du corps cellulaire entraînant la migration de la cellule sur son substrat. Selon cet auteur, les propriétés exceptionnelles du CSQ sont dues à son organisation multi-échelle et multi-compartmentée même si de nombreuses questions demandent à être éclaircies comme par exemple la contribution propre de chaque échelle et de chaque compartiment par rapport aux nombreuses fonctions du CSQ. Il est néanmoins admis que cette organisation spatiale multi-échelle du CSQ revêt une importance fondamentale pour toutes les grandes fonctions cellulaires (Cau et al. 2001).

Les trois composants du CSQ décrits ci-dessus sont représentés au sein d'une cellule épithéliale en figure 8.

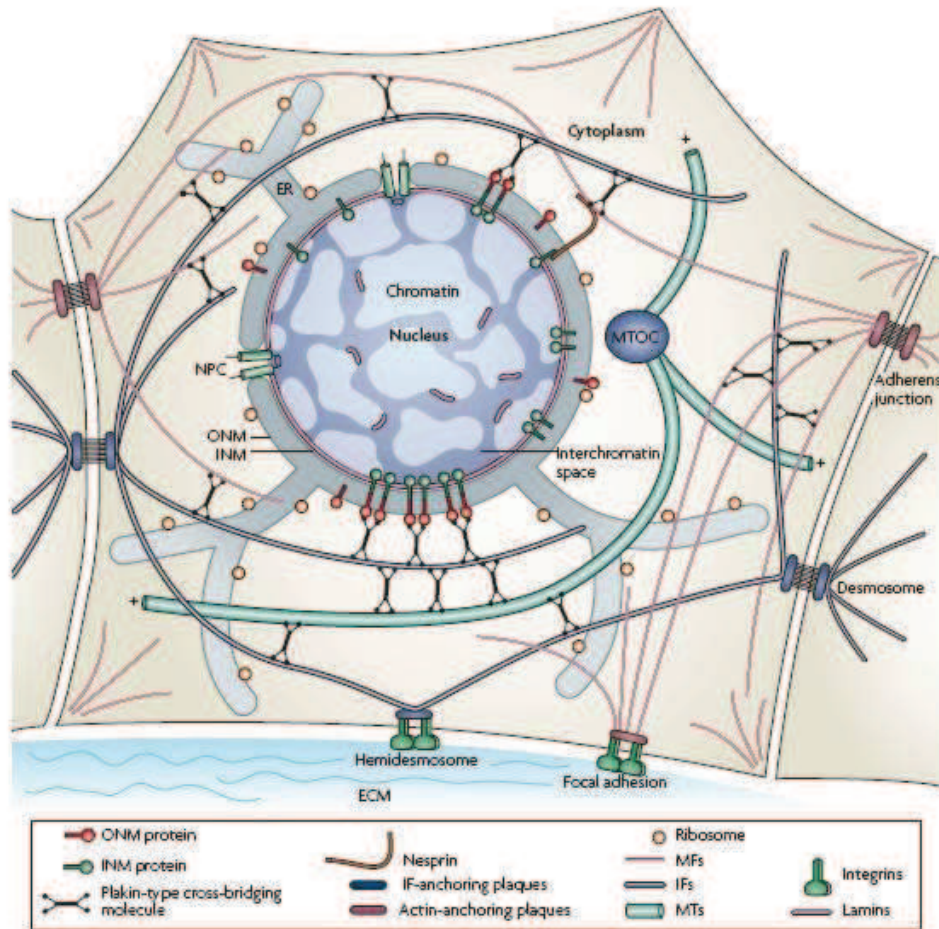


Figure 8 : Schéma de l'organisation du cytosquelette dans une cellule épithéliale

Les trois types de filaments (microfilaments d'actine (MFs, rouge), microtubules (MTs, vert), filaments intermédiaires (Ifs, bleu)) y sont représentés avec les complexes moléculaires associés qui génèrent de multiples interactions entre eux. Les protéines transmembranaires impliquées dans les contacts cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire (ECM) sont respectivement les cadhérines desmosomales et les intégrines. Les protéines de la membrane interne du noyau (INM) seraient liées à celles de la membrane externe du noyau (ONM) et formeraient ainsi un continuum mécanique liant la matrice extracellulaire (ECM) à la chromatine. ER = réticulum endoplasmique ; MTOC = centre organisateur des microtubules ; NPC = complexe pore nucléaire. (D'après Herrmann et al. 2007)

2.3.3. Structures d'adhésion intégrine-dépendantes

Comme il a été dit précédemment, les cellules interagissent avec la MEC *via* des sites ponctuels spécialisés. Ces interactions se font par l'intermédiaire de certains protéoglycanes du glycocalyx (feutrage microfibrillaire associé à la membrane plasmique externe de la cellule), mais aussi et surtout par l'intermédiaire d'une famille de récepteurs transmembranaires appelés intégrines, qui se lient à la plupart des molécules de la MEC tout

en restant en liaison physique constante avec les filaments d'actine du cytosquelette *via* une plateforme multi-protéique sous-membranaire.

Les intégrines – hétérodimères $\alpha\beta$ associés (figure 9B) – forment une famille de glycoprotéines comportant plus d'une vingtaine de membres (Humphries, Byron, and Humphries 2006).

De nombreuses protéines matricielles se lient à plusieurs intégrines. Ainsi, au moins 7 intégrines fixent la fibronectine ($\alpha3$, $\alpha4$, $\alpha5$, $\alpha7$, αV , $\beta1$, $\beta3$, $\beta6$) et 5 intégrines fixent la laminine ($\alpha1$, $\alpha2$, $\alpha3$, $\alpha6$, $\beta4$).

Concernant leur structure, les sous-unités α et β sont des glycoprotéines transmembranaires (Figure 9A). Les 2 chaînes sont associées par des liaisons non covalentes. Chaque hétérodimère ou chaîne se présente avec trois parties distinctes :

- Une partie extracellulaire importante, qui se lie à certains sites spécifiques des protéines de la MEC (fibronectine, collagènes, laminine...);
- Une partie transmembranaire enchâssée dans la membrane ;
- Une partie intracellulaire, qui *via* des protéines d'adaptation, se lie aux microfilaments d'actine du cytosquelette.

Le domaine extracellulaire de la sous-unité α possède des sites de liaison pour le Ca^{2+} ou le Mg^{2+} , selon l'intégrine. Le domaine cytosolique -COOH terminal de la sous-unité β contient une région capable de se lier à des protéines du cytosquelette (taline, vinculine, α -actinine,...), permettant ainsi des interactions avec les filaments d'actine. Ainsi, comme leur appellation le suggère, les intégrines sont des récepteurs, bi-phasiques, qui permettent d'intégrer et de connecter plusieurs types de composants dans un volume réduit comme les polymères intracellulaires (microfilaments d'actine) aux polymères extracellulaires (les composants fibrillaires de la MEC), autorisant des fonctions cellulaires plus ou moins complexes comme la division, la migration, la réparation et l'invasion cellulaires.

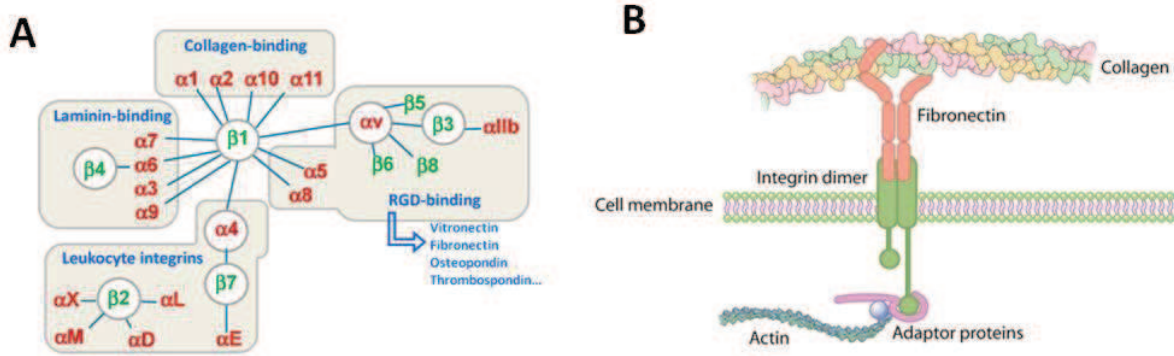


Figure 9 : (A) Schéma simplifié de l'intégrine (vert) liant à la fois les éléments de la MEC et le cytosquelette d'actine (bleu) *via* des protéines adaptatrices (violet). (B) Association des différentes sous-unités α (rouge) et β (vert) des intégrines et leurs ligands spécifiques (bleu).

Les intégrines forment exclusivement des liens non-covalents qui permettent une adaptation dynamique à l'environnement et sont à la source de la sensibilité cellulaire à cet environnement.

Les intégrines existent sous deux états, correspondant à des bas et hauts niveaux d'affinité avec le ligand (Richard O. Hynes 2002). Lorsque l'intégrine se trouve dans un état de faible affinité, les ectodomains des sous-unités α et β sont en configuration repliée (association latérale des domaines cytoplasmiques et transmembranaires). À l'inverse, lorsque l'intégrine est dans un état activé, c'est-à-dire ayant un niveau de haute affinité, la partie distale des deux ectodomains des deux sous-unités passe en configuration dépliée, ce qui permet la libération des domaines cytoplasmiques et transmembranaires qui étaient auparavant cachés (sites cryptiques) (Xiao et al. 2004). Ainsi, l'activation de l'intégrine induit la liaison du domaine cytoplasmique de chaîne β de l'intégrine au CSQ d'actine *via* des protéines adaptatrices telle que la taline et la kindline (Critchley 2004; Liddington and Ginsberg 2002) (figure 10). La taline est recrutée et activée par un lipide- PI(4,5)P2 et le domaine cytoplasmique de l'intégrine va favoriser l'activation de l'intégrine (dépliement) et la liaison avec le ligand matriciel mobilisé. Cette interaction va entraîner le recrutement de nouveaux complexes taline-PI(4,5)P2 aboutissant à la formation d'un complexe de préadhésion intégrine-dépendant (complexe focal). Ainsi, une des voies du renforcement du site d'adhésion initial

(Cluzel et al. 2005) passe au travers des mécanismes d'assemblage des intégrines ou « clustering » qui nécessite d'abord l'activation des intégrines (haute affinité) puis l'association latérale des intégrines entre elles et enfin une stabilisation des clusters d'intégrines qui suppose une immobilisation des ligands.

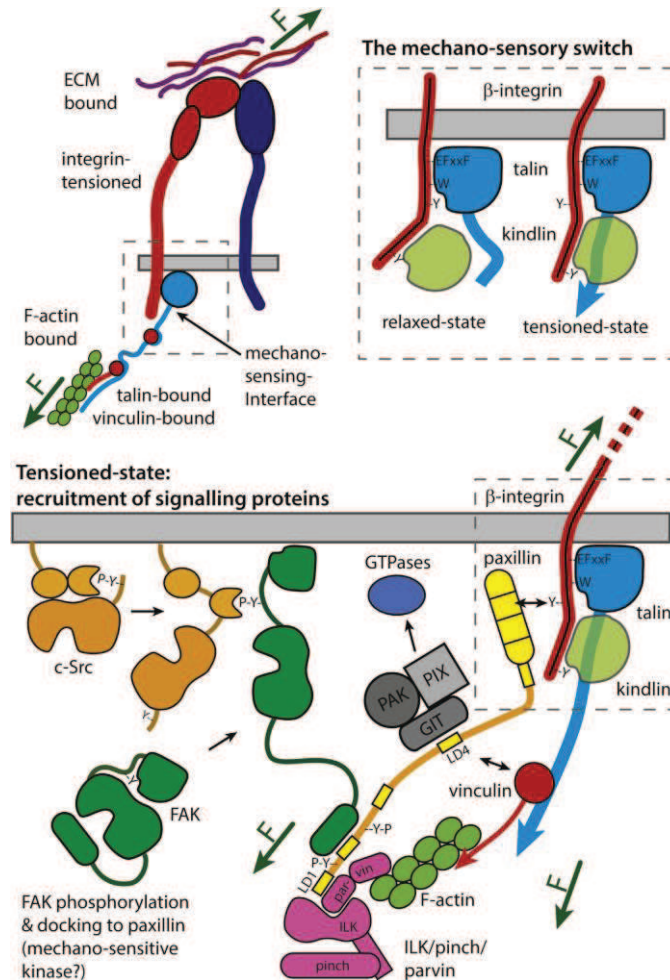


Figure 10 : Modèle de recrutement mécano-régulé des protéines de structure et de signalisation au niveau des adhésions focales

La taline et la kindline orchestrent le recrutement des protéines adaptatrices. Au niveau de la taline liée à la chaîne β de l'intégrine, le recrutement est dépendant de la tension appliquée sur les intégrines (flèches vertes, panneaux du haut). Lorsque la taline est associée aux intégrines, les résidus tyrosines de la chaîne β de l'intégrine ne sont plus nécessaires pour la stabilisation de la taline et pour le regroupement des intégrines. Le complexe taline/kindline/intégrine libère ainsi une zone Tyr pour l'association de la paxilline, protéine de structure clé, permettant le recrutement de FAK, c-Src, ainsi que d'autres complexes impliqués dans la régulation des Rho-GTPases. La phosphorylation de la paxilline régule l'association avec FAK ; l'activation localisée de la kinase FAK est essentielle pour le renouvellement des adhésions lors de la rétraction de l'arrière de la cellule (panneau du bas).

Il existe des modes alternatifs d'activation des intégrines notamment l'ajout d'ions manganèse Mn^{2+} qui augmente le niveau de clustering des intégrines pour les raisons

indiquées plus haut (Cluzel et al. 2005). Cette régulation allostérique de l'affinité, tout à fait caractéristique de la fonction des intégrines, est notamment impliquée de manière physiologique dans la stimulation de l'adhérence des cellules. Ces changements de conformation sont impliqués dans la transmission du message à l'intérieur de la cellule lors de la liaison au ligand (outside-in) ou à l'inverse dans le contrôle, par les voies de signalisation intracellulaires, de l'affinité du récepteur (inside-out). Ainsi, en réponse à la liaison aux éléments de la MEC, un changement conformationnel s'engage, ce qui permet le recrutement de protéines cytoplasmiques sous-membranaires dans un complexe moléculaire multimodal appelé « adhésome » qui permettra une connexion avec le complexe acto-myosine, moteur contractile de la cellule (Hynes 2002). À ce jour, il est proposé une description en quatre modules de cette interface : (i) le module récepteur élaboré à partir d'un groupement d'intégrines clusterisées à la membrane, (ii) le module récepteur impliqué dans l'activation de la polymérisation de l'actine du côté intracellulaire et sous-membranaire, (iii) le module de liaison à l'actine F et (iv) le module de signalisation. Selon l'état d'assemblage de ces quatre modules, la maturation de l'adhérence est plus ou moins avancée. Les différents sites d'adhésion rencontrés et les différentes étapes de création de sites d'adhésion sont montrés dans les figures 11 et 12.

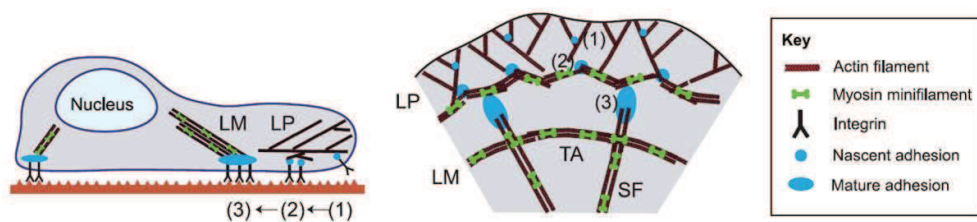


Figure 11 : Organisation de l'actine et de l'adhésion à différents stades de maturation des sites d'adhésion

LP = lamellipodium ; LM = lamellum ; SF = fibres de stress ; TA = arcs transverses.

(Modifiée d'après Schwartz et Gardel, 2012)

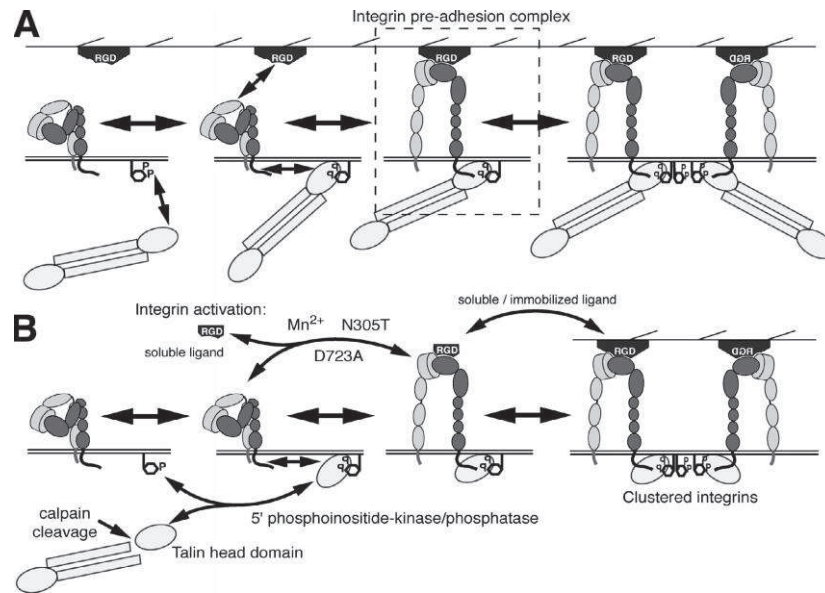


Figure 12 : (A) Modèle d'adhésion initiale avec reconnaissance initiale du ligand, activation puis regroupement (clustering) des intégrines grâce aux complexes PI(4,5)P2 situés sous la membrane plasmique. (B) Différents modes alternatifs d'activation des intégrines et du clustering notamment en présence de manganèse (Modifiée d'après Cluzel et al, 2005)

2.3.4. Rôle de la force dans la stabilisation des structures d'adhésion

Les sites d'adhésion, qu'ils soient matures ou en phase de maturation, agissent comme des mécanosenseurs permettant une adaptation de leur performance (évaluée en termes de force de rupture par exemple) à l'environnement mécanique (figure 13).

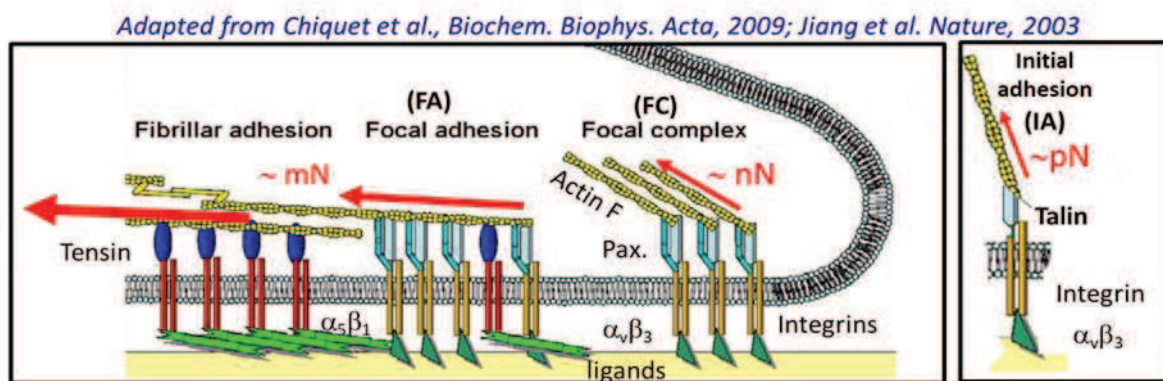


Figure 13 : Représentation schématique des contacts d'adhésion à la matrice extracellulaire communément trouvés dans la cellule adhérente sur un substrat rigide en 2 dimensions

Le renforcement des sites d'adhésion nouvellement formés est un processus très dynamique (stochastique) qui requiert une phase de stabilisation du lien entre le CSQ intracellulaire et

l'environnement extracellulaire comme rappelé dans le paragraphe ci-dessus. Il a été montré que dans ce processus, les adhésions transitoires peuvent être renforcées dans certaines conditions qui restent à définir mais dépendent notamment du mode d'application de la force (loading rate) (Balaban et al. 2001; Choquet, Felsenfeld, and Sheetz 1997; Sheetz, Felsenfeld, and Galbraith 1998). Ainsi, les sites d'adhésion passent par plusieurs phases de développement. Comme nous l'avons vu juste avant, les adhésions initiales sont des structures relativement simples, définissant un lien faible et qui cède si la force appliquée dépasse le picoNewton. Une adhésion initiale peut également se renforcer pour donner un complexe focal qui lui, contient un nombre plus important de constituants dont la vinculine pouvant supporter des forces jusqu'au nanoNewton (Bruinsma 2005). Un site d'adhésion focale peut supporter des forces appliquées jusqu'au milliNewton.

Le système de force mécanique dans lequel est pris le site d'adhésion joue un rôle déterminant dans la régulation des sites d'adhésion. En effet, si c'est d'abord la force de traction (intracellulaire) appliquée par les moteurs moléculaires de la cellule (myosine) sur les filaments d'actine qui stimule le développement de ces sites d'adhésion, une part importante doit être imputée aux forces extérieures (extracellulaires) (Riveline et al. 2001). À partir d'un certain stade de maturation, l'adaptation à la force appliquée (traction interne ou force extérieure) s'effectue par la taille du site d'adhésion qui est réversible : elle peut augmenter ou diminuer en fonction de la force appliquée (figure 14) (Geiger and Bershadsky 2001). Les sites adhésifs les plus précoces sont appelés « complexes focaux » (250 nm^2). Ils se localisent à la périphérie cellulaire au niveau du lamellipodium. La traction qu'impose le moteur acto-myosine sur cette structure adhésive entraîne leur maturation en une structure plus large appelée « adhésion focale » (quelques μm^2) associée aux fibres tendues d'actine au niveau du lamellum (figure 11).

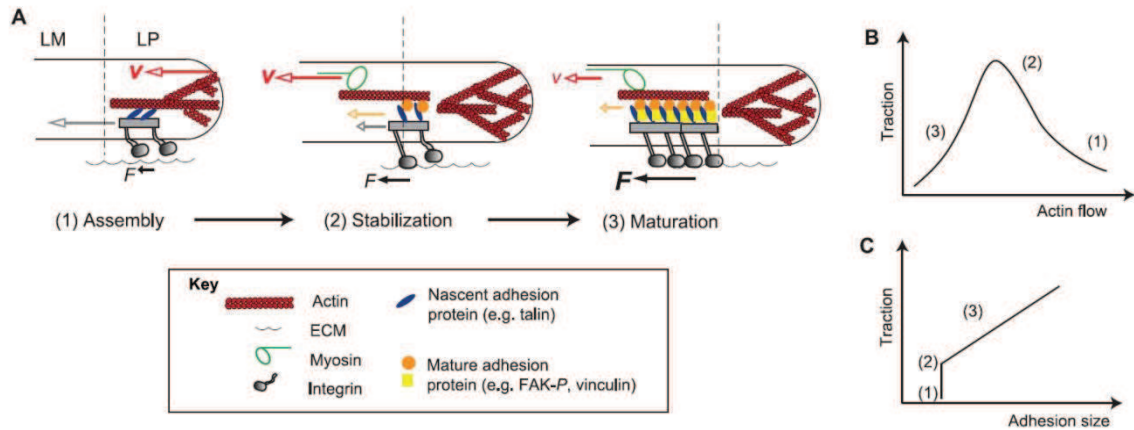


Figure 14 : Corrélation entre le flux rétrograde, la taille des adhésions et la force de traction durant l'assemblage des sites d'adhésion. (D'après Schwartz et Gardel, 2012)

Le mécanisme de réponse à une force ou la sensibilité cellulaire à la rigidité mécanique du substrat ou de la MEC sont de même nature. La force de réaction du substrat en réponse à la force de traction appliquée étant proportionnelle au module élastique ou rigidité locale du substrat, la maturation des sites d'adhésion sera renforcée sur des substrats rigides (Bruinsma 2005; Féréol et al. 2009). Si les adhésions initiales ne supportent que des efforts minimes (quelques pN), leur renforcement qui nécessite une maturation vers un site d'adhésion plus complexe et leur persistance au travers de contacts matures nécessitent le maintien de forces mécaniques représentées par l'existence d'une tension intracellulaire permanente.

Dans le cas de la migration cellulaire sur des substrats présentant des différences (gradients) de rigidité, les cellules vont migrer vers la partie rigide du substrat (durotaxis) pour s'y stabiliser par une adhésion renforcée (phénomène de mécanotaxis) (Ueki and Kidoaki 2015). D'une façon générale, parce que les propriétés mécaniques extracellulaires (comme la rigidité du substrat) et intracellulaire (comme la tension interne) conditionnent le développement des sites d'adhésion, les liaisons « intégrine-ligand » faibles car non covalentes apparaissent comme le lieu privilégié de la mécanotransduction initiale (membranaire) (Bruinsma 2005; Féréol et al. 2009). Cette mécanosensibilité attribuées aux systèmes intégrine-ligand est relayée par de nombreux autres systèmes moléculaires de type protéine-protéine qui vont

participer à des niveaux différents et à des échelles différentes, à la mécanotransduction du signal mécanique en signal chimique pour finalement aboutir au noyau qui exprime lui-aussi une sensibilité à la déformation (Anselme et al. 2018).

Les récents travaux de Ning Wang ont révélé qu'une force appliquée localement au niveau des intégrines permettait l'activation des protéines Src et Rac1 à proximité du lieu d'application de la force mais aussi à distance. Il a été montré que la force appliquée se concentre sur les fibres de stress et se propage à distance dans le cytoplasme pour activer directement les protéines Src et Rac1. L'activation de ces deux protéines se caractérise par des actions à distances (plusieurs dizaines de μm) le long de la membrane plasmique en utilisant les propriétés mécaniques spécifiques des éléments du cytosquelette et les capacités de mécanotransduction permises par les couplages protéines de liaison-CSQ, comme par exemple la phosphorylation de p130Cas par les kinases Src ou l'activation de la kinase d'adhérence focale (FAK). Ces mécanismes suggèrent que la mécanotransduction n'est pas seulement un mécanisme localisé à la membrane mais également un mécanisme spatial se développant dans l'ensemble de la cellule (Wang 2017).

2.4. Concepts mécanobiologiques essentiels à l'étude de la réponse cellulaire

2.4.1. La mécanotransduction

Les fonctions biologiques des cellules vivantes et des tissus ont longtemps été étudiées au travers de la seule influence de molécules solubles individuelles comme les facteurs de croissance, les cytokines, et les molécules impliquées dans le chimiotactisme. Cependant, des études réalisées au cours des deux dernières décennies ont démontré que le microenvironnement cellulaire (notamment les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire) et les forces physiques intra ou extracellulaires jouent un rôle essentiel en contrôlant et en adaptant le comportement cellulaire à cet environnement (Discher, Janmey,

and Wang 2005; Vogel and Sheetz 2006). Ces mécanismes, qui font pour la plupart l'objet d'études récentes ou encore en cours, ont été mis en évidence dans les conditions physiologiques et physiopathologiques les plus variées allant du développement embryonnaire (Wozniak and Chen 2009) à la physiologie adulte (Brown et al. 1998), en passant par les pathologies les plus variées depuis les maladies cardiovasculaires ou pulmonaires jusqu'au cancer (DuFort, Paszek, and Weaver 2011). Pour permettre une réponse biologique adaptée à ces contraintes physiques et mécaniques, les cellules doivent convertir les signaux physiques en processus chimiques, aboutissant le cas échéant à des changements au niveau des gènes exprimés (Hoffman, Grashoff, and Schwartz 2011). Cette conversion des signaux mécaniques en signaux chimiques, voire en expression génique, est appelée mécanotransduction. La mécanotransduction se définit donc comme une signalisation mécano-chimique qui permet à la cellule de convertir un signal mécanique reçu au niveau de sa membrane en réponse biologique *via* un signal biochimique approprié. Dans le contexte très général des cellules adhérentes, la mécanotransduction est intimement liée aux sites d'adhésion et au couplage de ces sites avec les éléments moteurs du CSQ (comme l'actomyosine) (Geiger, Spatz, and Bershadsky 2009). En dépit des progrès réalisés dans la caractérisation de la mécanotransduction, de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans la mécanotransduction restent à élucider. Leur étude s'avère importante dans les conditions où s'amorcent des perturbations responsables de déséquilibres pouvant remettre en cause les fonctions cellulaires normales. Nous expliquons par la suite les éléments cellulaires et moléculaires – en partant de la MEC et jusqu'au noyau – qu'il nous semble important d'évoquer dans le cadre de cette thèse.

Nous nous limiterons toutefois aux effets de transduction mécano-chimique médiés par les intégrines sans aborder la transduction mécano-électrique au travers des canaux ioniques mécanosensibles de la membrane plasmique (Arnadottir and Chalfie 2010).

○ *Le rôle clé des intégrines dans la génération de forces*

À la différence des cellules circulantes, la plupart des cellules ont besoin d'être attachées à la structure polymérique constituée par la MEC pour fonctionner correctement au sein d'un tissu. Les intégrines représentent une interface privilégiée pour l'attachement des cellules à la MEC. En plus du pouvoir adhésif que représente les intégrines dans leur spécificité de liaison avec les éléments de la MEC, elles permettent aussi l'application de les forces physiques de traction sur la MEC pouvant entraîner le dépliement de la fibronectine (Smith et al. 2007) et moduler les interactions de celle-ci avec le collagène entraînant un remodelage mécanique de la MEC, processus appelée fibrillogenèse (Kubow et al. 2015). La MEC se trouve ainsi mise en tension, ce qui génère des forces pouvant être ressenties par les cellules voisines en interaction avec la MEC (Wang et al. 2014). Ainsi, il a été montré que les forces exercées sur les intégrines isolées varient de quelques pN à plusieurs dizaines de pN (Arnadottir and Chalfie 2010; Jiang et al. 2003). Ces valeurs font l'objet de discussions car elles dépendent non seulement de la variabilité intercellulaire (intrinsèque à la biologie) mais aussi des conditions dans lesquelles elles sont mesurées, comme nous le verrons dans la suite de ce travail. Elles sont en tout cas très inférieures aux forces intracellulaires générées, y compris dans les cellules non musculaire, impliquant les moteurs moléculaires comme la myosine II. Il faut noter que la myosine II est présente dans toutes les cellules non musculaires afin de contribuer à la mobilité cellulaire, la migration, l'adhésion et la division cellulaire. Ainsi, les molécules de myosine II, une fois alignées le long des filaments d'actine, permettent d'atteindre des forces pouvant aller jusqu'au nN (Balaban et al. 2001). La seule solution permettant aux sites d'adhésion de résister à ces efforts est d'associer les intégrines sous forme de clusters qui composent les sites d'adhésion matures de type adhésion focale. Ces intégrines travaillent collectivement et vont pouvoir contrecarrer les forces intracellulaires ou extracellulaires exercées. L'efficacité de ce mécanisme d'association a été peu considérée

dans la littérature en raison des difficultés théoriques et expérimentales sous-jacentes à cette approche, qui fait d'ailleurs l'objet du présent travail. En particulier, une étude théorique visant à décrire le comportement de liens collectifs conduite au laboratoire (Isabey et al. 2013) a montré que l'efficacité de l'association dépendait fortement de la configuration des liens qui peut être « parallèle » ou « zipper » et finalement de la distribution (respectivement homogène ou hétérogène) de la force sur les clusters d'intégrines. Nous pouvons donc penser que la force de rupture d'un lien collectif va dépendre de la façon dont la force d'étirement est dirigée (voir section Matériel et Méthode). La direction et la distribution de la force appliquée vont dépendre fortement de l'organisation de la structure d'actine autant dans le lamellipodium (lieu des sites d'adhésion naissants) que dans le corps cellulaire ou lamellum (lieu des sites d'adhésion mature) (Schwartz and Gardel 2012). Les organisations différentes de l'actine et de l'adhésion dans le lamellipodium et dans le corps cellulaire vont donc conduire à des relations « forces de traction – organisation adhésive » différentes. Une question fondamentale est posée sur la façon dont ces forces appliquées localement de façon spécifique, interviennent dans les processus de mécanotransduction. Une autre question fondamentale concerne le nombre et la façon dont les intégrines travaillent en association. Nous savons qu'une adhésion focale (FA) se compose de centaines d'intégrines et d'autres protéines connectées à des centaines de filaments d'actine (F-actine) et de myosine II, de telle sorte qu'une simple adhésion focale peut supporter des forces de quelques dizaines de nN susceptibles d'être propagées *via* le CSQ sur des distances de quelques μm à quelques dizaines de μm (Wang 2017). Les données sur le nombre d'intégrines associées (clusterisées) dans les sites d'adhésion en cours de maturation sont beaucoup plus rares. Ceci est à relier au peu d'études faites sur le rôle de la clusterisation dans le renforcement des sites d'adhésion initiaux. Nous constatons en effet que le seul renforcement de la tension moléculaires au sein des intégrines individuelles est trop limité (40 pN avant clustering, > 54 pN après clustering)

(Wang et al. 2015) et ne serait pas suffisant pour supporter les forces appliquées de plusieurs dizaines de nN et que, de ce fait, l'association des intégrines (clustering) est un mécanisme essentiel pour le renforcement des adhésions initiales. D'une manière générale, la force joue un rôle positif ou négatif sur la stabilité des liens à l'interface cellule-environnement, démontrant ainsi l'interdépendance entre biochimie et mécanique. Ces différences fonctionnelles dans le répertoire des intégrines sont décrites : par exemple, la liaison des intégrines $\alpha v \beta 3$ avec la MEC de fibronectine résiste moins face à la force appliquée que celle avec les intégrine $\alpha 5 \beta 1$, mais elle joue un rôle régulateur en initiant la transduction du signal mécano-chimique (Roca-Cusachs et al. 2009).

○ *La mécanotransduction dans le cytoplasme*

Pour prendre en compte l'impact de la MEC sur l'organisation et la fonction des cellules et des tissus (Bissell, Glenn Hall, and Parry 1982; Ingber, Madri, and Jamieson 1981), Donald Ingber a été le premier à proposer à la fin des années 1980 le modèle de tenségrité cellulaire pour sa capacité à expliquer comment les cellules vivantes intègrent l'ensemble des tensions perçues localement au niveau des sites d'adhésion et les transforment en réponse cellulaire globale (Ingber 2004; Ingber, Wang, and Stamenović 2014). Ce modèle mécanique considère que l'intégrité de la tension est préservée à tout moment dans le CSQ par l'équilibre permanent des tensions (F-actine) et des compressions (microtubules) entre les seuls éléments de la structure cellulaire (Stamenović et al. 1996; Wendling, Oddou, and Isabey 1999) puis progressivement en intégrant l'environnement extracellulaire dans cet équilibre avec un couplage mécanique entre la cellule, le cytosquelette et le noyau (Stamenović et al. 2002) (figure 15).

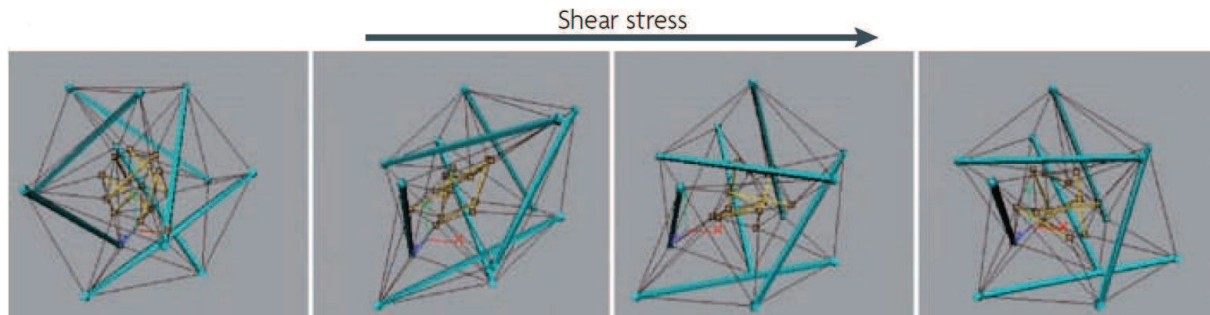


Figure 15 : Modèle de tensegrité cellulaire

Simulations numériques montrant la déformation d'une structure de tensegrité. La structure est liée au substrat plan par deux points (1^{ère} image figure 15), l'application d'une contrainte de cisaillement orientée comme indiquée par la flèche modifie la structure qui se réorganise (2^{ème} et 3^{ème} images de la figure 15). (D'après Wang et al, 2009).

Ce modèle de tensegrité cellulaire a été dès le départ corroboré par plusieurs résultats expérimentaux (Wendling et al. 2000). L'extension de ce modèle à l'ensemble « cellule et environnement » a été initialement validée sur les cellules musculaires lisses des voies aériennes humaines (CMLV) par Wang et al. (Wang et al. 2002). Ce groupe a montré que les éléments en compression du CSQ ne contrebalançaient qu'une partie minoritaire de la tension interne (c'est-à-dire 14% dans les CMLV) alors que cette proportion était supérieure à 50% dans les fibroblastes, le reste de la tension interne étant compensée par le substrat auquel la cellule adhère.

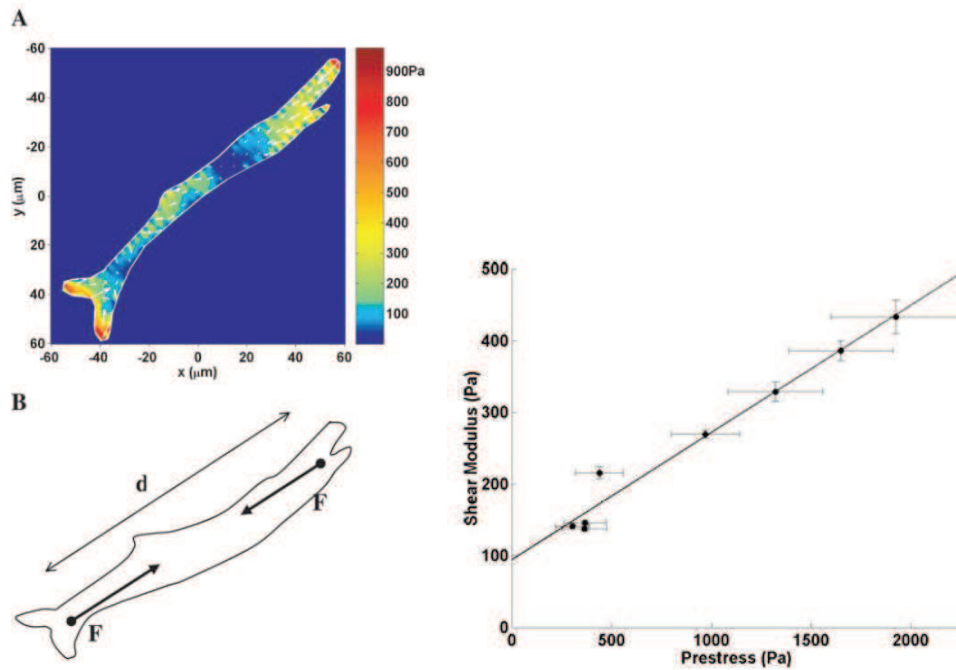


Figure 16 : Mise en évidence sur cellules vivantes de la proportionnalité entre rigidité cellulaire et tension interne

La rigidité cellulaire a été mesurée par magnétocytométrie (voir Matériel et Méthodes) et la tension interne ou « prestress » intracellulaire a été calculée après intégration des champs de contraintes mesurés sous la surface cellulaire par microscopie à force de traction. Des cellules musculaires lisses sont traitées avec un agent contractant qu'est l'histamine (0.1 à 10 μM pendant 1 min) ou à l'inverse, par un agent relaxant : l'isoprotérénol (0.01 à 10 μM pendant 10 min). (Modifiée d'après Wang et al. 2002)

Ces études ont permis de démontrer le rôle clé de la tension interne ou « prestress » comme élément stabilisateur du cytosquelette sur le plan mécanique. Enfin, une propriété essentielle a pu être mise en évidence en couplant deux techniques (mesure de la rigidité cellulaire et mesure des forces de traction cellulaire transmises au substrat), à savoir, la proportionnalité existant entre rigidité cellulaire et tension interne qui signifie qu'une variation de rigidité cellulaire représente aussi une variation de tension interne (figure 16) (Stamenović and Wang 2011).

L'existence d'une structure sous pré-tension dans le cytoplasme s'avère être un mode de transmission efficace du signal mécanique au niveau intracellulaire, plus rapide même que les modes classiques de signalisation comme la translocation ou la diffusion (figure 17). Ainsi,

une force appliquée localement au niveau des intégrines *via* la MEC est concentrée par le faisceau de filaments d'actine organisés en fibres réticulés par l' α -actinine 7 (AcF7) et en tension avec les filaments intermédiaires *via* la plectine (figure 17). Pour atteindre la membrane nucléaire, un temps de propagation de seulement 1 ms est nécessaire selon l'équipe de N. Wang à travers ce réseau prétendu alors qu'il est de 5 à 10 s par diffusion (soit 10^4 fois plus lent).

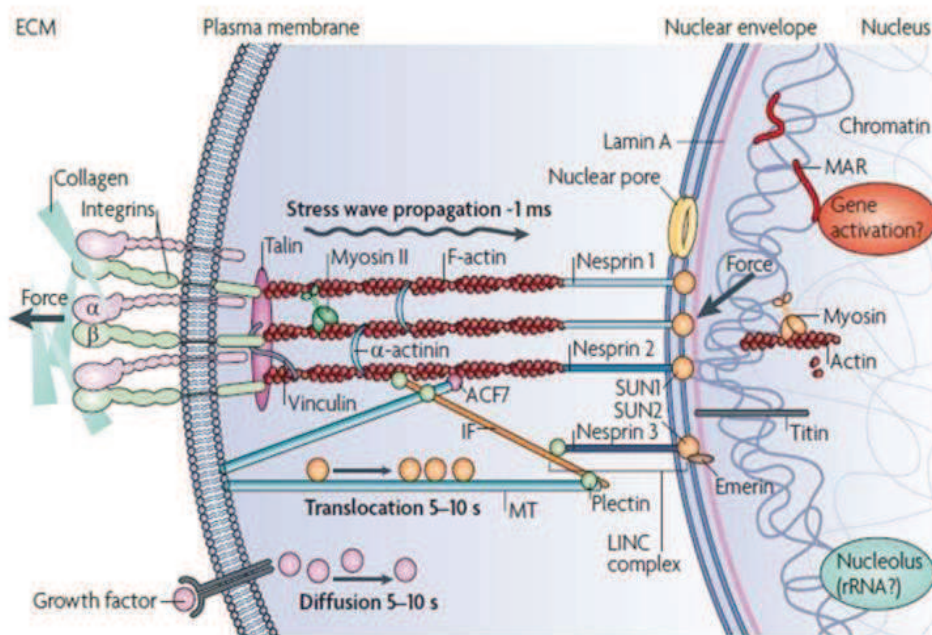


Figure 17 : Connexions moléculaires de la matrice au noyau

Rôle du cytosquelette sous tension (F-actine, myosine, protéines de liaison, et autres filaments) pour transmettre les signaux mécaniques reçus à la paroi (intégrines) et cela jusqu'au noyau à travers le cytoplasme. Les filaments d'actines (F-actin) sont connectés aux microtubules (MTs) par les protéines de jonction (AcF7), et aux filaments intermédiaires (iFs) *via* la plectine 1. La plectine 1 est connectée aux iFs et aux MTs *via* la nesprine 3 exprimée sur la face extérieure de la membrane nucléaire. Les F-actines sont reliés physiquement à l'intérieur de la membrane nucléaire *via* la protéine SUN1. La nesprine 3 est liée à la plectine 1 *via* SUN1 et SUN2. Compte tenu des propriétés viscoélastiques de la structure, des temps de propagation dans l'ensemble de ce système sont estimés à environ 1 ms. (D'après N. Wang et al, 2009).

Le mécanisme de propagation sur de longues distances (de l'ordre de la taille de la cellule) se réduit à de courtes distances (quelques μm) quand la polymérisation du réseau d'actine est stoppée par l'action d'une drogue comme la cytochalasine D (Hu et al. 2004). Ce type de

résultats confirme le rôle fondamental des éléments prétendus du CSQ dans la propagation longue distance.

La recherche d'éléments moléculaires mécanosensibles n'a pas concerné que les intégrines mais également les protéines (plus précisément, les liaisons protéine-protéine) situées proche du cluster des intégrines, dans l'adhésome sous membranaire (figure 17). Selon Moore et al., cinq mécanismes sont responsables de la mécano-sensibilité cellulaire *via* les intégrines : (1) la formation de liaisons verrouillées entre les intégrines, leurs ligands et le squelette contractile constitué par l'acto-myosine, (2) l'ouverture des canaux transmembranaires sensibles aux forces, (3) la régulation enzymatique, (4) l'exposition des sites de phosphorylation et (5) l'exposition des sites de liaisons (S. W. Moore, Roca-cusachs, and Sheetz 2017). Parmi ces mécanismes, plusieurs seraient dus à des changements de conformation protéique sensible à la tension permettant de réguler l'activité des protéines. L'activité de plusieurs kinases dépend de la rigidité extracellulaire, la plus connue étant la protéine kinase FAK dont l'activité augmente avec les forces mécaniques (Michael et al. 2009; H. Wang et al. 2001; J. G. Wang et al. 2001). Les protéines de la famille des Src kinase sont rapidement activées par la protéine RPTP α en réponse à l'application de forces extracellulaires par des billes recouvertes de fibronectine (Wichert et al. 2003). Certaines protéines changent de conformation en réponse à leur étirement mécanique. Ces changements permettent l'exposition des sites d'interaction ou des sites cryptiques qui peuvent être des sites de phosphorylation, c'est le cas de la famille des protéines Cas. L'interaction de la paxilline, de la protéine FAK, de p130Cas avec le cytosquelette augmente avec la tension interne (Sawada et al. 2006). La liaison de la vinculine avec la taline est dépendante de l'étirement de cette dernière par le cytosquelette contractile d'actine (Hytönen and Wehrle-Haller 2016; del Rio et al. 2009).

Certaines molécules constitutives des sites d'adhésion (notamment les FA) comme la taline (Lee, Kamm, and Mofrad 2007) et la vinculine (Golji and Mofrad 2010) seraient impliqués dans la mécanosensibilité à la rigidité matricielle mais seulement en présence de molécules comme les protéines ABS2 ou ABS3 pour actin-binding sites (Kumar et al. 2016). Ainsi, le concept de transmission des contraintes sur de longues distances intracellulaires supporté par le modèle de tenségrité cellulaire, a permis de comprendre l'induction d'une signalisation distante du site d'application de la contrainte mécanique comme par exemple l'élévation du niveau de Src et de Rac1 en moins de 300 ms (Hytönen and Wehrle-Haller 2016; Na et al. 2008; Poh et al. 2009; Sawada et al. 2006; Seong et al. 2013; Wang and Suo 2005) (figure 18). En effet, le milieu cellulaire n'est ni homogène, ni isotrope et cet aspect joue un rôle sur la mécanotransduction comme il a été montré dans plusieurs types cellulaires (Abhilash et al. 2014; del Alamo et al. 2008). La sensibilité cellulaire aux propriétés mécaniques du substrat (durotaxis) ou à celle combinée des cellules avoisinantes et du substrat (migration dans le phénomène de réparation d'une blessure par exemple (Planus et al. 1999)) ne serait pas possible sans cette transmission longue distance au travers d'une cellule individuelle ou à l'interface de la cellule avec son environnement de façon intégrine-dépendante (Wang 2017). Cette même spécificité s'applique aux propriétés de la MEC pour laquelle l'alignement de fibres matricielles permet également une propagation longue distance (Wang et al. 2014).

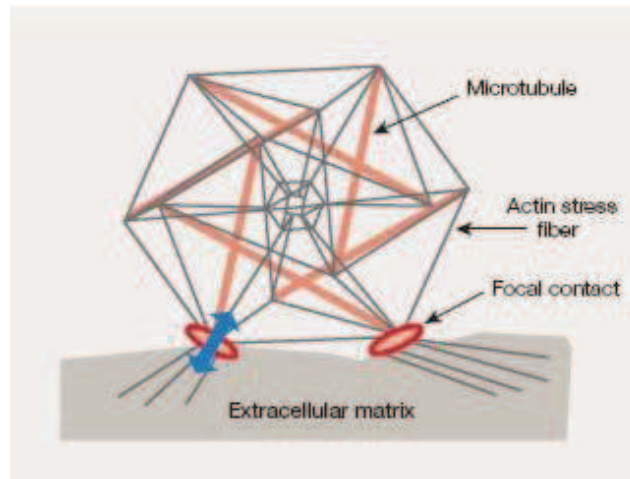


Figure 18 : La tenségrité, le mécanisme physique de la mécanotransduction

La cellule adhérente se stabilise à son support grâce à l'équilibre entre les forces de tension et de compression. Les microtubules sont au centre d'un réseau de contraintes de compression exercées par les filaments d'actine. Les contacts focaux relient physiquement le cytosquelette interne à la MEC. Si la matrice change ses propriétés physicochimiques ou si elle est soumise à la déformation, les forces sont rééquilibrées (in-out et out-in (flèche bleue)). Les contacts focaux sont également nécessaires pour activer les nombreuses voies de signalisation intracellulaire, où les effets mécaniques peuvent être couplés avec d'autres effets biochimiques (réponses aux facteurs de croissance par exemple).

2.4.2. Propriétés mécaniques de la cellule et mécanotransduction

Les fibres de stress et le reste du cytoplasme, comme la plupart des matériaux biologiques ont un comportement viscoélastique de type solide, fluide ou en transition entre ces deux états (Fung 1981). Les comportements solide ou fluide sont décrits par des modèles rhéologiques classiques (modèle de Voigt ou Kelvin-Voigt pour un solide viscoélastique, modèle de Maxwell ou de Zener pour un fluide viscoélastique). Pour mieux décrire la transition, une loi puissance, équivalente à un modèle de Kelvin-Voigt généralisé, a été proposée. Il est apparu que les propriétés viscoélastiques de la cellule vivante et sa nature évoluaient avec la fréquence du signal de force appliquée (loi puissance) mais que cette évolution restait très faible car l'exposant de la loi puissance est compris entre 0.1 et 0.3 pour le CSQ (Fabry et al. 2001) suggérant que : (i) le CSQ de la cellule est plus proche du comportement d'un solide idéal (purent élastique) que d'un fluide idéal (purent visqueux), (ii), le CSQ aurait une infinité de temps caractéristiques (un par fréquence), (iii) le pré-facteur de la loi puissance est inversement proportionnel au module élastique et apparaît comme le paramètre le plus

sensible quand certaines sous structures subissent des atteintes discrètes. Les mécanismes moléculaires responsables de ce comportement en faible loi puissance n'ont pas été totalement élucidés. Des ruptures de liens non-covalents entre protéines cytoplasmiques ont été proposés (Chowdhury et al. 2008). Il est important de noter que la spécificité de la force appliquée est fondamentale par rapport au comportement microrhéologique observé. Ainsi, une sollicitation mécanique dirigée vers le CSQ au moyen d'une bille ferromagnétique micrométrique fonctionnalisée pour les intégrines permettra de mettre en évidence le comportement structural de la cellule plus proche d'un comportement d'un solide viscoélastique que d'un fluide (Laurent et al. 2002). La particularité du comportement de type solide viscoélastique est d'exprimer un ou plusieurs temps de relaxation. C'est précisément le cas pour toutes les cellules adhérentes dont les cellules pulmonaires où le CSQ a été testé en magnétocytométrie, c'est-à-dire, en appliquant un couple magnétique à la cellule au travers de la bille fonctionnalisée (Féréol et al. 2008). Cette relaxation cellulaire est en général incomplète (parfois appelée comportement plastique) mais les mécanismes moléculaires mis en jeu restent en débat. Des auteurs ont récemment attribué cette plasticité à des ruptures de liens au sein du CSQ mais la méthode utilisée (pinces magnétiques) favorise les grandes déformations intracellulaires (Bonakdar et al. 2016). Le laboratoire a développé une analyse originale de la composante non réversible de la relaxation cellulaire en l'attribuant, dans le cas de la magnétocytométrie où un couple magnétique est appliqué induisant alors des contraintes en rapport avec la physiologie cellulaire, à la rupture partielle des liens intégrine-ligand à l'interface bille-cellule (Isabey et al. 2016). Cette approche appelée magnétocytométrie multi-échelle est expliquée dans la section Matériel et Méthodes.

La relation entre la mécanotransduction et la réponse rhéologique de la cellule n'est pas encore bien comprise et il y a plusieurs raisons à cela. Alors que les comportements viscoélastiques des cellules vivantes prennent naissance dans le matériau cellulaire doté de

propriétés intrinsèques, il est possible que les évolutions temporelles des propriétés viscoélastiques reflètent, au moins pour une part, les processus de mécanotransduction. La multiplicité des constantes de temps de relaxation observées aux différentes fréquences suggère une multiplicité d'échelles possibles pour la mécanotransduction intracytoplasmique. Des études ultérieures sont nécessaires pour apporter de nouvelles données expérimentales. Face à ce constat, la description même sous forme d'un modèle Kelvin-Voigt généralisé (loi puissance) peut paraître excessivement simplifiée puisqu'elle ne prend pas en compte les mécanismes moléculaires actifs, l'activité des moteurs moléculaires et/ou le remodelage des filaments, tous impliqués dans et sous le contrôle de la mécanotransduction.

2.4.3. La mécanobiologie en physiopathologie et biomédecine

La mécanobiologie qui recouvre la mécanotransduction et la mécanique cellulaire a trouvé une place de choix en biologie des cellules souches, des cancers, des maladies pulmonaires et cardiovasculaires. Il a été montré que les cellules de l'organisme s'adaptent à des matrices extracellulaires et des tissus de rigidités très variables (comprises entre 100 Pa et des dizaines de kPa) (Discher, Mooney, and Zandstra 2009). Cette sensibilité va dépendre du type cellulaire voire du phénotype en cours, comme le montre des études du laboratoire qui indiquent que les cellules inflammatoires notamment les macrophages alvéolaires expriment une sensibilité accrue à la rigidité du substrat (Féréol et al. 2006) comparé aux cellules alvéolaires épithéliales en situation de confluence qui y sont peu sensibles (Féréol et al. 2009). Par ailleurs, la différenciation des cellules souches mésenchymateuses peut être orientée par la rigidité de la MEC (Engler et al. 2006). La rigidité cellulaire conditionne la sensibilité cellulaire à la force appliquée permettant à une cellule souche embryonnaire d'être plus sensible aux forces locales qu'une cellule différenciée (Chowdhury et al. 2010). Cette influence des propriétés mécaniques du microenvironnement est fondamentale non seulement pour la différenciation des cellules souches mais aussi pour l'organisation des feuillets de

cellules germinales dans les phases précoces du développement embryonnaire (Huang and Ingber 1999; Poh et al. 2014).

Le rôle des forces mécaniques a été démontré en biologie des cancers mais de nombreux aspects restent à comprendre. Dans les tumeurs primaires, des tensions mécaniques élevées et des matrices extracellulaires rigides favoriseraient la progression des cancers (Paszek et al. 2005) et des pressions élevées sont souvent observées dans les tumeurs primaires en cas de croissance tumorale (Jain 2005). Cependant, les sites secondaires dits métastatiques présentent des rigidités plus faibles que les tissus normaux environnants (Plodinec et al. 2012) ce qui suggère que des forces modérées et des MEC de faibles rigidités sont des facteurs importants pour la tumorigenèse et dans les processus métastatiques de certaines cellules souches cancéreuses (Lapidot et al. 1994). Des travaux récents (Chen et al. 2016) ont mis en évidence un comportement cellulaire commun favorisant les processus métastatiques : certaines cellules appelées « tumor repopulating cells » (TRCs) ont un pouvoir métastatique et prolifératif au niveau des sites secondaires parce qu'elles exercent des forces faibles, étant elles-mêmes peu rigides et indifférenciées alors que les cellules cancéreuses rigides et différenciées ont un pouvoir d'extravasation bien plus faible. Même si la rigidité et la structure du macrophage dépendent des propriétés mécaniques du substrat, les précédentes études du laboratoire ont révélé que le macrophage ne présentait pas de rigidification sous contrainte, ce comportement mécanique qui lui est spécifique lui permettrait de naviguer dans des environnements rhéologiques très différents (Féréol et al. 2006). Il faut noter que l'extravasation est elle-même un processus qui dépend fortement des propriétés du CSQ, les filaments d'actine notamment, des cellules traversées (endothéliales) par les cellules cancéreuses.

Les toxines bactériennes sont connues depuis longtemps pour affecter la signalisation cellulaire et altérer la structure cytosquelettique (Aktories et al. 2011b, 2012; Barbieri, Riese,

and Aktories 2002; Toivola and Eriksson 1999). Ces effets induits sur le CSQ et sur la signalisation par ces toxines ont un impact à la fois sur la mécanotransduction et la mécanique cellulaire et moléculaire. Cependant, les connaissances en termes de modification des propriétés mécaniques cellulaires et de liaison entre la cellule et son substrat sont peu développées.

2.5. Objectifs de la thèse

L'épithélium respiratoire joue un rôle essentiel dans la défense du poumon puisqu'en tant qu'interface entre l'organe et l'environnement, il constitue la première ligne de défense vis-à-vis des pathogènes. Comprendre les mécanismes mis en jeu lors de l'exposition à des pathogènes est donc de première importance pour la physiopathologie des maladies respiratoires.

Nous proposons dans cette thèse d'étudier la réponse des cellules épithéliales respiratoires face à une situation d'intoxication bien maîtrisée. Compte tenu de l'importance des équilibres mécaniques dans le maintien de l'intégrité tissulaire et cellulaire, nous voulons en particulier examiner comment la signalisation mécano-chimique (mécanotransduction) est altérée dans la phase précoce de l'intoxication. En sachant que les éléments importants de cette mécanotransduction sont le cytosquelette et les molécules de liaison incluant les protéines d'interface impliquées dans l'adhérence (en premier lieu les intégrines), nous allons tout d'abord regarder comment ces structures cellulaires et moléculaires sont touchées par l'invasion d'une toxine bactérienne. Une telle approche mécanique, structurale et fonctionnelle, devrait permettre de préciser les mécanismes d'action initiaux de la cytotoxicité.

Pour évaluer l'effet de l'intoxication bactérienne sur l'épithélium respiratoire, nous avons mis en place un système-modèle d'agression bactérienne d'épithélium respiratoire *in vitro* et *ex*

vivo permettant d'étudier les stades précoces de l'atteinte par une toxine bactérienne bien identifiée pour ses capacités d'invasivité et de virulence : la toxine adénylate cyclase produite par la souche *B. pertussis* (bactérie responsable de la coqueluche). Ses capacités multiples en termes de mécanismes d'action lui permettent de viser un large spectre de cellules notamment les cellules inflammatoires et les cellules épithéliales pulmonaires, et finalement de jouer un rôle clé dans les mécanismes initiaux de l'intoxication. En résumé, la toxine CyaA est un acteur primordial dans le mécanisme d'invasion bactérienne et est donc particulièrement adaptée à l'étude des processus initiaux de l'agression bactérienne. Cette toxine présente des variants pour lesquels certains des mécanismes clés de l'intoxication sont inhibés. Un des mécanismes utilisés par la toxine dans sa forme active, d'ailleurs commun à nombre de toxines est l'augmentation jusqu'à des niveaux supraphysiologiques de l'AMPc intracellulaire, laquelle est annihilée avec le variant.

Pour l'évaluation des effets et des mécanismes induits par la toxine, nous réunissons (i) un ensemble d'outils d'investigation biologiques et fonctionnels classiques pour évaluer la viabilité cellulaire, les phénomènes de migration/réparation, la perméabilité cellulaire ainsi que le battement ciliaire , (ii) des outils d'imagerie cellulaire et moléculaire (microscopie à fluorescence, microscopie confocale avec des méthodes d'immunomarquage) pour évaluer la structure cytosquelettique et l'adhésion, et (iii) des outils de micro/nanomanipulation utilisant des sondes sphériques fonctionnalisées pour les intégrines et permettant d'explorer les propriétés mécaniques et les propriétés d'adhérence sur cellules vivantes (Magnétocytométrie, Microscopie à Force Atomique) couplés à une nouvelle approche théorique permettant de décrire la dynamique de détachement des liens intégrine-ligand simples et multiples.

Cette étude a pour but de préciser le rôle (attendu) d'une molécule, qualifiée de second messenger, qu'est l'AMPc, dans l'intoxication bactérienne et de mettre en évidence le rôle de cette molécule sur des éléments clés de la mécanotransduction, et sur l'intégrité tissulaire et cellulaire. Si la toxine CyaA est connue pour exercer ses actions cytotoxiques au sein de la cellule épithéliale par production d'AMPc à des niveaux supraphysiologiques, les résultats obtenus dans cette étude éclairent sur les conséquences d'une telle augmentation, ce qui n'a jamais été montré auparavant, et notamment les changements induits sur les voies de signalisation mécano-chimique qui doivent être considérées comme partie intégrante de la réponse biologique à l'intoxication cellulaire.

3. MATERIELS ET METHODES

3.1. Modèles cellulaires

3.1.1. Modèle de cellules épithéliales alvéolaires humaines (lignée A549)

L'essentiel des expérimentations a été effectué sur des cellules de la lignée A549. Brièvement, cette lignée, dont l'origine est un adénocarcinome d'épithélium pulmonaire prélevé chez un patient, est obtenue *via* la banque de lignée du National Cancer Institute (ref : collection ATCC n°CCL-185). Il s'agit d'une lignée hypo triploïde qui possède 24% de cellules à 12 chromosomes, 22% de cellules à 64 chromosomes et le reste constitué de cellules diploïdes. Par ailleurs, les cellules épithéliales de type A549 sont utilisées au laboratoire depuis de nombreuses années car elles expriment un phénotype semblable à certaines cellules épithéliales alvéolaires pulmonaires, à savoir, les pneumocytes de type II (Foster et al. 1998).

Les cellules sont cultivées en flasques plastiques traitées pour l'adhésion cellulaire à bouchon filtrant (25 ou 75 cm² ; Techno Plastic products AG, Suisse). Le milieu de culture est constitué de DMEM (Sigma-Aldrich ; Saint-Louis, MO, USA), de 10 % de sérum de veau fœtal ou SVF (Sigma-Aldrich ; Saint-Louis, Mo, USA) ainsi que de 1% d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Le SVF est le composant le plus complexe car il contient des facteurs de croissance, des hormones, des éléments de la MEC (fibronectine et vitronectine par exemple) et tout ce qui est contenu dans le sang, excepté les éléments figurés, les facteurs de coagulations et le complément.

Les cultures sont incubées à 37°C en atmosphère contrôlée (5% de CO₂ et 95% d'humidité). Les cellules consomment les nutriments du milieu et produisent des métabolites. Il faut donc renouveler régulièrement le milieu, à savoir, toutes les 24 ou 48 heures. Les cellules sont adhérentes au support et doivent donc être décollées à l'aide de trypsine-EDTA 0.05% (Sigma-Aldrich ; Saint-Louis, Mo, USA) puis repiquées. Après centrifugation à 200g, le culot

cellulaire est re-suspendu dans du milieu DMEM-10% SVF et une partie est transférée dans une autre flasque. Pour conserver la lignée et disposer d'un stock, les cellules non utilisées sont congelées. Toutefois, il faut noter que les cellules ne peuvent plus être utilisées au-delà du 30^{ème} passage.

3.1.2. Modèle de cellules épithéliales nasales humaines (CENH primaires)

Afin d'obtenir des explants d'épithélium respiratoire, nous utilisons du matériel de résection de polypes nasaux qui fournit un épithélium proche de celui des voies aériennes de conduction. Ce sont les médecins du service de chirurgie maxillo-faciale et ORL de l'hôpital Intercommunal de Créteil (CHIC) qui recrutent des patients consultant pour différentes pathologies et nécessitant une intervention chirurgicale, qui nous fournissent ce matériel pour nos études *in vitro*.

Afin de préparer une culture primaire à long terme en interface air-liquide (ALI) de cellules épithéliales nasales humaines, nous suivons tout d'abord un protocole de dissociation. Il s'agit d'une méthode classique permettant de dissocier des cellules à partir de l'explant par incubation de celui-ci durant seize à vingt heures dans un milieu de culture contenant 1 mg/ml de pronase (Sigma-Aldrich ; Saint-Louis, Mo USA). L'action de la pronase est ensuite arrêtée par l'ajout de milieu DMEM/HAM-F12 à 5% de sérum de veau fœtal (SVF) (Life Sciences, USA). Les cellules dissociées sont alors remises en suspension et dénombrées à la cellule de Malassez. Après centrifugation à 1500 rpm pendant 7 min, le culot cellulaire est remis en suspension dans du milieu constitué d'un mélange à parts égales de DMEM et de milieu HAM-F12 (Life Technologies, USA) contenant des antibiotiques et 5% de SVF. Les cellules sont ensuiteensemencées à 1 million de cellules par puits double chambre Transwell® (Corning, Amsterdam, Pays Bas) au niveau de la chambre apicale coatée au collagène IV. La chambre basale, quant à elle, contient de l'Ultroser G 2% (Life Sciences,

USA) (5 fois plus concentré en facteurs de croissance que le SVF) jusqu'à que les cellules atteignent la confluence.

Le lendemain de l'ensemencement, les cultures sont mises en interface air-liquide (figure 19). Dans ce mode de culture, les cellules sont placées dans des conditions proches de celles *in vivo*, ce qui permet de maintenir l'épithélium mucociliaire dans un état différencié et fonctionnel. L'établissement de cette interface air-liquide se fait par élimination du milieu de culture situé en face apical de l'insert. Il ne reste donc plus que le milieu en face basale. Un rinçage au PBS (Life Technologies, USA) est effectué pour éliminer les cellules non adhérentes. Enfin, lorsque les cellules atteignent la confluence, le milieu est changé. Nous utilisons alors du Pneumacult (StemCell) permettant la différenciation de l'épithélium. Le milieu sous l'insert est renouvelé toutes les 48h.

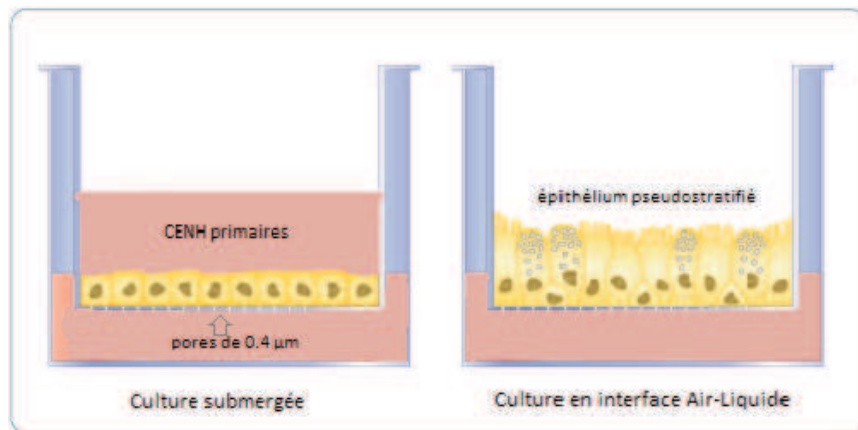


Figure 19 : puits double chambre permettant de mettre les cellules épithéliales nasales humaines en interface air-liquide

3.1.3. Modèle de macrophages

Les macrophages qui ont été utilisés sont des RAW 264.7 (ATCC TIB-71). Ces cellules inflammatoires proviennent du sang de souris mâles atteintes de leucémie. Les méthodes de culture sont similaires à celles utilisées pour les A549. En effet, les macrophages sont cultivés en flasques plastiques déjà traitées pour l'adhésion cellulaire à bouchon filtrant (25 ou 75cm²,

Techno Plastic products AG, Suisse). Le milieu utilisé pour la mise en culture est du DMEM supplémenté de 10% SVF et contenant 1% d'antibiotiques. Les cultures sont incubées à 37°C en atmosphère contrôlée (5% de CO₂ et 95% d'humidité). Afin d'apporter aux cellules les nutriments nécessaires à leur prolifération, le milieu est changé toutes les 48 heures. Les macrophages étant réfractaires à la trypsine, un grattoir est utilisé pour les décoller. Enfin, après une centrifugation à 200g, le culot cellulaire est re-suspendu dans du milieu complet (DMEM 10%SVF). Pour conserver la lignée et disposer d'un stock, les cellules non utilisées sont congelées.

3.2. Modèle d'invasion à la toxine bactérienne CyaA

Lors de la réalisation de nos expériences, nous avons utilisé l'adénylate cyclase (ou CyaA) issue de la bactérie *Bordetella pertussis* comme modèle d'exposition à une toxine bactérienne. Comme indiqué au paragraphe 2.1.2.2.3, cette toxine possède des propriétés exceptionnelles, ce qui lui confère une efficacité particulière. En effet, CyaA possède la capacité unique de transloquer son domaine catalytique directement à travers la membrane plasmique de la cellule épithéliale respiratoire même dans le cas où celle-ci est dépourvue du récepteur intégrine $\alpha_M\beta_2$ (considéré comme cible prioritaire de CyaA). Cette translocation provoque une augmentation du taux d'AMPc intracellulaire qui atteint des niveaux supraphysiologiques au sein de la cellule cible. Une telle augmentation du taux d'AMPc provoque des effets cellulaires majeurs encore mal répertoriés lorsqu'ils sont induits par une toxine. Ces effets, que l'on peut considérer comme l'amorce de processus pathologiques induits par la toxine, sont évalués dans notre étude à travers une série de tests biologiques que nous décrivons dans la section *Matériel et Méthodes* (la viabilité cellulaire, la migration dans la réparation cellulaire, la mesure du taux d'AMPc intracellulaire par ELISA, le marquage par immunofluorescence du cytosquelette d'actine et des protéines d'adhésion, l'appréciation de la perméabilité cellulaire par mesure de la résistance électrique transépithéliale ainsi que

les propriétés mécaniques et les paramètres d'adhésion des cellules exposées). Une partie de ces tests sont déjà décrits dans l'un des articles qui soutient cette thèse (Angely et al. 2017) [voir document annexe des publications].

Par ailleurs, nous avons dû déterminer, dans une étude préliminaire, les concentrations de CyaA à utiliser dans nos expériences dans une gamme allant de 0.5 nM à 10 nM. Cette gamme de concentrations s'avère représentative des conditions physiopathologiques pour une viabilité cellulaire pouvant être préservée (à 0.5 nM) ou altérée (à 10 nM).

Enfin, dans le but de tester le rôle de l'AMPc dans les effets cellulaires induits par la toxine, nous avons utilisé une forme enzymatique inactivée pour l'activité adénylate cyclase appelée CyaAE5 (fournie par l'équipe de D. Ladant et A. Chenal de l'Institut Pasteur). Plus précisément, ce variant n'entraîne pas d'augmentation du taux d'AMPc intracellulaire dans la cellule cible même après translocation de son domaine catalytique. Les processus d'extraction et de purification de CyaA et de CyaAE5 sont décrits dans la section *Matériels et Méthodes* de l'article (Angely et al. 2017).

Il faut noter que la toxine CyaA et son variant CyaAE5 sont dilués dans un tampon spécifique comprenant 20mM d'Hepes, 150 mM de NaCl, 2mM de CaCl_2 avec un pH à 7.4.

3.3. Tests biologiques

Les résultats rapportés dans cette étude sont obtenus essentiellement sur les cellules A549 décrites précédemment. De la même façon, lors de ces expériences, les cellules sont exposées à la toxine CyaA ou au variant inactif pour l'AMPc, CyaAE5, ou encore, à du milieu complet représentant la condition contrôle. L'exposition aux toxines (CyaA ou CyaAE5) est réalisée dans la gamme de concentrations se situant entre 0.5 nM et 10 nM. Du calcium (CaCl_2 à 1M) est ajouté afin d'activer les toxines lorsque qu'elles sont diluées dans le milieu de culture.

Enfin, la cytochalasine D (CytoD) est utilisée à 1 µg/ml (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) comme témoin de la liaison des billes au CSQ d'actine pour l'expérience de magnétocytométrie. La CytoD, connue pour inhiber la polymérisation de l'actine G venant se fixer à l'extrémité positive du filament de F-actine, est parfois utilisée pour vérifier la spécificité de liaison au cytosquelette de la réponse mécanique étudiée comme lors d'une expérience de magnétocytométrie par exemple.

3.3.1. Tests de viabilité cellulaire

3.3.1.1. Test au MTT

Le MTT (bromure de 3-[4,5-diméthyl-2-thiazolyl]-2,5-diphényltétrazolium, Sigma M5655) est un sel de tétrazolium donnant une solution de couleur jaune quand il est dilué dans le milieu. Il est converti en formazan violet insoluble dans le milieu de culture après clivage du cycle tétrazolium par les déshydrogénases mitochondriales actives des seules cellules vivantes (figure 20). Les cellules mortes ne peuvent être le siège de ce changement.

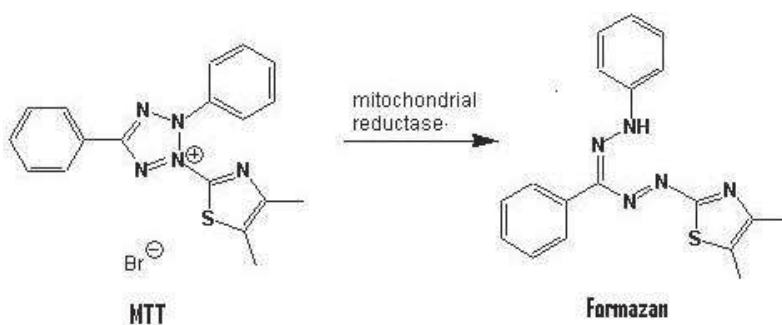


Figure 20 : Réaction enzymatique du MTT dans les cellules vivantes

2500 cellules de type A549 sontensemencées par puits dans une plaque de 96 puits. Après 24 heures d'incubation, les cellules sont synchronisées par du DMEM sans rouge phénol à 0% SVF. Après 72 heures d'incubation, les cellules sont soumises à différentes concentrations de CyaA durant 30 minutes. On ajoute ensuite 50 µg de solution MTT à 2 µg/ml dans chaque puits ce qui permet d'obtenir une solution MTT concentrée à 0,25 µg/ml. Après 4 heures

d'incubation, le milieu est retiré par retournement. On dépose alors 200 µL de DMSO dans chaque puits. Enfin, on procède à la lecture de la plaque 96 puits au lecteur ELISA à une longueur d'onde de 520 nm. Les résultats sont exprimés sous la forme de densité optique (ou absorbance).

3.3.1.2. Test au bleu de Trypan

Le test au bleu de Trypan est une méthode de coloration des cellules. Le colorant entre dans l'ensemble des cellules. Une fois dans la cellule, si celle-ci est vivante, il se produit un mécanisme d'exclusion qui va permettre de l'éjecter dans le milieu extérieur. Ce mécanisme nécessitant de l'énergie, seules les cellules possédant une source d'ATP peuvent le mettre en place. Ainsi, une cellule vivante expulsera la molécule et apparaîtra transparente au microscope alors qu'une cellule morte apparaîtra colorée en bleu car elle n'aura aucun moyen de rejeter le colorant. Cependant, ce colorant est toxique pour les cellules et peut créer des pores plus ou moins gros au niveau de la membrane plasmique des cellules vivantes lors d'une exposition prolongée (au-delà de 5min).

Le bleu de Trypan est incorporé à la suspension cellulaire préalablement incubée avec les substances à tester. Dans notre cas, il s'agira de la toxine CyaA. Quelques µl sont alors déposés sur la cellule de Malassez, ce qui permettra de déterminer de façon classique le pourcentage de viabilité selon la formule suivante :

$$\% \text{ de viabilité} = \frac{\text{nbr de cellules vivantes}}{\text{nbr total de cellules}} \times 100$$

3.3.2. Mesure du taux d'Adénosine MonoPhosphate cyclique (AMPC)

Pratiquement, les cellules A549 ont étéensemencées à $3 \cdot 10^5$ cellules/puits et exposées aux différentes conditions : milieu complet (contrôle), ou à CyaA (0.5, 5 et 10 nM) ou encore à CyaAE5 (0.5, 5 et 10 nM) durant 30 min. Les cellules sont ensuite récupérées puis lysées à l'aide de 0.1 M d'HCl dans le but de recueillir le contenu intracellulaire.

Afin de procéder à la mesure du taux de d'AMPc intracellulaire, nous avons utilisé un kit ELISA compétitif pour l'AMPc (Invitrogen). Comme son nom l'indique, ce kit est basé sur la compétition de l'AMPc contenu dans l'échantillon (ou la gamme standard servant de témoin) et la phosphatase alcaline conjuguée à l'AMPc (cAMP-AP) pour une quantité limitée d'anticorps monoclonal d'AMPc lié à l'immunoglobuline anti-lapin recouvrant le fond des puits d'une plaque de 96 puits. Ainsi, si la concentration d'AMPc de l'échantillon augmente, la quantité de cAMP-AP capturé par l'anticorps va diminuer. Il y aura donc une relation inversement proportionnelle entre la densité optique (DO) et la quantité d'AMPc dans l'échantillon.

La gamme standard nous permet d'obtenir une courbe représentant la densité optique en fonction de la concentration d'AMPc, ce qui nous permet ensuite pour chaque échantillon, de mesurer la DO et connaître ainsi la concentration d'AMPc.

3.3.3. Modèle de migration et de réparation cellulaires d'une blessure

Le modèle de migration cellulaire correspond à la mesure et l'analyse de la réparation d'une blessure dans une monocouche de cellules épithéliales réalisée à l'aide d'un cône de micropipette de diamètre distal de 5 μm .

Les cellules A549 sontensemencées à une densité de 10^5 cellules/puits sur des plaques de 12 puits (chambre simple), incubées durant 24 heures dans du milieu de culture complet (DMEM, 1% pénicilline-streptavidine, 5% SVF) pour former un tapis cellulaire confluent. À noter que cette expérience a également été réalisée sur un modèle de co-culture cellules épithéliales/macrophages, les macrophages étant ajoutés sur le tapis confluent de A549.

Concernant les CENH, les cellules sontensemencées à une densité de 1.10^6 cellules/puits en puits double chambre ou Transwell[®] (Corning, Amsterdam, Pays Bas). Lorsque l'épithélium est différencié (après 21 jours de culture), le test de blessure peut être pratiqué.

Une fois la confluence atteinte (A549 ou après différenciation pour les CENH), une blessure est réalisée à l'aide d'un cône de micropipette sur toute la longueur de la couche cellulaire, généralement, au centre du puits. Les cultures sont rincées avec du milieu complet pour éliminer les débris cellulaires. Les cellules sont alors exposées aux différentes concentrations de CyaA ou au milieu complet (témoin). La migration est déterminée par l'aptitude qu'ont les cellules à refermer une blessure créée mécaniquement. Ces essais sont réalisés sur 48 heures en moyenne et des photos de blessures sont prises toutes les 3 heures -la migration mésenchimale 2D étant un processus "lent"- à l'aide du microscope Leitz Labovet FS couplé à une caméra noir et blanc Kappa DX20-H. Les images sont analysées pour quantifier l'aire de surface des blessures au cours du temps à l'aide du logiciel ImageJ.

3.3.4. Mesure de la fréquence du battement ciliaire par microscopie à haute vitesse

Cette technique, développée par Bruno Louis et coll. (Papon et al. 2012), utilise un microscope Zeiss Axiovert 200M. Il s'agit d'un microscope inversé : la lumière arrive sur l'échantillon par le dessus et l'observation est faite par le dessous. Celui-ci est couplé à une caméra à haute vitesse PixeLINK PL-A471 avec une résolution de 1.3 mégapixels (1280x1024) qui filme en niveaux de gris. La caméra est configurée de façon à obtenir des films à 358 images par secondes. Le logiciel utilisé est Streampix 5 Edition SingleCamera (NorPix Inc).

La préparation de l'échantillon consiste à monter 80 μ L de suspension cellulaire entre lame et lamelle. La suspension cellulaire est contenue dans un carré de 1.5 cm de côté formé par de la graisse de silicone.

Dans un premier temps, il s'agit de repérer les bordures ciliées (et non les cellules ciliées isolées) à l'aide de l'objectif $\times 100$ à immersion à huile. Sur 10 films de bordures ciliées, nous

évaluons le score de richesse de la suspension (- : majorité des cils qui ne battent pas, +/- : autant de cils qui battent que de cils qui ne battent pas, + : majorité de cils qui battent). Cela nous permet d'obtenir un pourcentage (- = 0%, +/- = 5% et + = 10%).

Nous disposons de deux méthodes développées au laboratoire par Bruno Louis et *coll.* permettant de calculer la fréquence du battement ciliaire à partir des films réalisés.

La première consiste à extraire par Transformée de Fourier (FFT) la fréquence fondamentale du signal de variation du niveau de gris moyen d'une ligne au cours du temps. La seconde utilise la vidéo-kymographie : la même ligne de pixels est prise sur chaque image et accolée à la précédente afin d'obtenir une représentation graphique de l'évolution de la position du cil dans le temps (figure 21) sur laquelle nous pouvons mesurer la période du battement et donc calculer la fréquence (inverse de la période).

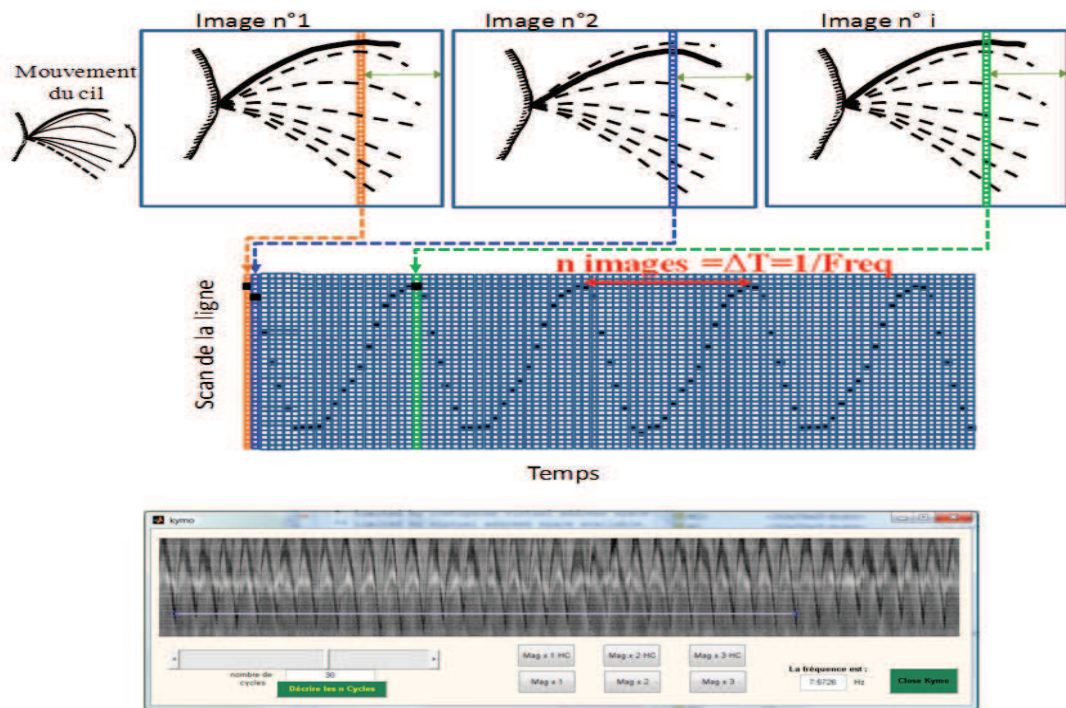


Figure 21 : Principe de kymographie
(D'après B. Louis, 2012)

À la suite de cela, d'autres lames peuvent être montées afin de tester plusieurs conditions, comme la toxine CyaA et son variant CyaAE5.

3.3.5. Evaluation de la perméabilité cellulaire par mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER)

Ce test permet de mesurer la résistance trans-épithéliale représentant une mesure physique de la résistance électrique entre les cellules épithéliales jointives, ce qui est un indicateur de la perméabilité *in vitro*. La TEER peut donc être corrélée au nombre de jonctions et à la perméabilité de l'épithélium (Yeo and Jang 2010). L'appareil que nous utilisons est l'EVOM voltmeter accompagné d'une électrode ENDOHM-12 (World Precision Instruments, New Haven, CT).

Cette expérience nous permet d'obtenir la différence de potentiel (en V) entre les deux compartiments du puits double chambre et la résistance électrique (en Ω/cm^2) de l'épithélium reconstitué par les CENH. Cette mesure quantifie la façon dont passent les ions à travers la couche cellulaire (transport ionique et gradient de concentration) donnant une mesure des espaces entre les cellules, et donc de la jonction et de l'adhésion intercellulaire.

Lors de cette expérience, les cellules ont été exposées au milieu spécifique des CENH (DMEM-HAM F12-UG 2%) ou à différentes concentrations de CyaA (10, 15 ou 20 nM) pendant 30 min.

3.3.6. Marquage du cytosquelette d'actine et des points focaux d'adhésion

Les cellules A549 sontensemencées à une densité de 75 000 cellules/lamelles ($\varnothing$ 12 mm). Après 24h d'incubation à 37°C et 5% de CO₂, les cellules atteignent 60% de confluence et sont exposées aux conditions suivantes pendant 30 min : contrôle (milieu complet), CyaA à 0.5, 5 et 10nM. Un lavage au PBS est ensuite réalisé. Les cellules sont alors fixées 10min dans du paraformaldehyde à 4% dans du tampon phosphate puis rincées 3 fois au PBS. Les cellules sont ensuite perméabilisées au Triton 0.3% durant 10 min. Cette étape permet aux

anticorps d'accéder aux antigènes intracellulaires. Les cellules sont à nouveau rincées 3 fois au PBS puis incubées 30 min dans du PBS-1% BSA ce qui va permettre de saturer les sites non spécifiques. Après avoir retiré la solution de BSA, les cellules sont incubées pendant 1h à température ambiante dans une solution diluée d'anticorps primaire anti-phosphotyrosine PY99 (sc-7020, Santa Cruz Biotechnology, dilution au 1/150^{ème}) qui sera couplé secondairement à un anticorps secondaire Alexa-488 (Life Technology dilué au 1/1000^{ème}) afin de révéler les points focaux d'adhésion en vert. Après rinçage au PBS-0.02% Triton, les cellules sont incubées dans une solution diluée de phalloïdine tetramethylrhodamine B-isothiocyanate (Sigma, dilution au 1/2000^{ème}) afin de visualiser les fibres d'actine en rouge. On effectue enfin le montage entre lame et lamelle à l'aide de Prolong (Life Technology) qui permet de conserver la fluorescence. Les structures marquées sont observées et les images de celles-ci acquises à l'aide du microscope confocal Axio Imager (Zeiss) à l'objectif $\times 63$ à immersion. L'analyse des images par le logiciel ImageJ a permis d'obtenir les niveaux de fluorescence de chaque cellule par rapport au fond de l'image. Pour déterminer le nombre et la taille des points focaux, une méthode de seuillage est utilisée à l'aide de ce même logiciel afin de pouvoir analyser automatiquement les points présents sur l'image.

Enfin, sur les mêmes lames, l'utilisation du logiciel LSM5 Pascal a permis de réaliser des empilements d'images (tous les 0.5 μm) dans la direction verticale « z » et de réaliser une reconstruction 3D de la forme de la cellule dans le but d'en mesurer la hauteur pour chacune des conditions testées.

3.4. Sonder la réponse mécanique sur cellules vivantes : mesures expérimentales et outils théoriques

Parmi les différentes méthodes de micromanipulation existante, (Ladoux and Nicolas 2012; Lele et al. 2007; Moeendarbary and Harris 2014; Stamenović and Wang 2011), nous en utilisons deux : la magnétocytométrie (MTC) et la microscopie à force atomique (AFM)

permettant d'évaluer à la fois les propriétés mécaniques de la cellule et les paramètres d'adhésion médiés par les intégrines. En raison de cette spécificité, les mesures effectuées sont dépendantes de la structure cellulaire profonde et/ou corticale. Ainsi, nous utilisons, pour les deux techniques, des sondes de tailles et de forme similaires, fonctionnalisées avec un ligand (RGD ou fibronectine) spécifique des récepteurs intégrines. Les différences essentielles entre les deux techniques résident dans le nombre de cellules impliquées pour chaque mesure puisque la MTC permet de sonder le comportement mécanique moyen d'une population cellulaireensemencées dans un puits de 6 μm de diamètre (10^5 cellules), alors que l'AFM permet une évaluation cellule par cellule. Pour la MTC, le comportement des liens moléculaires de type « adhésion » est extrapolé (par un modèle probabiliste) à partir de la rupture de quelques liens responsables du glissement de la sonde par rapport à la cellule. La notion de temps de vie global ou son inverse, le taux de dissociation global est plus adapté à la technique de MTC que la notion de forces de rupture, sachant que la contrainte résultant du couple magnétique reste dans des gammes physiologiques. C'est pour cela que la plupart des liens résistent au couple magnétique appliqué en MTC, permettant la mesure des propriétés mécaniques cellulaires. Pour l'AFM, l'étirement entre la sonde et la surface cellulaire est conduit jusqu'à la rupture complète des liens car les gammes étendues de forces et déplacements appliquées en AFM le permettent. La notion de force de rupture est donc adaptée en AFM même si le « temps de vie le plus probable » et la « force de rupture la plus probable » (liens individuels) restent des grandeurs proportionnelles. Les paragraphes suivants présentent successivement les outils théoriques utilisés pour analyser les propriétés mécaniques au niveau cellulaire et moléculaire puis les deux méthodes de mesure utilisées sur les cellules épithéliales respiratoires exposées à la toxine bactérienne CyaA.

3.4.1. Aspects théoriques communs

3.4.1.1. Analyse de l'adhésion multiple

L'adhésion cellulaire et son renforcement impliquent l'association d'un nombre croissant de liaisons transmembranaires (clustering des intégrines) qui suppose une architecture protéique intracellulaire complexe mettant en jeu des couplages multiples entre énergie chimique et énergie mécanique, laquelle dépend de la force appliquée. Comme il est rappelé dans le paragraphe 2.3.3, l'adhésion cellulaire est en effet médiée par des liens non-covalents de type récepteur-ligand réputés « faibles » comparé aux liens covalents. Les liens non covalents qui caractérisent l'adhésion doivent donc travailler collectivement afin de supporter les forces mécaniques intracellulaires ou extracellulaires (Bell 1978; Erdmann et al. 2008; Evans and Calderwood 2007). L'association des liens entre eux apparaît donc comme un processus indispensable au renforcement du site d'adhésion qui doit cependant garder son caractère aléatoire, ce qui est préservé dans le modèle en permettant aux liens individuels de conserver leur dynamique propre qui est de rompre de façon aléatoire. Ces liens associés mais dynamiquement indépendants sont appelés liens non coopératifs (Williams 2003). Cette association contribue très fortement à la stabilisation et au renforcement de l'adhésion (Isabey et al. 2013). Cet aspect de l'adhésion a été fortement occulté dans la littérature ; la seule façon de renforcer les liens est souvent attribuée à une fonction d'énergie chimique particulière conduisant à des comportements de type « catch bond » qui permettent un renforcement de chaque lien individuel à mesure que la force de rupture augmente (Evans and Calderwood 2007; Thomas, Vogel, and Sokurenko 2008). On notera que ce comportement ne s'observe que sur une plage de force nécessairement limitée. Ce seul mécanisme reste donc insuffisant pour atteindre les niveaux de renforcement nécessaires aux fonctions cellulaires.

On distingue classiquement différentes configurations simplifiées de liens et notamment les configurations « parallèle » et « zipper » qui vont avoir des performances différentes en termes de temps de vie et de renforcement. Dans la configuration « parallèle », la force appliquée sur la structure des liens collectifs est distribuée de façon homogène entre les liens existants et cela à chaque fois qu'un lien casse aléatoirement. À l'inverse, dans la configuration « zipper », la force exercée est distribuée de manière hétérogène puisque la totalité de la force se concentre sur le lien de tête et qu'après rupture de lien, la force est transférée sur le lien suivant, et ce, jusqu'à la rupture totale de l'ensemble des liens. Il apparaît que, la direction de la force appliquée (donc l'architecture du CSQ), sa distribution entre les liens, la configuration des liens en tant qu'organisation moléculaire et le nombre de liens, sont autant de facteurs pouvant modifier les performances d'un lien multiple. En première approximation, la MTC favorisant le cisaillement cellulaire, s'approcherait d'une configuration zipper alors que l'AFM faisant travailler les liens en étirement, correspondrait à une configuration parallèle (Isabey et al. 2013). Mais la configuration des liens reste à discuter pour chaque type d'expérimentation cellulaire en MTC compte tenu du champ des contraintes et des déformations 3D résultant du couple magnétique transmis par une bille partiellement immergée dans la cellule (Isabey et al. 2016).

La théorie des liens multiples que nous utilisons dans ce travail est une extrapolation de la théorie des liens simples. La théorie des liens multiples cherche à décrire un lien équivalent résumant le comportement de plusieurs liens simples associés. Kramer et Smoluchowski, considèrent que le temps de vie global d'un lien multiple nécessite de transiter à travers un nombre « n » de barrières énergétiques actives, (qui peuvent ou pas être de même hauteur). Le temps de vie global nécessaire pour franchir cette barrière complexe est la somme des temps nécessaires pour transiter à travers chaque barrière énergétique (Evans 1998; Evans 2001). En écrivant cette relation pour le taux de dissociation K_{off} représentant l'inverse du

temps de vie, il est possible d'écrire le taux de dissociation global comme indiqué dans l'équation (1). Dans cette équation, f représente la force totale appliquée sur la structure des liens associés, $t_{off}^0(n)$ représente le temps de vie naturel (à force nulle) de la barrière « n » qui dépend de la hauteur énergétique de chaque barrière chimique, et $f_\beta(n)$ représente une force de référence propre à chaque barrière telle que définie par l'équation (2).

$$(1) \quad K_{off} = \frac{1}{T_{off}(f)} = \frac{1}{\sum_{n=1}^N (t_{off}^0(n) \exp(-\frac{f}{f_\beta(n)}))}$$

$$(2) \quad f_\beta(n) = \frac{k_B T}{x_\beta(n)}$$

Le laboratoire a montré (Isabey et al. 2013) qu'un modèle de Bell, incluant une fonction exponentielle avec un préfacteur et un exposant, comme indiqué par l'équation (3) :

$$(3) \quad K_{off}(f) = K_{off}^0 \exp(\frac{f}{F_\beta})$$

permettrait d'approcher convenablement l'équation (1) dans le cas où les liens individuels ont tous la même barrière énergétique (celle d'une liaison intégrine-ligand par exemple), et le même degré d'activation. K_{off}^0 et F_β représentent respectivement le taux de dissociation naturel (à force nulle) et une force de référence du lien multiple. Cette approximation constitue une généralisation du comportement des liens simples en considérant que le comportement du lien multiple ne diffère pas fondamentalement de celui du lien simple sur le plan fonctionnel. En revanche, les coefficients (préfacteur et exposant) du modèle de Bell dépendent de la configuration et du nombre de liens.

Une configuration de liens travaillant en parallèle conduit à un taux de dissociation naturel faiblement dépendant du nombre de liens N , en effet :

$$(4) \quad K_{off}^0 \approx \frac{k_{off}^0}{\ln N} \quad \text{avec } N > 10 \text{ et } f \text{ tend vers } 0$$

ou encore,

$$(5) \quad K_{off}^0 \approx k_{off}^0 \sqrt{2} \left(\frac{f}{N f_\beta} \right)^{0.5} \quad \text{avec } N \geq 2 \text{ et } f \neq 0$$

Toujours dans le cas d'une configuration parallèle, la force de référence est proportionnelle à N et peut être donnée par l'expression : $F_\beta = N f_\beta$

À l'inverse, la configuration zipper a un taux de dissociation naturel inversement proportionnel à N :

$$(6) \quad K_{off}^0 = \frac{k_{off}^0}{N}$$

Et une force de référence qui est indépendante de N :

$$(7) \quad F_\beta = f_\beta$$

Remarque : les expressions (5) à (7) seront largement utilisées pour discuter les résultats expérimentaux obtenus sur cellules vivantes (en MTC et en AFM) tant en termes de configuration de liens que pour décrire l'évolution du nombre de liens entre des conditions biologiques différentes, en l'occurrence l'effet de CyaA sur ces paramètres.

Connaissant le taux de dissociation global, il est possible de décrire la cinétique des liens multiple considérant qu'elle obéit à un processus de Markov du premier ordre. On peut ainsi relier le taux de dissociation $K_{off}(t)$ à la probabilité de survie du lien notée $P(t)$ au moyen de l'équation (8) dans laquelle le processus de réassociation des liens est négligé en raison de grandes distances de séparation, (soit $K_{on}(t) = 0$).

$$(8) \quad \frac{dP(t)}{P(t)} = K_{off}(t)dt$$

La solution de l'équation (8) est classiquement obtenue par l'expression suivante :

$$(9) \quad P(t) = \exp\left[-\int_0^t K_{off}(f(t'))dt'\right]$$

Dans l'équation (9) apparait la fonction $f(t')$ qui décrit la façon dont la force appliquée varie avec le temps. Dépendant de la technique utilisée : MTC ou AFM, nous utilisons des fonctions de force différentes et notamment une force constante (créneau ou échelon trapézoïdal de force d'une durée de 1 min) en MTC et une force qui évolue lentement avec le temps (vitesse d'écartement constante) en AFM ce qui aboutit à des fonctions de probabilité de survie des liens de formes différentes [chapitre MTC dans le document annexe des publications].

Dans le premier cas (MTC), l'effort appliqué aux liens peut être assimilé à une expérience de maintien sous tension constante des liens d'adhésion (à l'image du clamp des liens simples proposé dans la littérature) (Evans and Kinoshita 2007) dans laquelle les liens sont soumis à la force $f = f_{cste}$, l'expression de la probabilité de survie des liens peut alors être obtenue par l'expression suivante :

$$(10) \quad P(t) = \exp\left[-K_{off}(f_{cste}) \cdot t\right] = \exp\left[-K_{off}^0 \cdot \exp\left(\frac{f_{cste}}{F_\beta}\right) \cdot t\right]$$

qui signifie que $K_{off}(f)$ peut être obtenu expérimentalement par la pente de la relation $\ln P(t) - t$.

Dans le deuxième cas (AFM), l'effort appliqué peut être assimilé en première approximation à une expérience de chargement avec un taux de chargement constant (rampe ou « loading rate »), c'est-à-dire,

$$(11) \quad df/dt = r_f = cste = \text{taux de chargement}$$

La probabilité de survie des liens n'est plus une simple exponentielle décroissante avec le temps mais révèle une décroissance de la probabilité de survie qui dépend du taux de chargement.

$$(12) \quad P(t) = \exp \left[- \frac{K_{off}^0 \cdot F_{\beta}}{r_f} \left(\exp \left(\frac{r_f t}{F_{\beta}} \right) - 1 \right) \right]$$

C'est précisément cette dépendance de r_f qui va permettre, en changeant le taux de chargement dans les expériences AFM, d'explorer la fonction $P(t)$ (Evans and Kinoshita 2007). Il faut noter que dans l'équation (12), $K_{off}^0 \cdot F_{\beta}$ définit une vitesse de chargement au-dessus de laquelle le lien est mis hors équilibre et va se dissocier plus vite que ne le prédit son temps de survie naturelle $1/K_{off}^0$ (Evans and Calderwood 2007).

Remarque : Puisque le comportement des liens multiples dépend du chargement, les résultats obtenus en AFM seront analysés en fonction du taux de chargement qu'il faudra estimer dans chaque expérience de façon aussi précise que possible comme indiqué plus loin.

3.4.1.2. Analyse des propriétés microrhéologiques

Les sollicitations mécaniques qui sont exercées en MTC et en AFM, sont réalisées avec des signaux de faibles contenus en fréquence et des fréquences fondamentales faibles (<1Hz) correspondant à des conditions quasi-statiques. Cette façon de procéder est un choix délibéré du laboratoire qui diffère de celui de la plupart des laboratoires de mécanique cellulaire qui privilégient des essais couvrant des gammes de fréquences s'étendant sur plusieurs décades. Cette approche « basse fréquence » permet d'une part d'analyser le comportement des cellules avec des modèles de solide viscoélastique très largement validés (modèle rhéologique de Voigt) car obtenus dans des plages de fréquence très limitées (voir paragraphe 2.4.2). Il est cependant admis que le comportement mécanique révélé par la MTC et l'AFM

ne correspond pas exactement au même système cellulaire. Les résultats MTC révèlent des contributions complémentaires des compartiments cortical et profond du cytosquelette (Laurent et al. 2003). Les résultats AFM obtenus par indentation révèlent le comportement plutôt cortical de la cellule avec une contribution variable du noyau (Caille et al. 2002; Sato et al. 2000).

De plus, sur la base des éléments théoriques développés ci-dessus, cette approche permet de révéler le comportement cinétique des liens situés à l'interface entre la sonde et la cellule. Le comportement de l'interface entre la sonde et la cellule a été largement ignoré dans les expériences de micromanipulation car le rôle de l'interface sonde-cellule est occulté dans les études de réponse en fréquence. Pourtant, cette interface bille-cellule est le lieu où les contraintes et les déformations sont maximales comme le montrent les simulations numériques effectuées notamment au laboratoire sur des systèmes bille-cellule (Ohayon et al. 2005). De façon intéressante, le rôle de l'interface sonde-cellule est traité comme le système prédominant dans les expériences de spectroscopie en AFM simple lien ou multi-liens. Les paramètres issus du comportement de cette interface (expériences de dé-adhésion) sont considérés comme représentatifs de l'état d'adhésion de la cellule avec la matrice extracellulaire. Une telle hypothèse est au cœur de notre démarche expérimentale tant en MTC qu'en AFM.

3.4.2. La magnétocytométrie (MTC)

La méthode MTC utilisée dans cette étude a été décrite en détail dans plusieurs publications (André Dias et al. 2018; Féréol et al. 2009; Féréol et al. 2006; Isabey et al. 2016, 2018; Laurent et al. 2003). Nous allons donc présenter brièvement la méthode MTC puisqu'elle fait l'objet de plusieurs travaux publiés.

3.4.2.1. Versant expérimental

La MTC permet de mesurer les propriétés viscoélastiques de la cellule à l'aide de microbilles ferromagnétiques fonctionnalisées par un ligand spécifiquement reconnu par les intégrines et permettant la liaison au cytosquelette (figure 22).

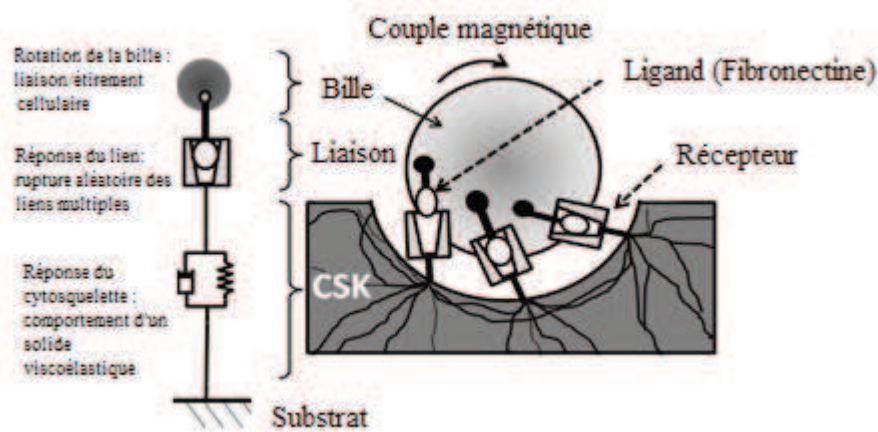


Figure 22 : Modèle multi-échelle comprenant les paramètres d'adhésion et les propriétés microrhéologiques pour analyser sur un même signal (i) la réponse de l'interface cellule-matrice et (ii) la réponse du cytosquelette après application d'un couple magnétique sur la bille

À gauche est représenté le modèle moléculaire et cellulaire utilisé pour l'analyse des données. La rhéologie cellulaire est représentée par un modèle de Voigt, de type solide viscoélastique adapté à des sollicitations couvrant une gamme de fréquence très limitée (dans notre cas, un signal trapézoïdal). À droite, il s'agit du schéma du système bille-cellule modélisé pour analyser les expériences de MTC.

Les différents composants du CSQ (les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules) contribuent, dans des proportions variables, à la résistance de la cellule face aux déformations imposées par la bille. Toutefois, la contribution apportée par la structure des filaments d'actine est prédominant comme cela a été montré dans l'étude initiale décrivant la méthode (Wang et al. 1993) et dans des travaux ultérieurs (Wang 1998). Dans cette étude, la réponse cellulaire au couple magnétique impliquant le cytosquelette d'actine est contrôlée de façon systématique par un traitement à la cytochalasine D connue pour bloquer la polymérisation de l'actine, et donc révèle un effet majeur sur la mécanique cellulaire mesuré en MTC.

La technique de MTC a été initialement proposée par l'équipe de N. Wang (Wang et al. 1993) et a été importée au laboratoire. Dans un article récemment publié (André Dias et al. 2018), nous avons montré que l'application d'un signal trapézoïdal (couple magnétique d'une durée d'une minute puis d'un temps de relaxation équivalent) permet de caractériser, en plus des propriétés viscoélastiques à basses fréquences, les paramètres de l'adhésion cellule-matrice, matrice matérialisée par la bille fonctionnalisée pour reconnaître les intégrines. L'analyse de la réponse cellulaire à ce signal MTC a donc été modifiée pour permettre une caractérisation de la réponse cellulaire viscoélastique et de l'adhésion (Isabey et al. 2016).

Le banc de magnétocytométrie comprend plusieurs éléments parmi lesquels : un système de magnétisation (par bobines de Helmholtz), des microbilles ferromagnétiques, un système de « twist » permettant de créer un champ magnétique uniforme (signal trapézoïdal) perpendiculaire au champ de magnétisation (bobines de Helmholtz), un appareil de mesure ultrasensible (sensibilité des sondes de 0.15 nT environ) du champ rémanent appelé magnétomètre de Föster ainsi qu'un système d'acquisition et de traitement du signal (figure 23) .

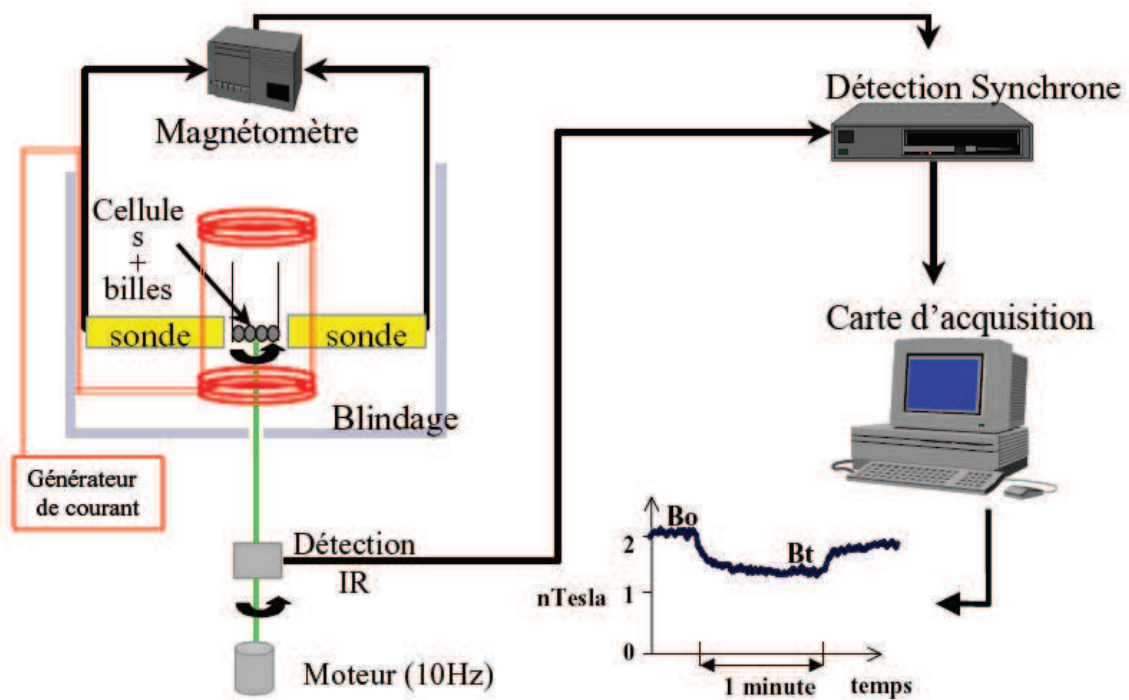


Figure 23: Les différents éléments du dispositif expérimental utilisé pour les mesures par magnétocytométrie. Banc construit au laboratoire selon les principes de la méthode initialement proposée par Wang et al. 1993

L'expérience de micromanipulation cellulaire par magnétocytométrie comporte 3 étapes décrites en figure 24. La première étape consiste à fixer les microbilles à la surface de la cellule. Ce sont les billes ferromagnétiques de $4,5\ \mu\text{m}$ de diamètre, recouverte d'un ligand spécifique reconnu par un récepteur transmembranaire, ici, les intégrines. Dans notre étude, le ligand utilisé est la fibronectine et est reconnue comme ligand matriciel par les intégrines cellulaires en relation avec le cytosquelette au travers de sites d'adhésion (comme par exemple, les points focaux d'adhésion). Les billes fonctionnalisées sont mises en présence des cellules durant 30 min, ce qui va permettre leur reconnaissance et leur fixation au niveau des intégrines et donc permettre une liaison physique (et chimique) avec le cytosquelette d'actine (figure 24A). Dans un second temps, les billes fixées sur la couche cellulaire sont magnétisées (dans la direction du plan de culture) à l'aide d'un champ magnétique élevé et

bref (150 mT pendant 150 ms) (figure 24B). Le couple magnétique C est donné par l'équation :

$$(13) \quad C = \mu_0 m H \sin \phi(t)$$

avec μ_0 : constante de perméabilité, m : valeur absolue du moment magnétique de la bille, H : valeur absolue du champ magnétique perpendiculaire, $\phi(t)$: angle entre le moment magnétique moyen des billes et la direction du champ perpendiculaire. À $t = 60$ s, un état de quasi-équilibre entre le couple appliqué et la réponse cellulaire est supposé être atteint.

H dépend de l'intensité du courant dans les bobines de Helmholtz qui génèrent un champ magnétique orienté verticalement ($H \leq 6,3$ mT) dont la valeur absolue est 20 fois inférieure au champ de magnétisation afin d'empêcher tout risque de re-magnétisation des billes (figure 24C).

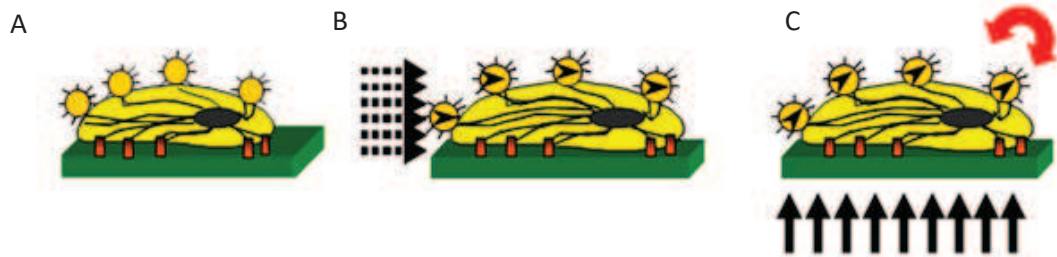


Figure 24 : Les trois étapes de la mesure par magnétocytométrie

A) Les billes ferromagnétiques sont fixées au cytosquelette par l'intermédiaire des récepteurs transmembranaires de type intégrines. **B)** Les billes sont magnétisées dans le plan de culture par un champ magnétique puissant et bref (150 mT, 150 ms). **C)** Les billes sont soumises à un champ magnétique vertical de plus faible intensité (6 mT maximum et 4,8 mT dans la plupart des expériences). Le couple généré pendant 1 min par ce champ magnétique appliqué sur les billes entraîne une rotation dont l'amplitude dépend des propriétés mécaniques du cytosquelette. Il est suivi d'une relaxation d'une durée équivalente.

L'estimation de la contrainte de ce couple a été largement discutée dans les publications du laboratoire. Les valeurs ne dépassent pas 50 Pa et restent ainsi dans une gamme de contraintes physiologiques (voir tableau 1 de *Supplementary Material* de Isabey et al. 2016). Dimensionnellement, la contrainte est obtenue par le rapport entre le couple appliqué et le volume de la bille. Pratiquement, il faut tenir compte des facteurs géométriques dus au fait

que les billes ne sont que partiellement immergées dans les cellules (demi-angle moyen d'immersion de 67° pour les cellules A549 étudiées) (Laurent et al. 2002). Ce couple magnétique induit une réponse cellulaire sous forme de déplacement du cytosquelette reflété par la déviation angulaire des microbilles, d'ailleurs mesurée au cours du temps à partir de la décroissance relative du champ rémanent des billes.

$$(14) \quad \theta(t) = \arccos(B(t) / B_0(1-x))$$

Ainsi, la réponse de la cellule en fonction du temps peut être représentée de façon équivalente en termes de décroissance du champ rémanent (figure 25) ou en termes de déviation angulaire au moyen de l'équation (14). La valeur de B_0 dans l'équation (14) est corrigée par le facteur $(1-x)$ pour prendre en compte le fait qu'une très faible proportion de billes ($x\%$) ne parvient pas à s'attacher au CSQ et ces billes vont donc s'aligner dans la direction du champ perpendiculaire dès l'instant de son application.

La valeur de la déviation angulaire à l'état de quasi-équilibre (après une minute de couple appliqué) dépend de la rigidité du cytosquelette alors que la rapidité avec laquelle cet état est atteint reflète le temps de relaxation. Sur la base des travaux de Balland (Balland et al. 2006), nous considérons que la cellule se comporte à chaque fréquence comme un solide viscoélastique avec un temps de relaxation viscoélastique caractéristique que nous évaluons en complément du module de rigidité.

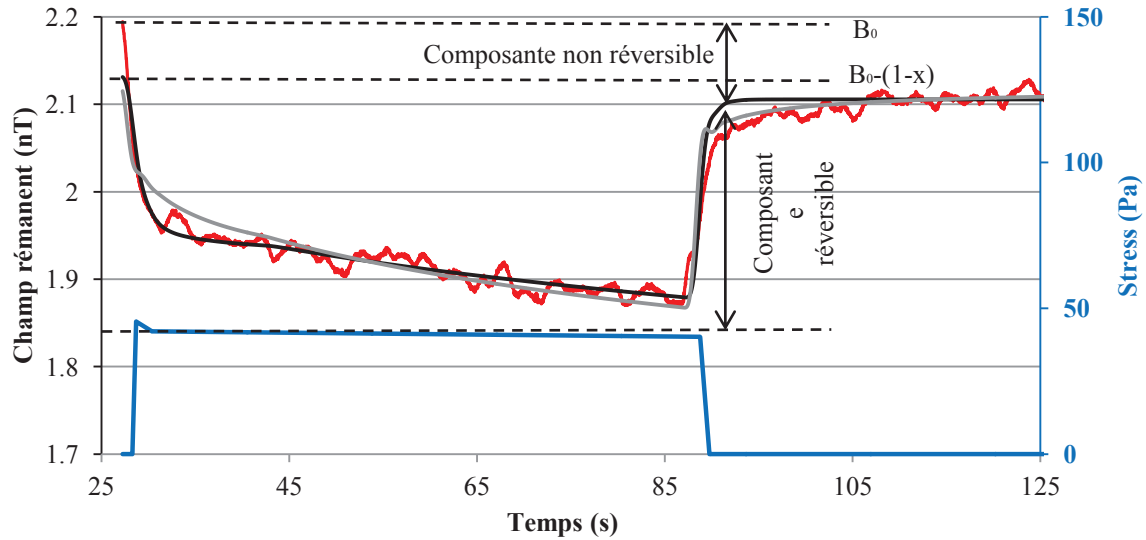


Figure 25 : Courbes de mesure du champ rémanent suite à l'application du couple magnétique

En rouge, signal brut obtenu lors d'une mesure en MTC sur les cellules A549. En bleu, signal quasi-trapézoïdal de la contrainte appliquée pendant une minute. Après l'application de cette contrainte, il y a une période de relaxation, ce qui permet de distinguer la partie réversible de la partie non réversible du signal. La composante réversible nous permet d'obtenir les propriétés mécaniques alors que la partie temps-dépendant de la composante non réversible nous fournit les paramètres d'adhésion.

Les puits contenant les cellules à tester avec les microbilles ferromagnétiques sont placés successivement dans le système de magnétisation décrit précédemment. Les puits sont ensuite placés au centre des deux sondes du magnétomètre et mis en rotation à une fréquence de 10 Hz pour permettre la détection synchrone. La mesure du champ rémanent dure deux fois 2,5 min et se fait en 3 étapes : une première période avant l'application du couple magnétique qui dure une trentaine de secondes ; la deuxième période qui correspond à l'étape d'application du couple magnétique (1 minute) ; une troisième période dite de relaxation suivant l'application du couple qui est enregistrée pendant une minute. Durant cette dernière phase, le champ rémanent mesuré par les sondes ne revient jamais à sa valeur initiale, ce qui signifie que les microbilles ne retournent pas à leur position initiale. Les travaux récents du laboratoire (André Dias et al. 2018; Isabey et al. 2016, 2018) ont privilégié le rôle de la dé-adhésion entre la bille et la cellule dans cette non réversibilité de l'ensemble bille-cellule. Cette hypothèse est validée par des arguments mécaniques et biologiques qui sont exposés dans l'article André Dias et al. 2018. Le détachement de certains liens sera analysé à l'aide

des modèles théoriques présentés précédemment afin d'aboutir à la détermination des paramètres d'adhésion qui caractérisent de façon globale les interactions cellule-matrice. En ce qui concerne la composante réversible, sa mise en relation avec la contrainte appliquée va permettre d'évaluer les propriétés microrhéologiques et notamment le module d'élasticité et le temps de relaxation viscoélastique.

3.4.2.2. *Versant modélisation*

Les propriétés mécaniques et les paramètres d'adhésion associés à ce modèle multi-échelles sont ajustés sur le signal expérimental de MTC par une procédure classique de minimisation des écarts. La méthode considère qu'à chaque instant t , l'angle de rotation de la bille représente la somme d'une composante réversible $\theta_R(t)$ et d'une composante non réversible $\theta_{NR}(t)$.

$$(15) \quad \theta(t) = \theta_{NR}(t) + \theta_R(t)$$

Ainsi, la composante non réversible fournit les paramètres clés de l'adhésion cellulaire tels que : 1) le taux de dissociation naturel K_{off}^0 (s-1) qui reflète l'énergie chimique de l'état d'adhésion entre les intégrines et le ligand matriciel modulé par le nombre de liens et leur configuration ; 2) la contrainte de référence σ_c (Pa) qui dépend de la configuration des liens et est proportionnelle à leur nombre (en configuration parallèle).

La composante réversible permet, quant à elle, d'obtenir les propriétés viscoélastiques de la structure du cytosquelette et notamment : le module élastique et le temps de relaxation viscoélastique.

Le non recouvrement de la position initiale de la bille est un phénomène systématiquement observé dans nos expériences comme dans de nombreuses expériences où les billes placées dans des champs magnétiques exercent des forces ou des couples sur des cellules adhérentes

(pince optiques, pince magnétiques, MTC) (O'Brien et al. 2008). De façon surprenante, ces phénomènes sont régulièrement attribués aux effets de plasticité interne de la cellule, sans considérer les phénomènes de surface (dé-adhésion) qui sont majeurs quand les déformations cellulaires induites le sont également (Bonakdar et al. 2016). En accord avec notre approche, qui elle, est surfacique, il est important de noter que la rupture des liens intracellulaires non covalents de type protéine-protéine a été proposée comme un potentiel mécanisme à la base de ces comportements plastiques intracellulaires et du comportement rhéologique sous forme d'une loi puissance variant lentement avec la fréquence (Chowdhury et al. 2008).

Le modèle utilisé pour quantifier ce phénomène de dé-adhésion est un modèle probabiliste tenant compte de la rupture aléatoire de liens multiples non coopératifs et pour lequel le modèle de Bell généralisé aux liens multiples, fournit une solution approchée satisfaisante (Isabey et al. 2013, 2016). Le taux de dissociation global qui décrit la dé-adhésion est supposé obéir au modèle de Bell (équation (3)) réécrit pour la contrainte (force par unité de surface de contact à l'interface bille/cellule) :

$$(16) \quad K_{off}(\sigma) = K_{off}^0 \exp\left(\frac{\sigma}{\sigma_c}\right)$$

La cinétique de rupture des liens multiples peut donc être caractérisée par un préfacteur K_{off}^0 appelé taux de dissociation naturel et par une contrainte de référence σ_c . En reprenant les équations (8) à (10) donnant la relation entre le taux de dissociation $K_{off}(\sigma)$ et la probabilité de survie du lien $P(t)$ en supposant un processus de Markov du premier ordre, nous nous apercevons que les valeurs de K_{off}^0 et de σ_c peuvent être obtenues en posant l'équation (17) comme expression de probabilité de survie,

$$(17) \quad P(t) = \cos(\theta_{NR}(t))$$

qui a l'avantage de prendre la valeur $P(t)=1$ pour $\theta_{NR}(t)=0$ (c'est-à-dire, pas de détachement) et la valeur $P(t)=0$ pour $\theta_{NR}(t)=90^\circ$ (c'est-à-dire, pour un détachement complet). La probabilité de survie des liens MTC reste proche de 1 et est généralement comprise entre 0.95 et 1. En réalité, la statistique des liens est faite sur un nombre minimal de ruptures, la contrainte appliquée en MTC restant dans des valeurs physiologiques comme indiquées précédemment. Il faut noter que les liens restés actifs (>95%) sont nécessaires pour réaliser la mesure des propriétés mécaniques et le retour vers la position initiale de la bille.

Les modèles microrhéologiques utilisés dans les expériences de MTC réalisées au laboratoire sont des modèles de solides viscoélastiques à un, deux ou « n » éléments. Dans notre étude, nous présentons les résultats obtenus avec un modèle rhéologique à un élément de Voigt, mais l'analyse des données est faite de façon systématique avec les trois modèles. Dans les publications du document annexe, nous utilisons le modèle viscoélastique à deux éléments dans Isabey et al. 2018 et les modèles à 1 et « n » éléments dans André Dias et al. 2018.

Dans le modèle simple Voigt, la cellule est considérée comme un solide viscoélastique. Il est constitué d'un ressort représentant le module élastique en parallèle avec un amortisseur représentant le module de perte. Le rapport du module de perte sur le module élastique donne le temps de relaxation viscoélastique en secondes. La relation (dans le régime linéaire de la déformation) entre la déformation (ou fluage) $\theta_R(t)$ et la contrainte σ dépend de l'histoire totale du lien jusqu'au temps t .

$$(18) \quad \theta_R(t) = c(t)\sigma_0 + \int_0^t c(t-t') \frac{d\sigma}{dt'} dt'$$

où $c(t)$ représente la fonction fluage (en réponse à un échelon de contrainte), normalisée par une contrainte de valeur constante σ_0 et $c(t)$ dépend du type de modèle rhéologique utilisé.

Pour le modèle simple Voigt, la fonction fluage est donnée par l'équation (19).

$$(19) \quad c(t) = \frac{1}{E} + \frac{t}{\eta} \quad \text{soit} \quad \theta_R(t) \approx \frac{\sigma_0}{E} (1 - \exp(-\frac{t}{T}))$$

E représente le module élastique du CSQ et η représente le module de perte lié au frottement visqueux entre les éléments du CSQ et le cytoplasme dans un volume confiné.

Enfin, $T = \frac{\eta}{E}$ représente le temps de relaxation caractéristique.

Pour le modèle double Voigt, la fonction fluage est donnée par l'équation (20) :

$$(20) \quad c(t) = \frac{1}{E_1} + \frac{1}{\eta_1} + \frac{1}{E_2} + \frac{1}{\eta_2} \quad \text{soit} \quad \theta_R(t) \approx \frac{\sigma_0}{E_1} (1 - \exp(-\frac{t}{T_1})) + \frac{\sigma_0}{E_2} (1 - \exp(-\frac{t}{T_2}))$$

E_1 , η_1 ou E_2 , η_2 sont les modules élastique et de perte caractérisant les compartiments rapide (CSQ cortical) et lent (CSQ profond) conduisant aux deux temps de relaxation

viscoélastiques : $T_1 = \frac{\eta_1}{E_1}$ et $T_2 = \frac{\eta_2}{E_2}$ avec $T_1 < T_2$.

Pour le modèle loi puissance, la fonction fluage est donnée par l'équation (21) :

$$(21) \quad c(t) = A_0 \left(\frac{t}{T_0} \right)^\alpha \quad \text{soit} \quad \theta_R(t) \approx \sigma_0 A_0 \left(\frac{t}{T_0} \right)^\alpha$$

T_0 est un temps de référence arbitrairement choisi à 1 s. La détermination de l'exposant α et du préfacteur A_0 , conduit au calcul de la norme d'un module viscoélastique complexe $|G_e|$ à 1

Hz :

$$(22) \quad |G_0| = \frac{(2\pi)^\alpha}{A_0 \Gamma(1+\alpha)} \quad \text{où} \quad \Gamma(1+\alpha) = \int_0^{+\infty} \exp(-x) x^\alpha dx$$

avec Γ , la fonction de Gamma Euler. Cette représentation en loi puissance correspond à une représentation sous la forme d'une série infinie de solides viscoélastiques de type Voigt, chacun étant caractérisé par un temps de relaxation T_k correspondant à chaque fréquence

étudiée (Balland et al. 2006). Ces multiples temps caractéristiques sont distribués selon une loi puissance idéale du type $T_k = T_m k^{\left(\frac{-1}{1-\alpha}\right)}$ avec T_m , le temps maximal de relaxation, soit environ 300 s pour une cellule de type A549.

Les modèles présentés par les équations (19) et (21) conduisent à la détermination de deux paramètres microrhéologiques (E et T ou α et $|G_0|$ (ou A_0)) alors que le modèle présenté par l'équation (20) conduit à la détermination de 4 paramètres microrhéologiques. L'ajout des deux paramètres d'adhésion K_{off}^0 et σ_c conduit à identifier respectivement 4 et 6 paramètres. Pour cela, une procédure classique d'optimisation est utilisée et est basée sur la méthode des moindres carrés utilisant l'algorithme de Levenberger-Marquart. Il faut donc souligner qu'aucune priorité n'est donnée dans l'ordre de détermination de ces 4 ou 6 paramètres. Les données qui sont marquées par un trop large bruit sont éliminées mais leur proportion ne dépasse pas 10% de l'ensemble des expériences. Pour toutes les autres, la corrélation obtenue par la procédure d'ajustement est supérieure à 95%.

Remarque : Dans un article publié en 2016 (Isabey et al. 2016), le laboratoire a démontré la validité de cette nouvelle méthode d'analyse en s'appuyant sur un ensemble de résultats expérimentaux obtenus par MTC sur des cellules épithéliales alvéolaires A549. L'utilisation du modèle « loi puissance » compromet la bonne détermination des paramètres d'adhésion, ce qui a été confirmé dans une étude récente sur les mêmes cellules testées dans un contexte différent (André Dias et al. 2018). Dans la suite de ce travail, nous nous limiterons à l'utilisation du simple Voigt qui en plus de donner des résultats biologiquement cohérents pour les propriétés mécaniques cellulaires, permet d'obtenir d'excellents résultats avec le modèle d'adhésion multiple.

3.4.3. La microscopie à force atomique (AFM)

La méthode utilisée pour caractériser les paramètres d'adhésion et les propriétés mécaniques des cellules A549 fait l'objet d'un travail spécifique qui a été publié en 2017 (Nguyen et al. 2017). Cette méthode a pour but de caractériser l'adhésion en prenant en compte trois aspects principaux, qui sont : (i) le rôle primordial des intégrines, (ii) la nature complexe des liens qui constituent un site d'adhésion cellulaire, et (iii) le rôle incontournable du taux de charge (*loading rate*) sur les paramètres cinétiques de l'adhésion que sont le taux de dissociation (ou son inverse, le temps de vie), ainsi que les forces de rupture que nous allons décrire dans ce paragraphe.

Notre démarche considère comme essentiels les trois critères que nous avons cherchés à satisfaire pour évaluer correctement l'adhésion cellulaire. Le premier est de réaliser une évaluation de l'adhésion spécifique des intégrines comme cela a été réalisé en MTC au moyen d'une fonctionnalisation spécifique de microbilles. Le deuxième est d'évaluer des liens en cours de renforcement, c'est-à-dire, des liens non isolés dans leur phase de développement et donc d'association entre intégrines. Ainsi, de nombreuses études sur les liens simples ont vu le jour ces dernières années (Evans and Kinoshita 2007; Li et al. 2003; Sun et al. 2005), mais très peu d'études expérimentales cherchent à évaluer les liens multiples (Rankl et al. 2008; Sulchek et al. 2005). Le troisième est d'évaluer ces liens dans leur contexte mécanique « réel » car leur cinétique en dépend au travers du taux de chargement, ce qui suppose de mesurer les propriétés mécaniques (locales et globales) dans les conditions de l'expérience de rupture. Plusieurs travaux récents ont proposé des solutions pour aller dans ce sens (Li et al. 2003; Taubenberger et al. 2007), dont nous nous sommes inspirés pour ce travail. En cherchant à satisfaire à ces trois critères, nous avons développé une nouvelle méthode d'évaluation des liens par AFM appelée spectroscopie de force des liens multiples (Multiple bound Force Spectroscopy ou MFS). Son application aux effets de CyaA sur l'adhésion des cellules épithéliales alvéolaires a permis de révéler des mécanismes qui

n'auraient pas pu être révélés avec les méthodes classiques telles que la spectroscopie de force des liens simples qui semble être la plus utilisée. Un article a été publié en 2017 pour présenter ces résultats (Angely et al. 2017).

3.4.3.1. *Versant expérimental*

Nous utilisons un banc AFM *de type Nano Wizard 1* (JPK Instruments). La tête AFM est montée sur un microscope inversé de type AxioObserver Z1 (Zeiss) (figure 26). Le microscope est équipé d'un objectif Zeiss EC-Plan-NEOFLUAR 20 $\times$. L'utilisation du module complémentaire appelé CellHesion (JPK Instruments) équipé d'une platine servo-commandée permet de réaliser des expériences de spectroscopie de force de longues distances, soit, jusqu'à 100 μm , condition indispensable pour les expériences de dé-adhésion par séparation. Ce module comprend un contrôleur électronique et un système piézo-électrique permettant un déplacement vertical servo-commandé de la platine. Les mesures ont été réalisées avec une sonde AFM de forme sphérique (6,6 μm de diamètre) de type SquBe CP-CONT-Sio C (Nanoandmore). Pour mesurer les propriétés mécaniques de la cellule, nous avons choisi une sonde sphérique pour ne pas léser la cellule, permettant à la fois (i) l'utilisation du modèle d'analyse de Hertz et Sneddon (Sneddon 1965) qui décrit la force comme fonction de l'indentation en prenant en considération les propriétés mécaniques du matériau (voir plus loin) et (ii) de créer plusieurs liens afin de caractériser l'adhésion cellulaire naissante à partir d'une multiplicité de liens. Cette sonde est montée sur un cantilever ou leviers de 100 à 300 μm de long, assimilés à un ressort linéaire de constante de raideur nominale de $k \sim 0.5 \text{ N/m}$. Il faut noter toutefois que ce paramètre nécessite une évaluation systématique qui a été réalisée par la méthode de l'oscillateur de bruit thermique (Butt and Jaschke 1995) constituant une procédure intégrée dans le logiciel d'interface fourni par JPK Instruments. La valeur de la raideur a été obtenue avec une erreur inférieure à 20%. La sensibilité de la technique est de l'ordre du pN. Elle est limitée par le bruit thermique du

système ainsi que par la raideur k du cantilever. En dépit de ces limites, la gamme de forces accessible (1 pN- 10 mN), fait de l'AFM un outil adapté à la mesure des forces de rupture aux différentes échelles, alors que le dispositif permet de générer une direction des efforts appliqués sur les liens qui permet de maintenir une configuration parallèle.



Figure 26 : Tête AFM de type Nano-Wizard 1 de la marque JPK Instruments montée sur un microscope inversé de type AxioObserver Z1 de la marque Zeiss

La sonde sphérique est fonctionnalisée avec un ligand (peptide RGD) à une concentration de 2,5 mg/ml. Le peptide RGD qui recouvre la sonde sphérique utilisée dans nos expériences permet de créer des liaisons avec les intégrines de la surface cellulaire des cellules épithéliales alvéolaires. Chimiquement, le peptide RGD dispose à chacune des extrémités, d'un groupement amine et d'un groupement carboxylique libres. À la surface de la sonde, lors du traitement, nous créons des groupements $-OH$ et $-COOH$, ce qui permet aux groupements libres du peptide de s'accrocher à la sonde par des liaisons covalentes par nature très résistante. Les avantages du peptide RGD sont multiples : il n'y a pas de réponse immunitaire induite, ni de risque d'infection ; ce peptide dispose d'une grande stabilité ; le motif RGD permet la liaison non covalente avec les intégrines (à l'image des adhésions

cellule-matrice), ce qui nous permet d'étudier l'adhésion dans les conditions les plus fréquemment rencontrées dans la réalité biologique.

Des essais préliminaires (présentés dans les résultats) ont montré l'importance du traitement réalisé dans le cadre de la préparation de la sonde (Nguyen et al. 2017). Un nettoyage classique (Triton et alcool) étant apparu rapidement insuffisant, le laboratoire s'est équipé d'un four à plasma (Harrick Plasma Cleaner-PDC-002-HPCE) permettant d'une part de retirer les micro-organismes contaminant la surface de la sonde et d'autre part, de rendre la surface de la sonde hydrophile, ce qui se révèle nécessaire à son revêtement par le peptide RGD.

Le protocole utilisé pour mesurer, dans une même épreuve d'« indentation-pause-rétraction », les propriétés mécaniques et les paramètres d'adhésion est présenté en figure 27. Le signal comporte trois phases : (1) une phase d'approche avant contact puis indentation utilisée pour mesurer les propriétés mécaniques, (2) une phase de pause permettant la génération des contacts entre la sonde et la cellule, et (3) une phase de rétraction permettant de caractériser l'adhésion.

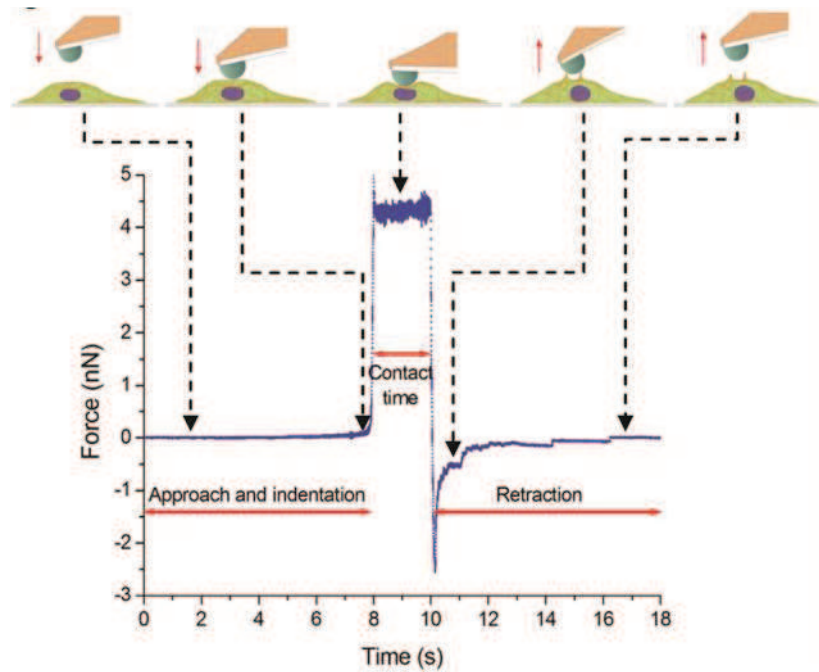


Figure 27 : Stratégie de mesure des paramètres de mécanique et d'adhésion par une spectroscopie de force dédiée aux liens multiples en AFM.

(D'après Nguyen et al. 2017)

Le déplacement de la sonde s'effectue à une vitesse imposée tant en indentation qu'en séparation. Des valeurs de vitesse de 2, 5 et 10 $\mu\text{m/s}$ ont été testées (5 $\mu\text{m/s}$ sur la figure 27). Ces valeurs sont considérées comme modérées. Elles garantissent une réponse quasi-statique de la cellule et de la sonde tout en permettant de minimiser la durée des expériences (30 secondes au maximum) afin de ne pas risquer des changements de forme cellulaires inhérents aux processus permanents de remodelage. À ces vitesses, le frottement induit par le déplacement de la sonde dans le liquide de culture est négligeable à 2 et 5 $\mu\text{m/s}$ et inférieur à 10 pN pour la vitesse la plus élevée (10 $\mu\text{m/s}$), ce qui conduit à une erreur inférieure à 10% dans l'estimation des forces de rupture.

Une force de compression dite « force de contact » de 5 nN maximum pendant 2 s est imposée par le système comme le montre le signal force-temps sur la figure 27. Cette durée a été fixée après une étude préliminaire sur des liens non spécifiques, laquelle visait à trouver le meilleur compromis entre un nombre suffisant d'événements de rupture et une rupture

complète de tous les liens dans la phase de rétraction de la sonde. Dans cette étude préliminaire, des temps de contact de 3, 10, 15 et 20 s ont été testés pour une vitesse d'approche et de retrait de 5 $\mu\text{m/s}$. Si ces différents temps de contact n'ont pas d'effet sur la hauteur des forces de ruptures mesurées, ils en ont sur le nombre moyen d'évènements de rupture par courbe de retrait et donc sur la force de détachement globale.

Remarque : Cette étude préliminaire (réalisée avant l'acquisition du four à plasma) a montré que des temps de contact supérieurs ou égaux à 3 s n'avaient pas d'effet sur la statistique des forces de rupture mais en avaient sur le nombre d'évènements de rupture. Un temps de contact de 2 s a finalement été choisi comme un bon compromis pour observer une dynamique de rupture complète du lien collectif nouvellement créé.

Compte tenu des propriétés cellulaires, la sonde sphérique soumise à la force de contact de 5 nN génère une indentation cellulaire h de l'ordre de 1 μm correspondant à des déformations cellulaires inférieures à 20% (pour les hauteurs cellulaires de l'ordre de 5 μm en moyenne, voir *Supplementary Material* dans Angely et al. 2017). Cependant, pour la mesure du module d'élasticité, les hauteurs d'indentation sont volontairement limitées à 0,5 μm correspondant à une indentation de 10 % maximum. C'est dans cette gamme de petites déformations que nous appliquons la loi de Hertz. La force d'indentation verticale F est reliée par le modèle de Hertz à la profondeur d'indentation h , ce qui permet une estimation du module effectif E_{eff} du système sonde/cellule qui diffère du module de la cellule seule :

$$(23) \quad F = \frac{4\sqrt{R}}{3} E_{\text{eff}} h^{3/2}$$

E_{eff} qui correspond au module d'élasticité effectif, est obtenu par l'expression suivante (Kuznetsova et al. 2007) :

$$(24) \quad \frac{1}{E_{eff}} = \frac{1-\nu_{probe}^2}{E_{probe}} + \frac{1-\nu_{cell}^2}{E_{cell}}$$

avec E_{probe} , ν_{probe} , E_{cell} , ν_{cell} sont respectivement les modules d'élasticité et les coefficients de Poisson de la sonde et du milieu cellulaire. En pratique, la sonde est infiniment rigide comparée à la cellule, ce qui conduit à : $E_{eff} \approx E_{cell} / (1-\nu_{cell}^2)$. En prenant $\nu_{cell} = 0,5$ (Radmacher 2002), l'équation (23) devient :

$$(25) \quad F \approx \frac{16\sqrt{R}}{9} E_{cell} h^{3/2}$$

E_{cell} peut donc être obtenu à partir du meilleur ajustement de cette équation sur la relation force-distance en deçà de 0.5 μm d'indentation (figure 28). Il faut noter également que pour une indentation $h \leq 0.5 \mu\text{m}$, nous considérons que la contribution du substrat est négligeable. De plus, pour limiter un effet trop important des hétérogénéités intercellulaires, les indentations sont systématiquement réalisées sur la face apicale de la cellule et au-dessus de la région relativement plane du noyau de la cellule. Enfin, dans le but de minimiser le « stress » induit par la sollicitation mécanique, chaque manœuvre d'indentation-pause-rétraction est réalisée une seule fois par cellule, ce qui a permis de tester un grand nombre de cellules pour chaque cellule (entre 40 et 60 cellules).

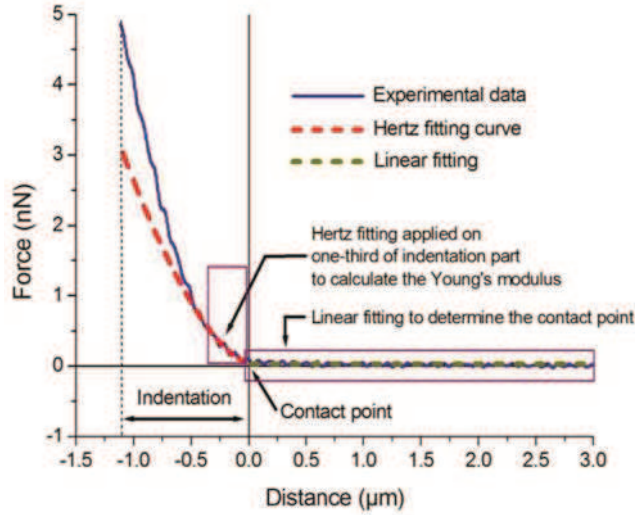


Figure 28 : Courbe force-distance utilisée pour calculer la rigidité cellulaire sur une cellule donnée.
(D'après Nguyen et al. 2017)

Compte tenu de l'importance du taux de chargement (*loading rate*) sur la résistance des liens moléculaires, une estimation du paramètre (r_f) a été faite au cas par cas (cellule par cellule, évènement de rupture par évènement de rupture) à partir du produit entre la vitesse de séparation v et la rigidité cellulaire locale ou globale :

$$(26) \quad r_f = \frac{df}{dt} = \frac{df}{dx} \frac{dx}{dt} = k_{eff} \times v$$

Nous noterons que la vitesse de séparation v étant maintenue constante au cours de chaque expérience, le taux de chargement r_f peut être considéré comme constant puisque les propriétés mécaniques sont elles aussi constantes en raison de la durée limitée de chaque manœuvre. Dans le but de tester une plus grande gamme de taux de chargement, nous avons testé plusieurs vitesses de séparation : $v=2, 5$ ou $10 \mu\text{m/s}$. Il faut noter également que contrairement à la vitesse de séparation entre la cellule et la sonde qui est prédéterminée, les paramètres mécaniques ne sont pas contrôlés par le dispositif expérimental mais dépendent de chaque condition. Ainsi, l'estimation de la rigidité effective notée k_{eff} est une étape

complexe qui doit prendre en compte les propriétés mécaniques du cantilever de l'AFM mais également la structure cellulaire des liens collectifs auxquels nous nous intéressons. À partir de l'expression suivante (Odorico et al. 2007) :

$$(27) \quad k_{eff} = \left[\frac{1}{k_{cant}} + \frac{1}{k_{cell}} \right]^{-1}$$

avec k_{cant} , représentant la constante de raideur du cantilever ($\approx 0,5$ N/m) et k_{cell} ($\sim 10^{-3}$ N/m cellule entière et $\sim 10^{-4}$ N/m), représentant la constante de raideur de la cellule et/ou du système moléculaire connecté au cantilever. Dans nos expériences, nous avons : $k_{cant} \gg k_{cell}$, ce qui implique que $k_{eff} \approx k_{cell}$ aux échelles globale et locale. Ainsi, il en résulte l'expression suivante :

$$(28) \quad r_f = k_{cell} \times \nu$$

Pour évaluer expérimentalement r_f , nous avons besoin de calculer la raideur cellulaire/moléculaire aux deux échelles locale et globale.

À l'échelle dite « globale », ou cellulaire, la raideur cellulaire a été déterminée à partir du produit entre le module d'élasticité E_{cell} dont la valeur est estimée par l'équation (25) (figure 28) et une échelle de déformation cellulaire caractéristique notée δ . Cette distance a été estimée au niveau cellulaire à partir du rapport entre le travail d'adhésion et la force de détachement maximale mesurée au cours d'une manœuvre complète de spectroscopie. Il convient de souligner que cette méthode est apparue plus fiable que celle basée sur une mesure arbitraire de la dérivée locale de la courbe force-distance.

À l'échelle dite « locale » ou moléculaire, la raideur cellulaire/moléculaire a été déterminée par la pente de la droite ajustée sur la partie linéaire de la courbe force-distance dans la phase de rétraction précédant le point de rupture d'un lien (figure 29).

$$(29) \quad k_{local} = \frac{df}{dx}$$

Cette pente permet une estimation de la raideur cellulaire/moléculaire, juste avant l'évènement local de rupture (figure 29).

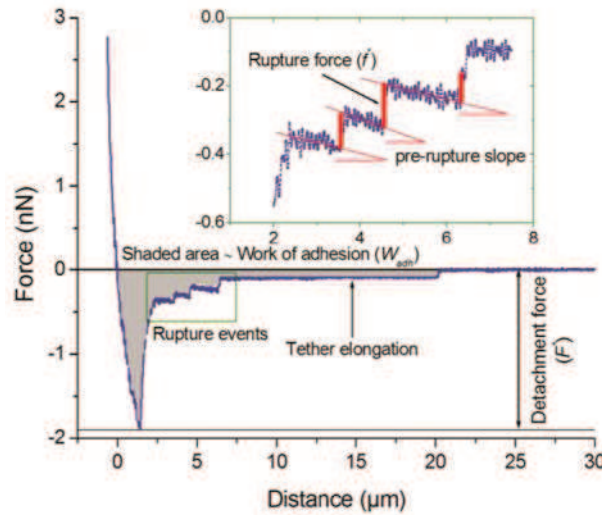


Figure 29 : courbe force-distance dans la phase de rétraction montrant les paramètres d'adhésion sont obtenus à l'échelle globale pour une cellule donnée et à l'échelle locale pour un évènement de rupture donnée. (D'après Nguyen et al. 2017)

À partir de la courbe force-distance (en bleu sur la figure 29) dans la phase de rétraction de la sonde, nous avons déterminé un certain nombre de paramètres de l'adhésion tels que : au niveau des paramètres globaux : (1) la force de détachement maximale, notée F^* , dans la gamme des nN correspondant à la valeur absolue de la plus grande valeur négative enregistrée au cours de la phase de rétraction (*detachment force* sur la figure 29), (2) le travail d'adhésion W_{adh} en $\text{nN} \times \mu\text{m}$ correspondant au travail global d'adhésion (surface grisée sur la figure 29), et au niveau des évènements de rupture locaux : (1) la force de rupture f^* dans la

gamme des pN qui est donnée par la hauteur de saut, et (2) la raideur cellulaire/moléculaire locale qui est donnée par la valeur de la pente négative qui précède la rupture (encadré de la figure 29). Dans le cas d'une pente nulle ou presque nulle, il n'est pas possible d'estimer une telle pente. Cette situation est interprétée comme le dépliage d'une attache membranaire ou tether (Evans and Calderwood 2007), empêchant de faire rentrer cet événement de rupture dans la statistique des ruptures locales (Taubenberger et al. 2007).

Remarque 1 : dans l'article Nguyen et al. (2017), nous apportons un nombre d'arguments important démontrant que F^* correspond à la force maximale qu'un lien collectif ou multiple peut supporter. Le travail d'adhésion W_{adh} correspond à une convolution entre la rigidité cellulaire et les énergies mises en jeu par l'ensemble des liens jusqu'à rupture complète. En revanche, nous avons montré que les valeurs de f^* correspondent à des ruptures de liens intégrine-ligand individuels. Cette approche permet la comparaison avec la force de rupture d'un système de liens multiples (F^*) et la force de rupture d'un lien individuel (f^*) mais la dépendance de chacun de ces paramètres de leur taux de chargement dans la comparaison directe difficile. C'est la raison pour laquelle les paramètres de l'adhésion seront finalement déduit des relations respectives $F^* - r_f$ et $f^* - r_f$.

Remarque 2 : L'adhésion est un phénomène statistique qui nécessiterait de répéter un grand nombre de fois la mesure sur chaque cellule ou pour chaque événement de rupture. La biologie interdit une telle procédure car les phénomènes étudiés sont dépendants de l'histoire qui précède. La solution que nous avons adoptée a été de considérer la loi des grands nombres qui nous dit que des mesures effectuées sur un grand nombre de points (différentes cellules et/ou différentes ruptures) permettre

d'approcher les relations d'un point de vue statistique et de les comparer avec les prédictions théoriques données pour les liens individuels et pour les liens multiples (voir paragraphe suivant).

3.4.3.2. Versant théorique

L'application d'une même rampe de force sur des liens multiples permet, comme pour les liens simples (Evans and Kinoshita 2007), de déterminer le profil énergétique à mesure que la force augmente.

La force de rupture la plus probable notée F^* est obtenue, comme à l'exemple du lien simple, en recherchant la valeur de la force pour la densité de probabilité notée $p(f)$ s'annule :

$$(30) \quad p(f)_{f=F^*} = \left[\frac{\partial P(f)}{\partial f} \right]_{f=F^*} = 0$$

F^* doit satisfaire alors à la condition suivante :

$$(31) \quad \left[\frac{K_{off}(f)}{r_f} \right]_{f=F^*} = \left[\frac{\partial(\ln(K_{off}(f)))}{\partial f} - \frac{\partial(\ln(r_f))}{\partial f} \right]_{f=F^*}$$

Si l'on suppose que $\frac{\partial(\ln(r_f))}{\partial f} \approx 0$ (en considérant que le taux de chargement ou *loading rate*

r_f constant ou faiblement variable avec la force) et que l'on utilise l'expression de $K_{off}(f)$ donnée par le modèle de Bell généralisé (équation (3)), nous obtenons l'équation suivante :

$$(32) \quad \left[K_{off}^0 \exp\left(\frac{f}{F_\beta}\right) \right]_{f=F^*} = \frac{r_f}{F_\beta}$$

À partir de l'équation (14), il est alors possible de déterminer la force de rupture la plus probable. Elle est donnée par l'équation suivante :

$$(33) \quad F^* \approx F_\beta \ln \left[\frac{r_f}{K_{off}^0 F_\beta} \right]$$

Cette dernière équation permet d'une part, d'obtenir les valeurs de F_β expérimentalement à partir de la pente de la relation linéaire suivante : $F^* - \ln[r_f]$ (en utilisant la méthode des moindres carrés) et d'autre part, de déterminer la valeur de K_{off}^0 par extrapolation au niveau de l'intersection de la droite avec l'axe vertical du graphique, soit :

$$\left[F^* \right]_{\ln(r_f)=0} = -F_\beta \ln(K_{off}^0 F_\beta).$$

Remarque : Ces résultats seront utilisés pour analyser les données expérimentales avec ou sans exposition à CyaA car ils constituent selon nous la façon la plus fiable (car non biaisée par la dépendance du taux de chargement) de déterminer les paramètres clés de l'adhésion. Il faut noter que F^* tout comme f^* vont dépendre indépendamment du taux de chargement local et donc de leur propre environnement mécanique.

$K_{off}^0 F_\beta$ dans l'équation (33) apparaît comme une grandeur de référence pour le taux de chargement r_f . Dans l'équation (33), r_f représente le taux de chargement effectif appliqué sur l'ensemble du lien multiple. Il convient de souligner que l'expression de la force de rupture pour les liens multiples (équation (33)) ressemble à celle des liens simples (Evans 1998; Evans and Ritchie 1997) :

$$(34) \quad f^* \approx f_\beta \ln \left[\frac{r_f}{k_{off}^0 f_\beta} \right]$$

Dans la pratique, r_f (bien que noté de la même façon) correspond ici au taux de chargement local et non pas global. Il correspond donc aux conditions mécaniques locales. En effet, dans le cas d'une configuration de liens « parallèle », le taux de chargement effectif appliqué sur chaque lien individuel est divisé par le nombre de liens actifs (que nous noterons N), ce qui donne comme taux de chargement : $\frac{r_f}{N}$, la force étant redistribuée entre tous les liens restants à chaque évènement de rupture (Rankl et al. 2008).

Remarque : La conséquence de cette différence entre le taux de chargement du lien simple et celui du lien collectif est que l'évaluation du taux de chargement doit être spécifique du lien simple et du lien collectif mais également spécifique pour chaque lien simple.

En utilisant les expressions ci-dessus, il est possible de comparer théoriquement F^* et f^* pour une configuration parallèle et un même taux de chargement (Nguyen et al. 2017), ce qui conduit à l'expression suivante :

$$(35) \quad F^* = Nf^* - \varepsilon Nf_\beta \quad \text{avec } \varepsilon < 1 \text{ et } N \geq 2$$

Cette expression suggère que la force de rupture la plus probable du lien multiple configuré en parallèle est N fois la force de rupture du lien individuel.

En revanche, pour la configuration zipper, nous obtenons une force F^* qui évolue beaucoup plus lentement avec le nombre de liens associés :

$$(36) \quad F^* = f^* + f_\beta \ln N$$

Remarque : Ces équations démontrent que la force de rupture de liens identiques et collectifs est beaucoup plus grande lorsqu'ils sont associés en parallèle que lorsqu'ils

sont en configuration zipper. La spectroscopie en AFM permet de tester l'efficacité du renforcement des liens collectifs permise par la configuration parallèle.

3.5. Tests statistiques

La comparaison des valeurs moyennes entre les différentes conditions biologiques testées a été réalisée à l'aide du logiciel de statistiques STATISTICA (version 7.1, StatSoft, France) en utilisant le test non paramétrique Kruskal-Wallis. La signification de 1, 2 ou 3 étoile(s) correspond aux valeurs du petit p, respectivement 0.05, 0.01 et 0.001, matérialisée par des lignes noires horizontales.

Concernant les boîtes à moustache, le point matérialisé dans le rectangle correspond à la valeur moyenne, les barres horizontales du rectangle correspondent aux valeurs minimales et maximales, la barre horizontale à l'intérieur du rectangle correspond à la médiane, et à l'extérieur se situent les barres d'erreurs.

Dans le cas des histogrammes, les barres d'erreurs correspondent aux erreurs types ($\pm$ SEM).

4. RESULTATS ET DISCUSSION

Ce chapitre présente les résultats obtenus sur le modèle d'intoxication spécifiquement développé pour cette étude dans le but de caractériser les effets cellulaires de la toxine adénylate cyclase (CyaA) de *Bordetella pertussis* à partir d'une analyse fine des propriétés structurales, mécaniques et adhésives des cellules épithéliales respiratoires. Comme indiqué dans l'étude bibliographique, la toxine étudiée possède des propriétés assez singulières qui la rendent unique notamment en raison d'une capacité invasive multiforme qui est dirigée vers plusieurs types de cellules eucaryotes (mais également les hématies) qui peut être récepteur dépendante (*via* $\alpha_M\beta_2$, comme pour les cellules de l'immunité dont les macrophages) ou récepteur indépendante (comme pour les cellules épithéliales respiratoires). À cela s'ajoute le fait que CyaA possède une activité adénylate cyclase activable par la calmoduline endogène des cellules cibles. Ces bouleversements fonctionnels induits par CyaA sont structurellement et fonctionnellement indépendants et les cinétiques, qu'il s'agisse d'invasivité ou d'action de la toxine, semblent très rapides, sans phase de latence (Khelef, Sakamoto, and Guiso 1992), d'où le choix de la présente étude de considérer en priorité les phases précoces de l'intoxication par la toxine bactérienne.

La première partie de ce chapitre présente une étude préliminaire visant à déterminer la forme structurale de CyaA la plus efficace ainsi que les concentrations à utiliser à partir de différents tests de viabilité. La seconde partie présente l'analyse des processus cellulaires et leur altération lors d'une exposition prolongée à la toxine CyaA. Nous examinons notamment la migration dans le contexte de la réparation d'une lésion de la monocouche formée par les cellules épithéliales alvéolaires, de cellules épithéliales nasales humaines, mais aussi dans le cas d'un modèle original de co-culture de cellules épithéliales alvéolaires en présence de macrophages. Les effets de CyaA sur la perméabilité des jonctions latérales et sur le

battement ciliaire des cellules épithéliales nasales humaines sont également examinés dans ce même paragraphe. Une troisième partie présente une analyse structurale de cellules épithéliales alvéolaires exposées à CyaA. La structure de l'actine ainsi que les points focaux d'adhésion (nombre, taille) ont été marqués dans le but d'observer des modifications potentielles de la forme et de l'adhésion cellulaire au cours de l'intoxication. Une reconstruction 3D de la forme de la cellule a également été réalisée à partir de coupes optiques obtenues en microscopie confocale sur les cellules A549 fixées et marquées. Enfin, dans une quatrième partie de ce chapitre est présentée l'analyse des propriétés mécaniques et adhésives des cellules exposées à CyaA au moyen d'outils de macro/nanomanipulation tels que la magnétocytométrie (MTC), la spectroscopie de force par la microscopie à force atomique (AFM) et de méthodes d'analyse spécifiquement développées au laboratoire et notamment dans le cadre de cette thèse.

Chaque résultat fait l'objet d'une discussion spécifique et une discussion générale sur l'ensemble de ce travail de thèse est présentée dans le chapitre suivant.

4.1. Étude préliminaire : évaluation de la toxicité de CyaA et de son activité adénylate cyclase sur les cellules épithéliales alvéolaires

4.1.1. Choix de la forme de CyaA

Lors de l'initiation du projet en 2015, l'équipe de l'Institut Pasteur, avec qui nous collaborons depuis le début de ce travail, a mis à notre disposition deux formes de CyaA : la forme multimérique (dépliée) et la forme monomérique (repliée). Le but est donc de déterminer quelle forme de CyaA est la plus adaptée à nos expériences. Un test au MTT a été réalisé afin d'évaluer la toxicité de chacune de ces deux formes.

Le modèle de culture utilisé dans cet ensemble d'expériences est celui des cellules épithéliales alvéolaires d'origine humaine issues d'un cancer pulmonaire (A549). Ces cellules sont bien connues du laboratoire, bien caractérisées pour leur phénotype proche des

pneumocytes II alvéolaires, faciles à manipuler (formant une monocouche et ayant perdu leur capacité à sécréter du surfactant) et donc tout à fait adaptées à notre étude.

Les figures 30 et 31 montrent les niveaux moyens d'absorbance du MTT (solution jaune se transformant en cristal violet au contact des cellules vivantes) pour une exposition cellulaire à une large gamme de concentrations (0.5 ; 1 ; 3 ; 5 ; 7 et 10 nM) de la toxine CyaA multimérique et de la toxine CyaA monomérique durant 1 heure.

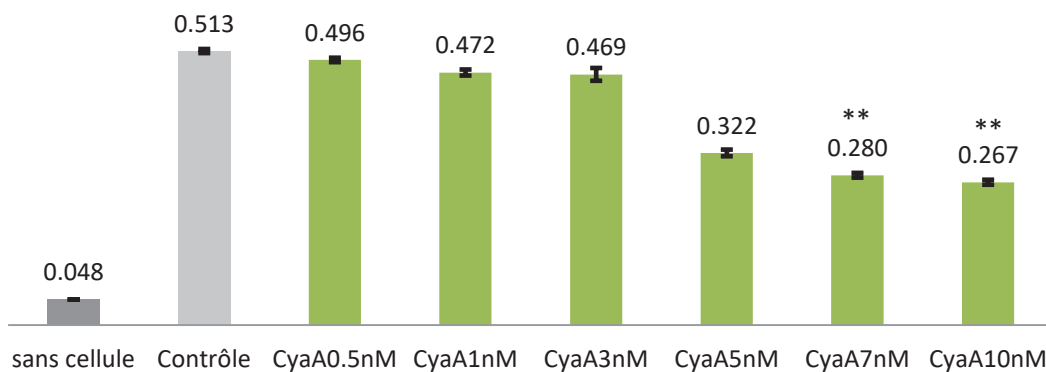


Figure 30 : Mesure de l'absorbance moyenne du MTT pour différentes concentrations de CyaA multimérique pour un temps d'exposition de 1heure sur une culture de A549

L'absorbance du MTT a été mesurée (par spectrophotométrie à 550 nm) en condition contrôle et pour différentes concentrations de CyaA multimérique (0.5, 1, 3, 5, 7 et 10 nM) pour un temps d'exposition de 60 min (n=8). L'absorbance est proportionnelle au nombre de cellules vivantes (voir le chapitre *Matériel et Méthodes*). Ce graphique montre que plus la concentration de CyaA multimérique augmente, plus le nombre de cellules vivantes A549 diminue. Les différences sont significatives aux plus fortes doses (7 et 10 nM). La colonne intitulée « sans cellule » montre une absorbance proche de zéro (témoin de marche). ± SEM en barre d'erreur. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$.

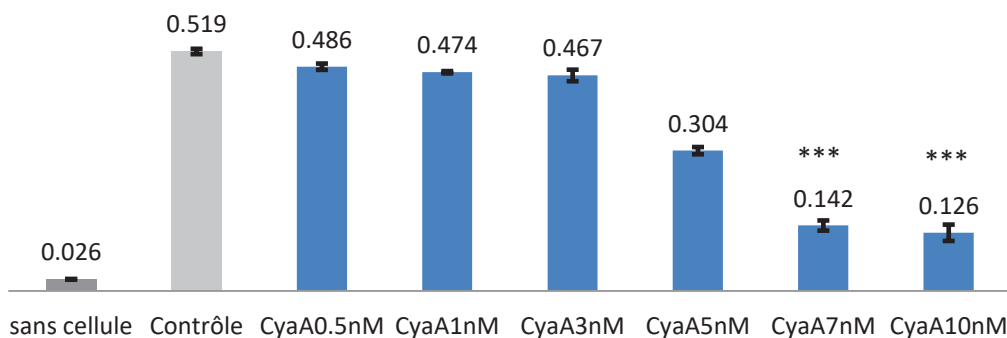


Figure 31 : Mesure de l'absorbance moyenne du MTT pour différentes concentrations de CyaA monomérique pour un temps d'exposition de 1heure sur une culture de A549

L'absorbance du MTT a été mesurée (par spectrophotométrie à 550 nm) en condition contrôle et pour différentes concentrations de CyaA monomérique (0.5, 1, 3, 5, 7 et 10 nM) pour un temps d'exposition de 60

min (n=8). L'absorbance est proportionnelle au nombre de cellules vivantes (voir le chapitre *Matériel et Méthodes*). Ce graphique montre que plus la concentration de CyaA monomérique augmente, plus le nombre de cellules vivantes A549 diminue de façon beaucoup plus marquée en particulier aux fortes doses (7 et 10 nM) où les valeurs sont fortement diminuées par rapport au CyaA multimérique. La colonne intitulée « sans cellule » montre une absorbance proche de zéro (témoin de marche). $\pm$ SEM en barre d'erreur. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$.

Les résultats présentés en figures 30 et 31 montrent tout d'abord que les cellules épithéliales alvéolaires (A549) sont sensibles à la toxine CyaA quelle que soit sa forme mono ou multimérique. En effet, la toxine affecte la viabilité cellulaire de façon significative aux fortes doses (7 et 10 nM) avec toutefois un effet-dose non significatif dès les faibles doses. Il est cependant important de noter qu'en dépit de cette perte de viabilité cellulaire dose-dépendante, une majorité de cellules reste viable après 1 heure d'exposition aux faibles doses. Ces tests confirment la toxicité de CyaA sur le modèle cellulaire choisi.

Remarque : De ces résultats avec le test au MTT, nous pouvons conclure que la toxine monomérique repliée semble plus active que la forme multimérique, tout en laissant un nombre important de cellules viables aux faibles concentrations de CyaA. C'est la raison pour laquelle les expériences à venir ont toutes été réalisées avec la forme monomérique repliée de CyaA.

4.1.2. Choix des concentrations et temps d'exposition optimaux de CyaA

La gamme de concentration comprise entre 0.5 à 10 nM peut être considérée comme physiopathologique d'après l'équipe d'Eby (Eby et al. 2013). Cependant, les mesures d'absorbance du MTT effectuées précédemment font apparaître un aspect de courbe sigmoïde (double plateau) au niveau des basses et des hautes concentrations avec une zone de transition à la concentration de 0.5 nM.

Au regard de cet aspect non linéaire de la courbe de viabilité, nous avons décidé de ne garder que 3 concentrations d'intérêt : 0.5, 5 et 10 nM qui seront utilisées dans la suite de l'étude sur CyaA comme suffisamment représentatives des effets physiopathologiques de la toxine.

Pour déterminer le temps d'exposition optimal à la toxine, nous avons réalisé un second test de viabilité au moyen du bleu de Trypan à différents temps d'exposition : 15, 30 et 60 min.

Les résultats sont présentés sur la figure 32.

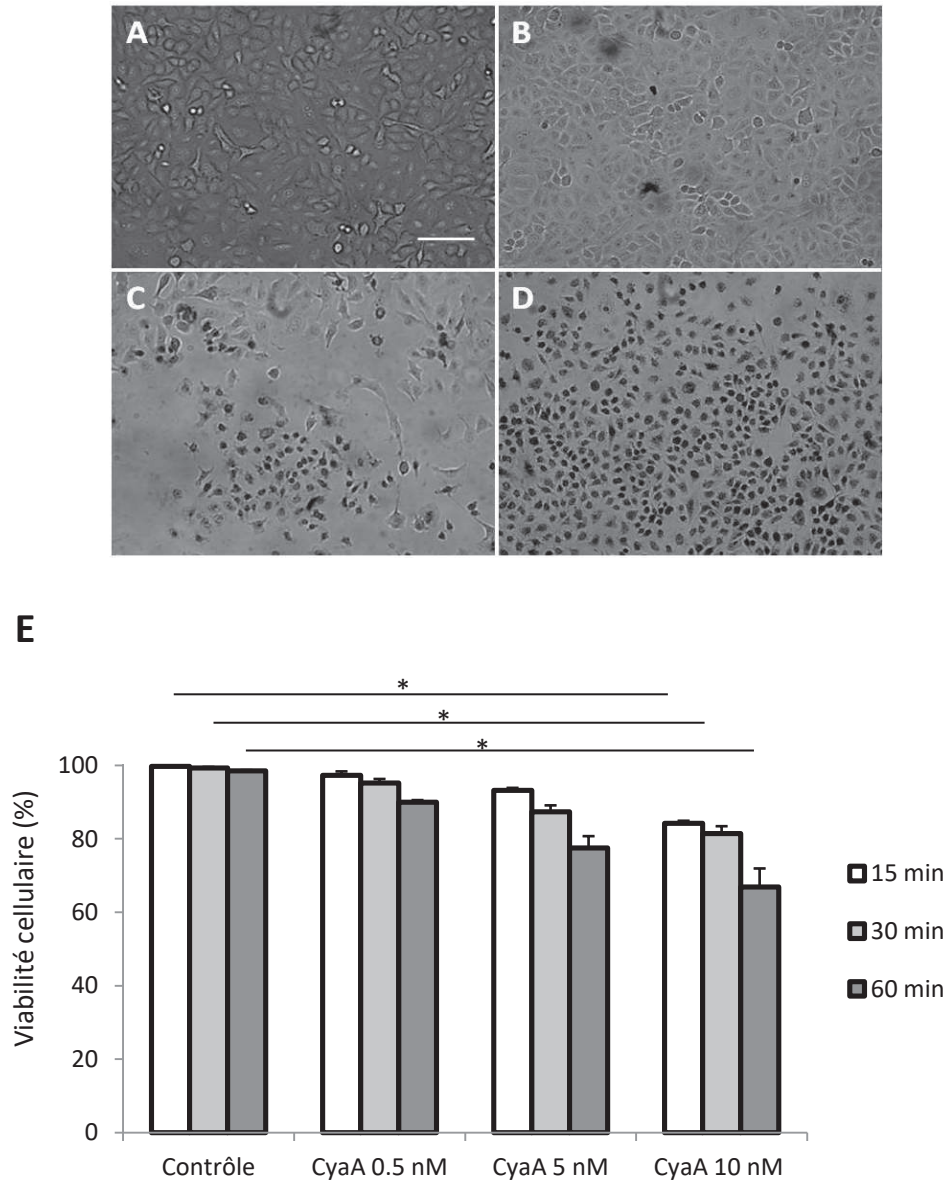


Figure 32 : A- D) Images des cellules épithéliales alvéolaires exposées pendant 60 min à la condition contrôle et aux différentes concentrations de CyaA dont la viabilité a été évaluée au bleu de Trypan et E) quantification du test de viabilité au bleu de Trypan pour différentes concentrations et différents temps d'exposition à la toxine CyaA

Les cellules A549 ont été exposées durant 60 min (A) à la condition contrôle, (B) à CyaA 0,5 nM, (C) à CyaA 5 nM, (D) à CyaA 10 nM. Les images montrent que le bleu de Trypan est entré massivement (cellules colorées en noir sur les images) dans les cellules exposées à CyaA10 nM, ce qui dénote d'une mort cellulaire plus importante que pour les autres conditions.

E) La viabilité cellulaire réalisée au le bleu de Trypan a été mesurée par comptage cellulaire en condition contrôle et pour les 3 concentrations choisies (0.5, 5 et 10 nM) de CyaA monomérique pour des temps d'exposition différents (15, 30 et 60 min) (n=6). Ce graphique montre que plus la concentration de CyaA

augmente, plus le nombre de cellules vivantes A549 diminue de façon significative notamment à la plus forte dose (10 nM). $\pm$ SEM en barre d'erreur. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$.

Ces résultats du test au bleu de Trypan confirment les résultats du test au MTT, à savoir, qu'en dépit du caractère invasif de la toxine, 70% des cellules épithéliales alvéolaires restent viables même après 60 min d'exposition à la plus forte concentration de CyaA (10 nM). L'effet dose est également confirmé par ce test au bleu de Trypan qui met en évidence l'effet temps de l'exposition à la toxine. Ainsi, plus la concentration et/ou le temps d'exposition à la toxine augmente(nt), plus le pourcentage de viabilité cellulaire diminue.

Remarque : Nous déduisons de ce test que l'exposition à CyaA jusqu'à 60 min ne remet pas en cause la viabilité globale de la culture cellulaire, ce qui devrait nous permettre d'étudier les conséquences précoces et fonctionnelles sur cellules vivantes de l'exposition à la toxine.

Dans le cadre de cette étude préliminaire, nous avons également testé les effets du mutant CyaE5 sur la viabilité cellulaire des cellules épithéliales alvéolaires dans les mêmes conditions que la toxine active CyaA.

Rappelons que le mutant CyaAE5 est inactivé pour l'activité adénylate cyclase, c'est-à-dire qu'il lui est impossible d'augmenter le taux d'AMPc intracellulaire au travers de l'activation de la calmoduline endogène de la cellule cible. Les résultats obtenus sont présentés en figure 33. Ils montrent qu'une exposition au mutant CyaAE5 n'a pas d'effet significatif sur la viabilité cellulaire des A549 quelle que soit la concentration et le temps d'exposition.

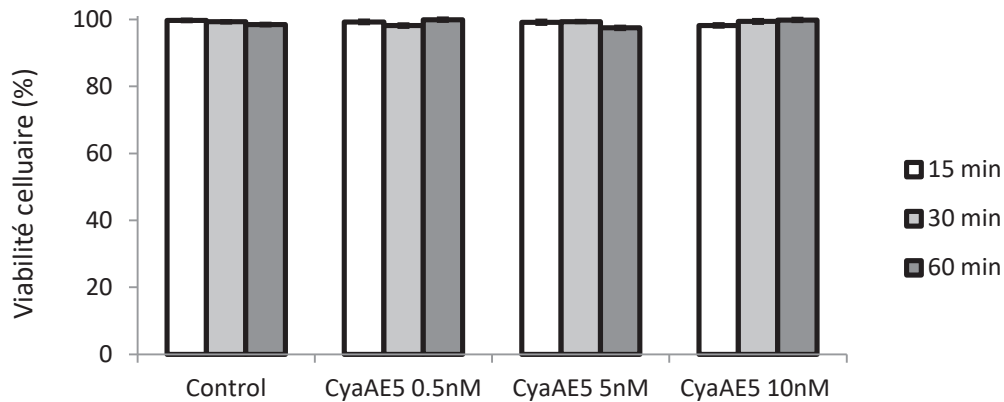


Figure 33: Test de viabilité au bleu de Trypan pour différentes concentrations et différents temps d'exposition à CyaAE5

La viabilité cellulaire par le bleu de Trypan a été mesurée par comptage cellulaire, en condition contrôle et pour différentes concentrations (0.5, 5 et 10 nM) de CyaAE5 pour des temps d'exposition différents (15, 30 et 60 min) (n=6). Ces résultats montrent que le mutant CyaAE5 n'a aucun effet sur la viabilité cellulaire des A549. $\pm$ SEM en barre d'erreur.

Remarque : Les premiers résultats obtenus avec CyaA et son mutant CyaAE5 semblent indiquer que les effets observés sur la viabilité en présence de la toxine active CyaA (figures 30 à 32) sont liés à l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc induite par l'activation de la calmoduline endogène de la cellule cible causée par CyaA.

4.1.3. Mesure du taux d'AMPc intracellulaire après une exposition à la toxine

En raison de l'effet de la forme active de la toxine sur la viabilité des cellules épithéliales alvéolaires de type A549, nous avons voulu quantifier le taux d'AMPc intracellulaire après 15, 30 ou 60 min d'exposition à CyaA et à sa forme inactivée CyaAE5. Les résultats sont présentés sur les figures 34 et 35. Notons que la condition contrôle correspond au mélange du milieu complet (DMEM 10% SVF) avec le tampon spécifique à CyaA (voir *Matériel et Méthodes*)).

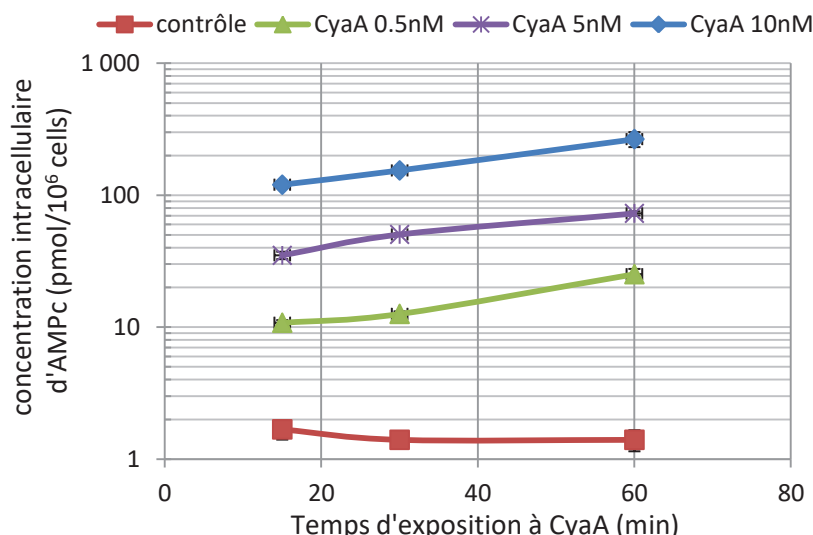


Figure 34 : Mesure du taux d'AMPc intracellulaire des A549 pour différents temps d'exposition et différentes concentrations de CyaA

La concentration intracellulaire d'AMPc a été mesurée dans les A549 (test ELISA) en condition contrôle en rouge (n=2) et pour différentes concentrations (0.5 nM en vert, 5 nM en violet et 10 nM en bleu) de CyaA (n=2) pour des temps d'exposition de 15, 30 et 60 min. Ce graphique montre que plus la concentration de CyaA augmente, plus le taux d'AMPc intracellulaire est important. $\pm$ SEM en barre d'erreur.

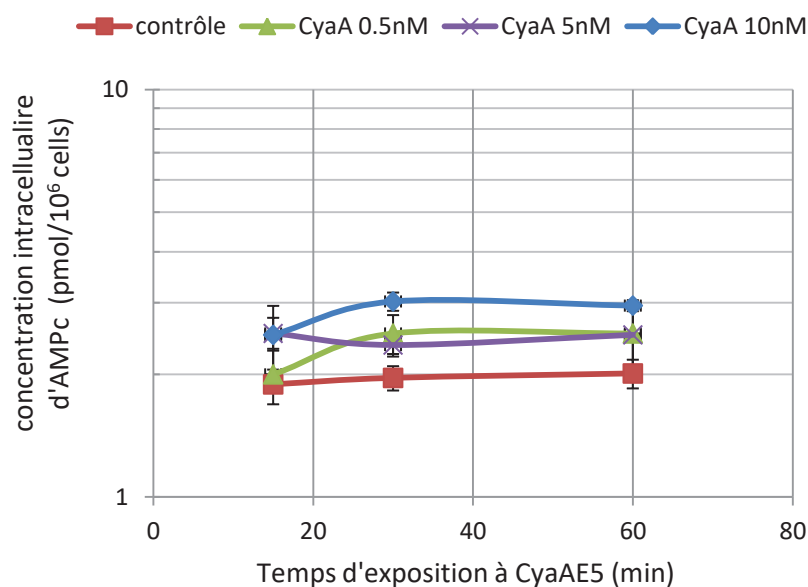


Figure 35 : Mesure du taux d'AMPc intracellulaire des A549 pour différents temps d'exposition et différentes concentrations de CyaAE5

La concentration intracellulaire d'AMPc a été mesurée dans les A549 (test ELISA) en condition contrôle en rouge (n=2) et pour différentes concentrations (0.5 nM en vert, 5 nM en violet et 10 nM en bleu) de CyaAE5 (n=2) pour des temps d'exposition de 15, 30 et 60 min. Ce graphique montre que quelle que soit la concentration de CyaAE5, celle-ci ne change pas la concentration intracellulaire d'AMPc de façon significative comparativement à la condition contrôle. $\pm$ SEM en barre d'erreur.

Les résultats présentés sur la figure 34 montrent un effet dose de CyaA sur la concentration d'AMPc : plus la concentration de la toxine augmente, plus le taux d'AMPc intracellulaire augmente, le taux d'AMPc pouvant changer de plusieurs ordres de grandeur entre les différentes conditions testées. Ainsi, en condition contrôle, la concentration intracellulaire d'AMPc reste inférieure à 2 pmol pour 10^6 cellules pour les 3 temps d'exposition testés alors qu'elle passe à environ 150 pmol pour 10^6 cellules à la plus forte concentration de CyaA (10 nM).

L'effet du temps d'exposition à CyaA sur le taux d'AMPc reste modéré pour les 3 concentrations testées.

En revanche, en ce qui concerne le mutant CyaAE5 inactivé pour l'activité adénylate cyclase (figure 35), le taux d'AMPc intracellulaire reste globalement inchangé (2.5 pmol/ 10^6 cellules) pour les 3 concentrations de CyaAE5 testées, et cela pour tous les temps d'exposition.

Le temps d'exposition n'ayant pas d'effet majeur sur la concentration intracellulaire d'AMPc, nous avons groupé les données obtenues pour les différents temps d'exposition pour chaque condition, ce qui nous a permis de donner une statistique des évolutions d'AMPc observées. Ces résultats sont présentés en figure 1A de l'article Angely et al. 2017.

En résumé, cette étude préliminaire nous a permis de constater que **la forme monomérique repliée de CyaA était la forme la plus efficace** et donc mieux adaptée pour induire des effets physiopathologiques non létaux sur les cellules épithéliales. Cette étude nous a également permis de restreindre la gamme de concentrations à seulement **3 concentrations**, c'est-à-dire, **0.5, 5 et 10 nM**. Enfin, les résultats obtenus sur les cellules A549 en présence du **mutant CyaAE5** nous ont permis d'établir une relation évidente entre **les effets induits par l'exposition à la toxine active et l'augmentation d'AMPc intracellulaire**.

Ces premiers résultats nous ont confortés dans l'idée que la toxine CyaA constitue un modèle de virulence dirigé vers l'épithélium alvéolaire et/ou bronchique et que, de ce fait, il est pertinent d'explorer les effets de cette toxine au niveau de fonctions cellulaires clés telles que la migration lors de la réparation, la perméabilité cellulaire ainsi que le battement ciliaire. L'étude de ces fonctions signifie des expérimentations aux temps longs (≥ 24 heures) sur des cellules exposées à des temps courts (1 heure maximum), ce qui revient à évaluer la persistance de l'effet cytotoxique. Pour cela, nous avons étudié l'effet de la toxine CyaA sur les cellules A549 mais également sur d'autres types cellulaires tels que les cellules épithéliales nasales humaines (CENH) et sur un modèle moins classique de co-culture cellules A549/macrophages alvéolaires. L'ensemble des résultats obtenus fait l'objet du prochain paragraphe.

4.2. Rôle de CyaA sur certains processus cellulaires épithéliaux

4.2.1. Fonctions de migration/réparation

Pour étudier la persistance des effets de CyaA sur des fonctions cellulaires essentielles au maintien de l'intégrité de l'épithélium, nous avons étudié les fonctions de migration et de réparation cellulaire des cellules épithéliales respiratoires suite à une exposition d'une heure à CyaA. La migration de cellules tissulaires nécessite des observations aux temps longs : 40h pour A549, 40h pour CENH et 20h A549/macrophages. Ce test est basé sur la mesure de l'aire de réparation d'une blessure comparée à la situation contrôle. Les différents modèles cellulaires testés sont : (i) une monocouche de cellules épithéliales alvéolaires (A549), (ii) un épithélium reconstitué de cellule épithéliales nasales et enfin, (iii) un modèle de co-culture de cellules épithéliales alvéolaires et macrophages alvéolaires pour mieux approcher la réalité physiologique. Ces tests ont été réalisés en condition contrôle (DMEM 10% SVF et tampon spécifique de CyaA) et pour différentes concentrations de CyaA (0.5, 5 et 10 nM), puis dans

le seul cas de la monocouche de cellules épithéliales alvéolaires (A549), nous avons testé l'effet de CyaAE5 aux mêmes concentrations.

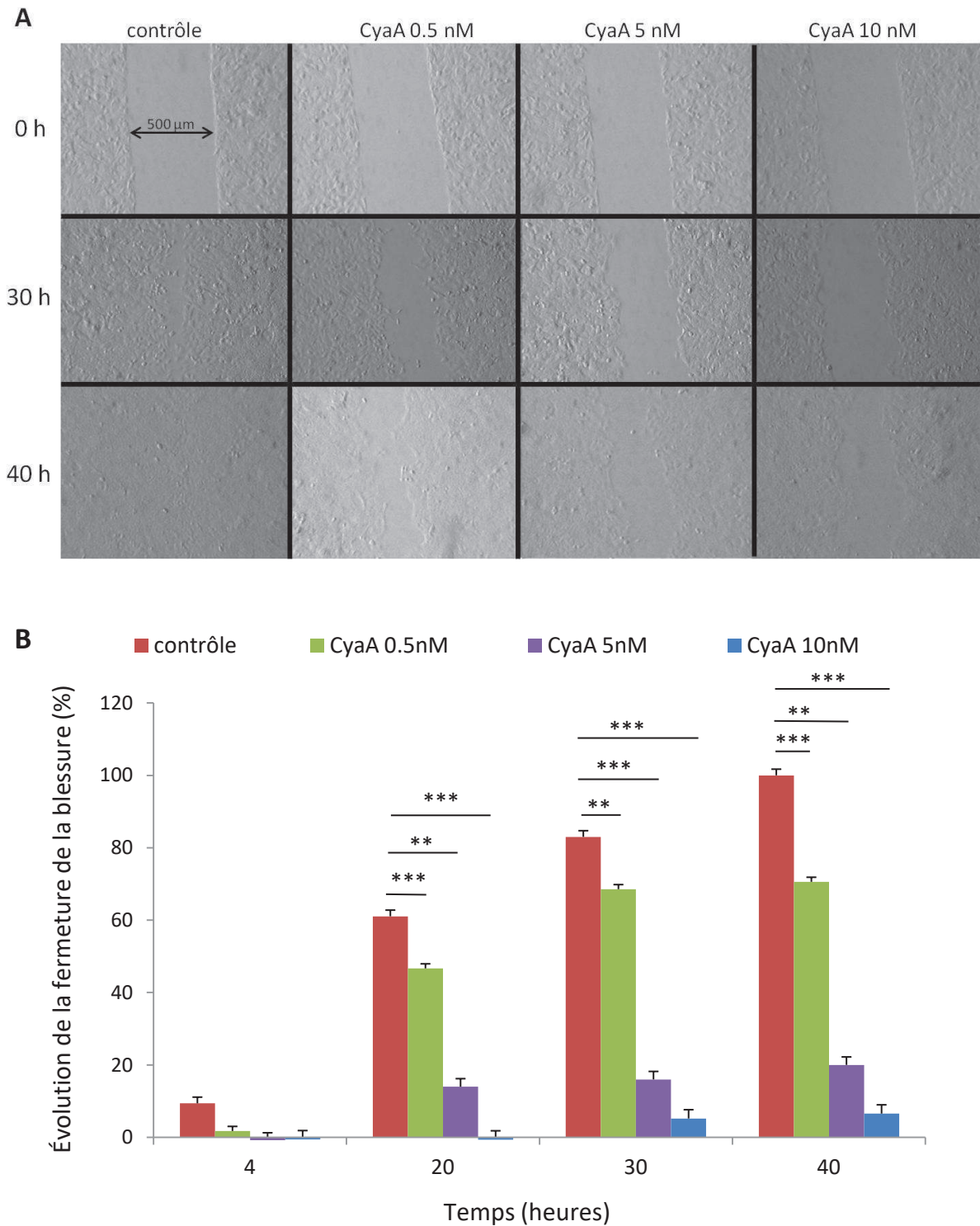


Figure 36 : A) Images à 0, 30 et 40 heures des blessures faites sur une monocouche de cellules épithéliales alvéolaires (A549) après une exposition d'une heure aux trois concentrations de CyaA et B) évolution de la fermeture des blessures faites sur les mêmes cellules dans les mêmes conditions.

(A) Les cellules A549 ont été exposées durant 1h à la condition contrôle, à CyaA 0,5 nM, à CyaA 5 nM ou à CyaA 10 nM. Les images ont été prises au moment où est faite la blessure à $t=0h$, à $t=30h$ et en fin d'expérience à $t=40h$. (B) Les résultats sont exprimés en % de la condition contrôle. La blessure a été réalisée à l'aide de cône de micropipette dans une monocouche confluite de A549 en condition contrôle en rouge ($n=24$) et pour différentes concentrations (0.5 nM en vert, 5 nM en violet et 10 nM en bleu) de CyaA ($n=24$). Ce graphique montre que plus la concentration de CyaA augmente, plus la migration cellulaire est ralentie voire stoppée aux plus fortes concentrations. $\pm$ SEM en barre d'erreur. * : $p<0.05$; ** : $p<0.01$; *** : $p<0.001$.

Les résultats présentés en figure 36 montrent l'effet persistant sur plus de 40 heures d'une exposition d'une heure à CyaA. En effet, alors qu'en condition contrôle, la blessure se ferme complètement après 40 heures, les cellules exposées à la toxine pendant 1h présentent une altération durable qui est dépendante de la concentration. À la plus faible concentration de la toxine CyaA (0,5 nM), nous observons une progression non négligeable de la fermeture de la blessure (70% à 40 h), la fermeture complète n'est pas atteinte à 40h après l'exposition. CyaA agit donc de façon durable sur la cinétique des processus impliqués dans la migration/réparation. Cette atteinte est encore plus marquée pour les cellules exposées aux concentrations de 5 et 10 nM : la migration cellulaire est très ralentie, voire totalement bloquée et est très en deçà de 20 % même après 40 heures.

À l'inverse, l'exposition des cellules A549 à la toxine inactivée pour l'activité adénylate cyclase CyaAE5 (figure 37) n'a aucun effet sur la migration/réparation cellulaires, quelle que soit la concentration, confirmant que l'AMPc est impliqué dans les modifications fonctionnelles observées sur la durée.

Avec ces données, nous constatons que la toxine CyaA est capable de moduler certaines fonctions cellulaires en ayant un effet délétère sur les processus biologiques fondamentaux pour l'épithélium que sont la migration et la réparation cellulaires dans lesquelles la structure cellulaire (cytosquelette et protéines de liaison) est nécessairement impliquée.

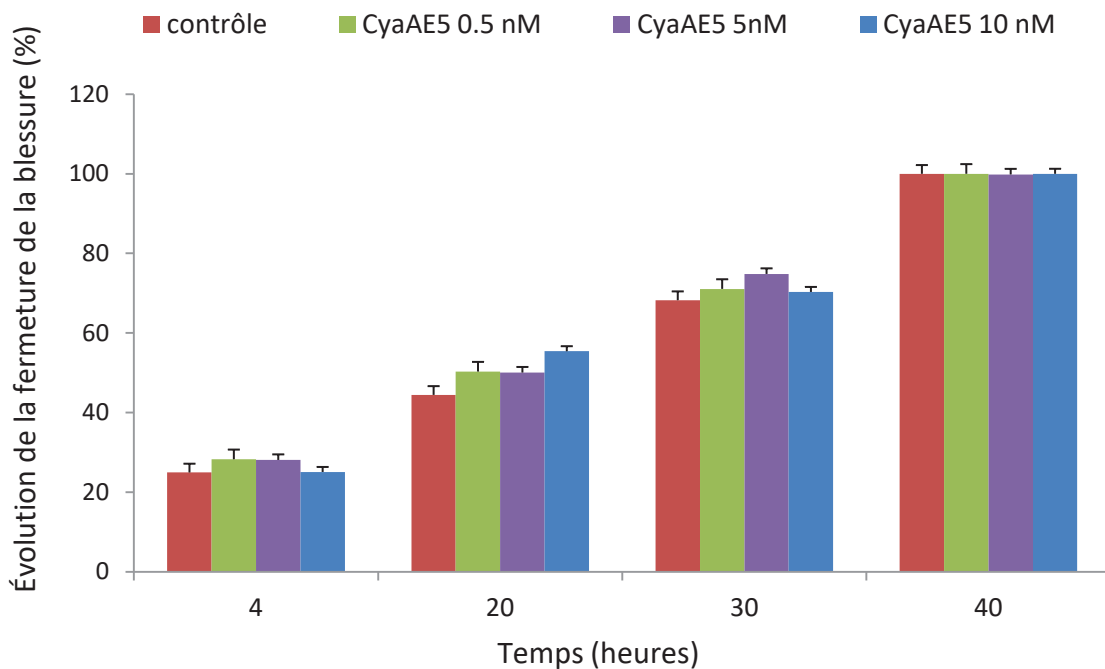


Figure 37 : Évolution de la fermeture des blessures faites dans une monocouche de cellules épithéliales alvéolaires (A549) après exposition d'une heure aux trois concentrations de CyaAE5.

La blessure a été réalisée à l'aide d'un cône de micropipette dans une monocouche confluite de A549 en condition contrôle en rouge (n=24) et pour différentes concentrations (0.5 nM en vert, 5 nM en violet et 10 nM en bleu) de CyaAE5 (n=24). Ce graphique montre que le mutant CyaAE5 n'a aucun effet sur le processus de migration/réparation cellulaire. Les cellules exposées à CyaAE5 ayant la même cinétique de migration que les cellules en condition contrôle. $\pm$ SEM en barre d'erreur.

L'ajout de macrophages alvéolaires adhérents sur une monocouche de cellules épithéliales alvéolaires (A549) confluentes a modifié fondamentalement les effets de la toxine observés en l'absence de macrophages. En exposant ce modèle de co-culture aux différentes concentrations de CyaA, il apparaît que la migration est accélérée tant en condition contrôle (où la fermeture complète est réalisée en 20 h avec macrophages au lieu de 40h sans) qu'après exposition à la toxine CyaA (où la fermeture atteint 50% à 20 h même à la plus forte concentration de 10 nM). Il faut néanmoins souligner que la présence de macrophages ne supprime pas l'effet de la toxine car celle-ci persiste de façon dose-dépendante (figure 38).

Ces résultats peuvent être expliqués par différents mécanismes protecteurs qui sont le propre des macrophages. Le premier mécanisme est que les macrophages élimineraient par endocytose une certaine quantité de toxines avant même la translocation. Cela laisserait la

possibilité aux A549 de migrer sans être totalement affectées par la toxine. Le second mécanisme pourrait être que les macrophages, qui ont la caractéristique de posséder le récepteur intégrine $\alpha_M\beta_2$ (cible privilégiée de CyaA), constitueraient une cible de choix pour la toxine CyaA au bénéfice des cellules A549 et qui sont donc protégées de l'intoxication. Notons que ces deux mécanismes peuvent coexister.

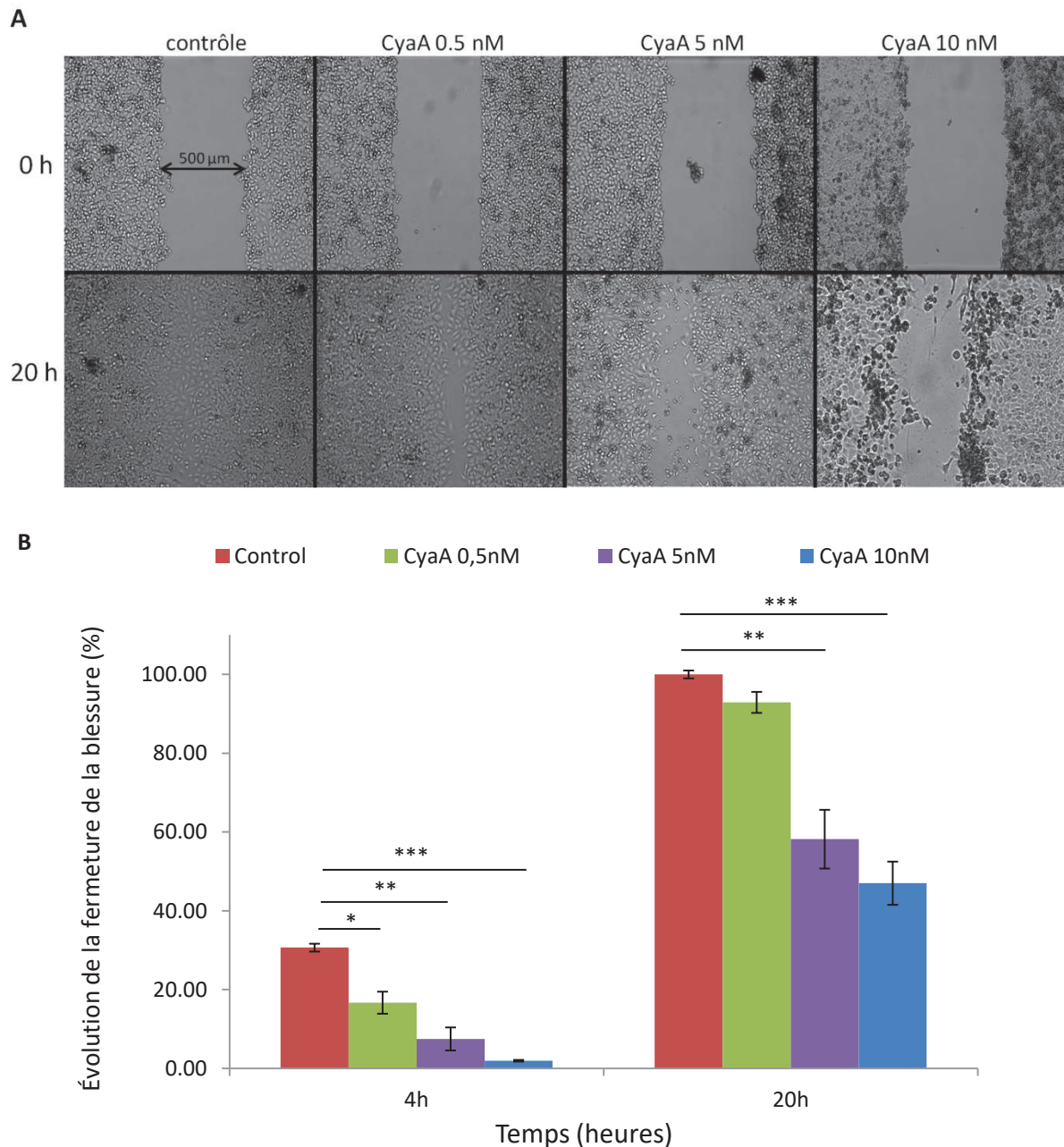


Figure 38 : A) Images à 0 et 20 heures des blessures faites sur une co-culture de cellules épithéliales alvéolaires (A549) /macrophages adhérents après une exposition d'une heure aux trois concentrations de CyaA et B) évolution de la fermeture des blessures faites sur la même co-culture de cellules et dans les mêmes conditions.

(A) Les co-cultures A549/macrophages ont été exposées durant 1h à la condition contrôle, à CyaA 0,5 nM, à CyaA 5 nM ou à CyaA 10 nM. Les images ont été prise au moment où est faite la blessure (t=0h) puis en fin d'expérience à t=20h. Cette expérience a été réalisée par Sarah Bourass, étudiante de Master 2 que j'ai co-encadrée durant ma thèse. (B) La blessure a été réalisée à l'aide d'un cône de micropipette dans une monocouche confluente de cellules A549 et de macrophages alvéolaires (modèle de co-culture). Les cellules sont exposées à la condition contrôle en rouge (n=18) et à différentes concentrations (0.5 nM en vert, 5 nM en violet et 10 nM en bleu) de la toxine CyaA (n=18). Les résultats montrent que le processus de migration/réparation cellulaire est plus rapide (20h pour la fermeture complète) tant en condition contrôle qu'en présence de la toxine CyaA et de macrophages adhérents comparativement à la situation sans macrophage. L'effet dose de CyaA est présent mais moins marqué comparativement à la situation sans macrophage. $\pm$ SEM en barre d'erreur. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$.

Le test de blessure réalisé sur les cellules épithéliales nasales humaines (CENH) montre que quelle que soit la concentration de CyaA, même à une dose de 100 nM qui est 10 fois supérieure à la dose physiologique la plus élevée utilisée dans les expériences précédentes, la toxine n'a aucun effet sur la migration des CENH. Les mécanismes mis en jeu pourraient être liés au problème de ciblage de la toxine en fonction du niveau de l'arbre aérien. En effet, la muqueuse nasale constitue la première voie de dissémination mais ne fait pas partie des zones infectées par la bactérie *B. pertussis* (Hewlett et al. 2014) car il semble que la coqueluche, et donc son agent pathogène *B. pertussis*, touche préférentiellement les voies respiratoires inférieures (bronchiques et alvéolaires) (Moore et al. 2017). Une autre hypothèse serait qu'au vu de la forte polarisation des cellules épithéliales nasales, la toxine seule ne soit pas suffisamment armée pour atteindre les récepteurs de la membrane plasmique et agirait uniquement en surface, au niveau des cils. Cette hypothèse n'est pas incompatible avec le rôle protecteur du mucus mais suppose quand même une action de relâchement des jonctions épithéliales et donc sur l'adhésion cellule-cellule qui permet à la toxine d'atteindre la face basale des cellules (perte d'intégrité de la barrière épithéliale) (Eby et al. 2010; Hasan et al. 2018).

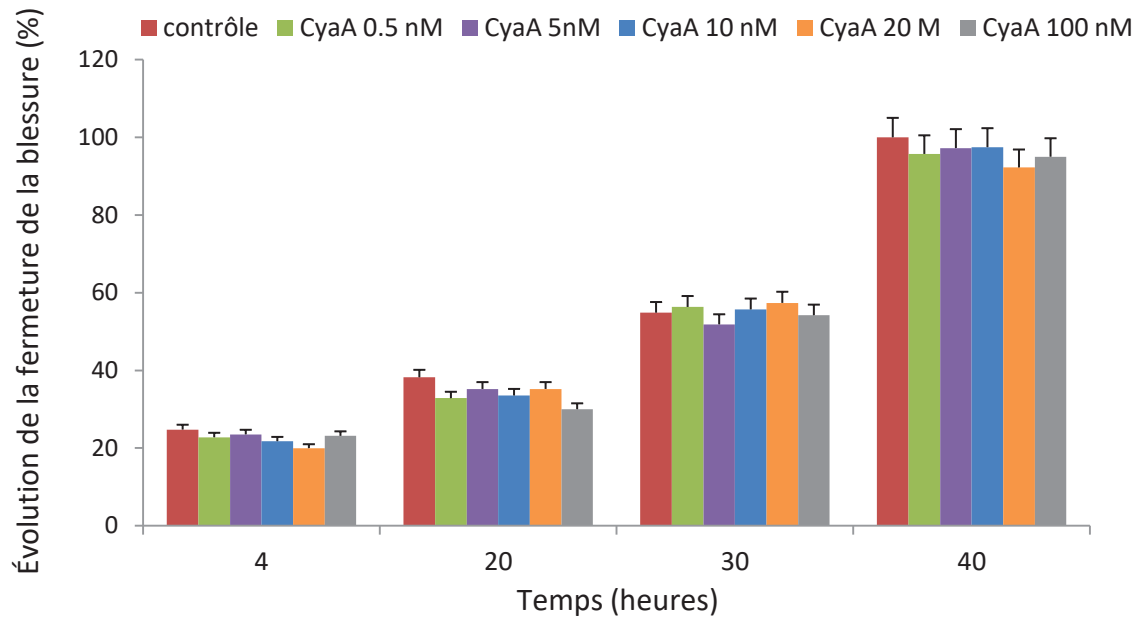


Figure 39 : Évolution de la fermeture des blessures faites dans un épithélium différencié de cellules épithéliales nasales humaines (CENH) après exposition d'une heure aux trois concentrations de CyaA.

La blessure a été réalisée à l'aide d'un cône de micropipette dans un épithélium reconstitué de cellules épithéliales nasales humaines (CENH) en condition contrôle en rouge (n=6) après exposition à différentes concentrations de CyaA (0.5 nM en vert, 5 nM en violet et 10 nM en bleu, 20 nM en orange et 100nM en gris) (n=6). Ce graphique montre que CyaA n'a aucun effet sur le processus de migration cellulaire des CENH puisque les cellules conservent la même cinétique de réparation de la blessure que les cellules en condition contrôle. $\pm$ SEM en barre d'erreur.

Ces résultats obtenus sur CENH (figure 39) suggèrent une absence d'effet de la toxine sur ces cellules et donc une intoxication empêchée par un processus de protection potentiellement associé à la présence du mucus produit par les cellules sécrétrices de l'épithélium reconstitué. Nous avons donc voulu explorer l'effet d'une exposition à CyaA sur le battement ciliaire en considérant que les cils sont directement en contact avec la toxine dans la phase initiale d'exposition.

4.2.2. Analyse du battement ciliaire après exposition à la toxine CyaA

L'analyse du battement ciliaire par vidéo-microscopie est une technique largement validée par des travaux du laboratoire (Bottier, Blanchon, et al. 2017; Bottier, Pena Fernandez, et al. 2017; Papon et al. 2012). Elle permet notamment de déterminer la fréquence de battement de cellules épithéliales nasales humaines (CENH) ciliées, prélevées lors d'examens de routine

consistant en des brossages du cornet inférieur de la muqueuse nasale de patients (Service de chirurgie maxillo-faciale et ORL des Hôpitaux de Créteil).

Nous avons pu tester les effets sur la fréquence du battement ciliaire d'une exposition de 30 min à la toxine CyaA à partir des cellules issues d'échantillons provenant de différents patients. Les résultats sont présentés en figure 40.

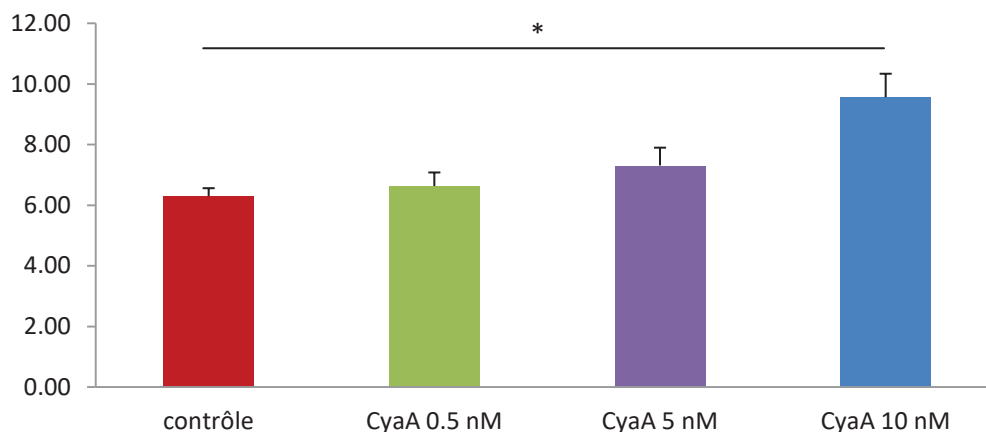


Figure 40 : Mesure de la fréquence du battement ciliaire (Hz) des cellules épithéliales nasales humaines (CENH) après exposition à différentes concentrations de CyaA

La fréquence du battement ciliaire (Hz) a été mesurée sur des CENH issues de brossages (par vidéo-microscopie à haute vitesse) en condition contrôle en rouge (n=75) et pour différentes concentrations (0.5 nM en vert avec n=38, 5 nM en violet avec n=35, 10 nM en bleu avec n=28) et un temps d'exposition de 30 min. Ce graphique montre que la toxine CyaA augmente significativement la fréquence du battement ciliaire en présence de CyaA à la plus forte dose (10nM) comparativement au contrôle. $\pm$ SEM en barre d'erreur. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$.

Nous observons une tendance à l'augmentation de la fréquence de battement après 30 min d'exposition à CyaA, mais cela ne se manifeste significativement qu'à la plus forte dose (10 nM). Or, l'effet attendu de cette toxine est de transformer l'ATP de la cellule qu'elle intoxique en AMP cyclique, et ce, jusqu'à des concentrations supraphysiologiques. L'équipe de Schmid (Schmid et al. 2006) a montré que l'augmentation de l'AMP cyclique intracellulaire entraîne une augmentation de la fréquence du battement ciliaire. Nos résultats sont donc en accord avec la littérature mais nécessiteraient un nombre plus grand d'échantillons et une analyse plus approfondie du battement ciliaire sachant que la fréquence n'est pas le seul paramètre

pertinent. Des paramètres comme l'amplitude du battement, le temps de la phase aller, le temps de la phase retour ou encore la longueur de l'onde métachrone, pourraient être avantageusement pris en compte (Bottier, Blanchon, et al. 2017; Bottier, Pena Fernandez, et al. 2017; Papon et al. 2012). La difficulté de contrôler l'histoire de chaque échantillon opératoire a constitué une difficulté majeure pour notre étude, ce qui nous a amené à suspendre dans le cadre de cette thèse, l'étude systématique des effets de la toxine sur le battement ciliaire.

La même analyse a été néanmoins menée après une exposition de 30 min à CyaAE5, le mutant délété pour la fonction adénylate cyclase. Les résultats sont exposés en figure 41.

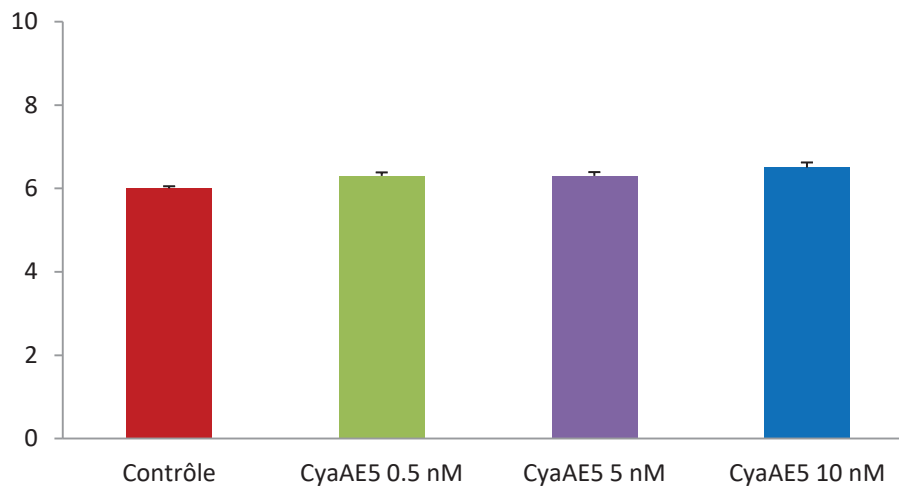


Figure 41 : Mesure de la fréquence du battement ciliaire (Hz) des cellules épithéliales nasales humaines (CENH) après exposition à différentes concentrations de CyaAE5

La fréquence du battement ciliaire (Hz) a été mesurée sur des CENH issues de brossages (par vidéo-microscopie à haute vitesse) en condition contrôle en rouge (n=23) et pour différentes concentrations (0.5 nM en vert avec n=6, 5 nM en violet avec n=8, 10 nM en bleu avec n=11) un temps d'exposition 30 min. Ce graphique montre que la toxine CyaAE5 n'a aucun effet sur la fréquence du battement ciliaire. $\pm$ SEM en barre d'erreur.

Ce contrôle négatif effectué avec la toxine inactive montre que l'augmentation du battement ciliaire observé sur les CENH est vraisemblablement associée à l'augmentation du taux d'AMPc induit par la toxine quand elle est dans sa forme active. Il convient de noter que ce sont plutôt les adhésines de *B. pertussis* comme FHA que la toxine CyaA qui bloquent les cils vibratiles de l'épithélium bronchique (Bassinet et al. 2000; Colombi et al. 2004).

Notons également que comme nous ne connaissons pas précisément les causes de l'absence d'effet sur le processus de migration/réparation des CENH (protection par le mucus ou par le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale), nous devons explorer plus en détail l'impact de la toxine sur les jonctions cellule-cellule.

Pour valider cette dernière hypothèse, nous allons évaluer l'effet de l'exposition à CyaA sur la perméabilité cellulaire des CENH.

4.2.3. Perméabilité cellulaire des CENH exposées à CyaA

La capacité de la toxine CyaA à perturber les jonctions cellulaires a été étudiée par une méthode basée sur la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER). Nous avons pour cela utilisé des cellules épithéliales nasales humaines (CENH) en culture primaire. La TEER fournit une mesure physique de la résistance au passage des ions entre les cellules épithéliales cultivées en monocouche. Elle est largement utilisée comme indicateur de changement de perméabilité *in vitro* (Hasan et al. 2018; Yeo and Jang 2010). Les résultats sont présentés en figure 42.

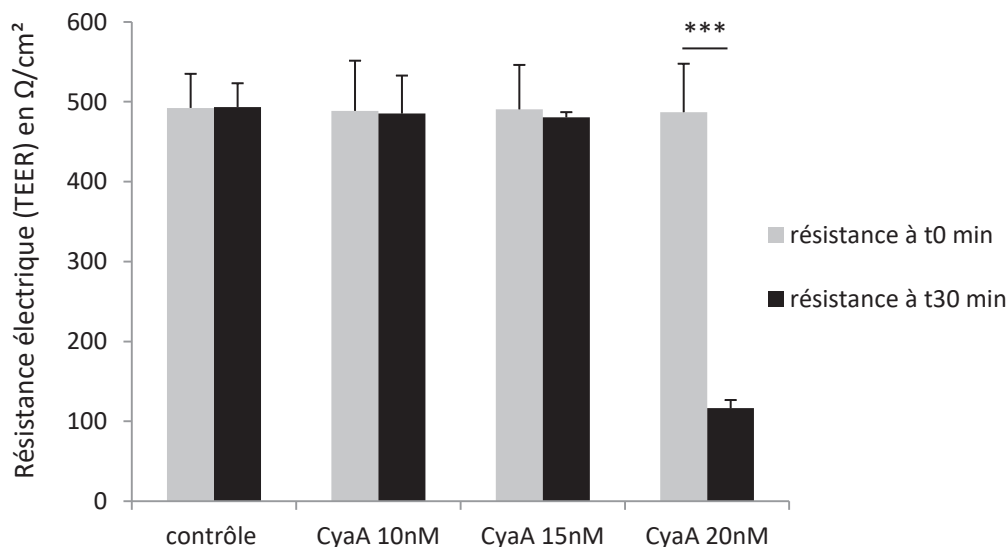


Figure 42 : Mesure de la résistance électrique trans-épithéliale (TEER) avant et après exposition aux différentes concentrations de CyaA

Les mesures de résistance ont été réalisées sur des cellules épithéliales nasales humaines ensemencées en interface air liquide. Les CENH ont été exposées 30 min à la condition contrôle (UG 2%, en rouge, n=14) ou

aux différentes concentrations de CyaA (10nM, n=5 ; 15 nM, n=4 et 20 nM, n=5). Ce graphique montre un effondrement de la résistance électrique trans-épithéliale après 30 min d'exposition à CyaA 20 nM. $\pm$ SEM en barre d'erreur. * : $p<0.05$; ** : $p<0.01$; *** : $p<0.001$.

Nous l'avons vu pour le test de blessure (figure 39), les CENH sont insensibles à la gamme de concentrations initialement définie dans l'étude préliminaire (0.5, 5 et 10 nM) considérées comme physiopathologique. Pour évaluer l'effet d'une exposition à CyaA sur la perméabilité cellulaire, nous avons considéré une gamme de concentrations supérieure à celle initialement déterminée allant de 10 nM à 20 nM. Il s'avère qu'après 30 min d'exposition à CyaA 20 nM, nous observons un effondrement de la résistance électrique ce qui reflète un affaiblissement des jonctions latérales (jonctions adhérentes et/ou occlusives). D'après l'équipe de Yeo et al, cette diminution importante de TEER pourrait être associé à un changement de fonction de la barrière épithéliale (Yeo and Jang 2010). Ces résultats suggèrent un effet de la toxine sur l'adhésion en général, l'adhésion cellule-cellule et l'adhésion cellule-MEC. Des études du laboratoires réalisées sur le perméabilité des cellules endothéliales micro-vasculaires pulmonaires (CEMV) ont montré que l'intégrité de la barrière endothéliale repose sur l'interdépendance mécanique et physique entre 3 acteurs essentiels : tension interne du CSQ, adhésion cellule-MEC et adhésion cellule-cellule (Caluch 2013; Wang et al. 2012).

L'effet de CyaA est clairement établi sur des fonctions cellulaires essentielles comme le phénotype migratoire des cellules épithéliales alvéolaires. En revanche, il est **moins clairement établi pour les CENH** mais nous ne maîtrisons pas le **rôle du mucus** produit par les cellules sécrétrices de l'épithélium reconstitué. Cependant, les résultats sur les A549 et l'atteinte supposée des cils et des jonctions cellule-cellule dans les CENH suggèrent une **modification de la structure et de la mécanique cellulaire et moléculaire** induite par l'exposition à CyaA. Ainsi, la migration qui nécessite un **remaniement important du réseau actinique de la cellule et des structures d'adhésion** avec des **changements**

morphologiques, semble être **durablement altérée par une intoxication même de courte durée**. Sur la base de ces premières données fonctionnelles, nous pouvons supposer que **CyaA est capable d'induire une atteinte des jonctions cellule-cellule** et probablement **des adhésions cellules-MEC et du cytosquelette**.

Ces résultats nous ont encouragés à examiner l'effet de CyaA sur le cytosquelette d'actine et l'adhésion au travers de l'imagerie cellulaire puis de la mécanique cellulaire. Pour cela, nous avons utilisé la technique d'immunomarquage ainsi qu'une observation approfondie avec la microscopie confocale.

4.3. Remodelages cellulaires et moléculaires des cellules épithéliales alvéolaires exposées à CyaA

4.3.1. Cytosquelette d'actine et adhésion cellulaire

La structure d'actine a été marquée à la rhodamine-phalloïdine et les points focaux d'adhérence des cellules épithéliales alvéolaires (A549) ont été marqués par la phosphotyrosine 99 et révélés par l'anticorps secondaire Alexa 488 puis quantifiés en condition contrôle et pour les différentes concentrations de la toxine CyaA (0.5, 5 et 10 nM). Trois temps différents d'exposition (15, 30 et 60 min) ont été testés. Les images de ce marquage et la quantification en termes de niveau de fluorescence et de nombre de points focaux par cellule ont été publiés en figure 2 et en la figure 4 du *Supplementary file* de l'article Angely et al. 2017. Les résultats indiquent un affaiblissement de la structure d'actine corticale et profonde à mesure que la concentration et/ou le temps d'exposition à la toxine augmente(nt), comme le révèle la diminution du niveau de fluorescence calculé à partir de ces données. Nous noterons toutefois le maintien d'un certain nombre de fibres de stress à la concentration 0,5 nM et une disparition de celles-ci aux concentrations supérieures. Parallèlement, le nombre de points focaux d'adhérence diminue avec l'augmentation de la concentration et le temps d'exposition à la toxine CyaA, traduisant une altération de

l'adhésion et donc des interactions cellule-matrice dans les cellules intoxiquées. Par ailleurs, pour les plus grandes concentrations de CyaA, nous observons un arrondissement de la forme cellulaire avec augmentation de la hauteur maximale, comme le suggère l'évolution des hauteurs des cellules A549 en fonction de la concentration de CyaA (figure 43). Nous pouvons ainsi observer que la hauteur des cellules augmente de façon significative par rapport au contrôle à la dose la plus élevée (10 nM) et entre les concentrations maximales (5 et 10 nM). Ces évolutions morphologiques sont en accord avec l'altération de l'adhésion dans les cellules exposées.

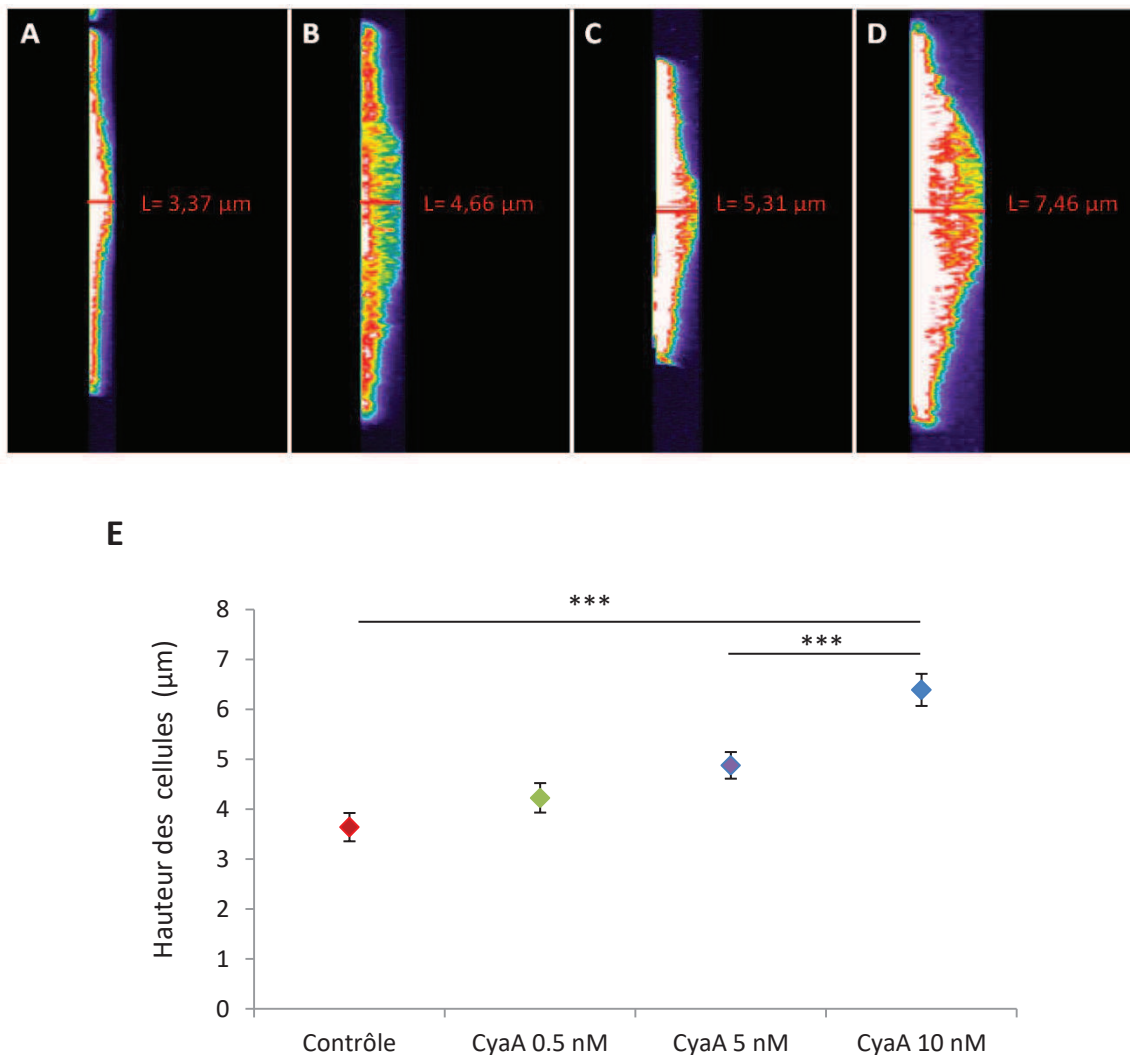


Figure 43 : A-D) Profils des hauteurs de cellules épithéliales alvéolaires (A549) exposées 30 min aux trois concentrations de CyaA et E) évolution des hauteurs moyennes de ces mêmes cellules A549 exposées aux mêmes conditions

Les cellules A549 ont été exposées durant 30 min **(A)** à la condition contrôle, **(B)** à CyaA 0,5 nM, **(C)** à CyaA 5 nM, **(D)** à CyaA 10 nM. Les images montrent le profil de hauteur des cellules reconstruit par empilement d'images réalisées au microscope confocale. **(E)** La hauteur des cellules A549 a été mesurée sur cellules fixées à partir des plans confocaux après 30 min d'exposition à la condition contrôle (n=14) et aux 3 concentrations (0,5, 5 et 10 nM) de CyaA (n=14). L'effet de CyaA sur la forme des cellules est dose-dépendant. En effet, la hauteur des cellules mesurée entre le plan de base et le plan le plus élevé contenant de la fluorescence en général situé au-dessus du noyau, augmente significativement entre le contrôle et la concentration de 10 nM ainsi qu'entre 5 et 10 nM, confirmant un arrondissement de la forme cellulaire. $\pm$ SEM en barre d'erreur. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$.

Une analyse plus fine de l'effet de CyaA sur l'adhésion focale montre qu'une exposition d'une heure à la toxine diminue le nombre de points focaux d'adhérence de façon significative pour les plus fortes concentrations (5 et 10 nM). Ces données supplémentaires nous renseignent également sur la répartition en taille des points focaux. Le décompte des adhésions focales en fonction de leur surface (supérieure ou inférieure à $1 \mu\text{m}^2$) montre que la toxine tend à diminuer par deux le nombre d'adhésions focales de grande taille ($\geq 1 \mu\text{m}^2$) (figure 44) de façon dose-dépendante. En revanche, la toxine ne modifie pas significativement le nombre d'adhésions focales de petite taille ($< 1 \mu\text{m}^2$) qui restent très majoritaires pour toutes les conditions.

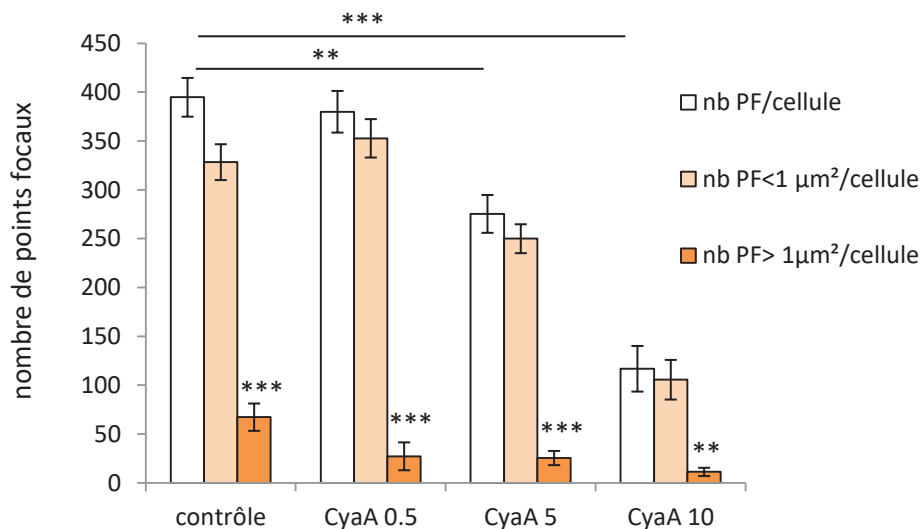


Figure 44 : Quantification du nombre et de la taille des points focaux d'adhérence des cellules A549 exposées 1 heure aux trois concentrations de CyaA

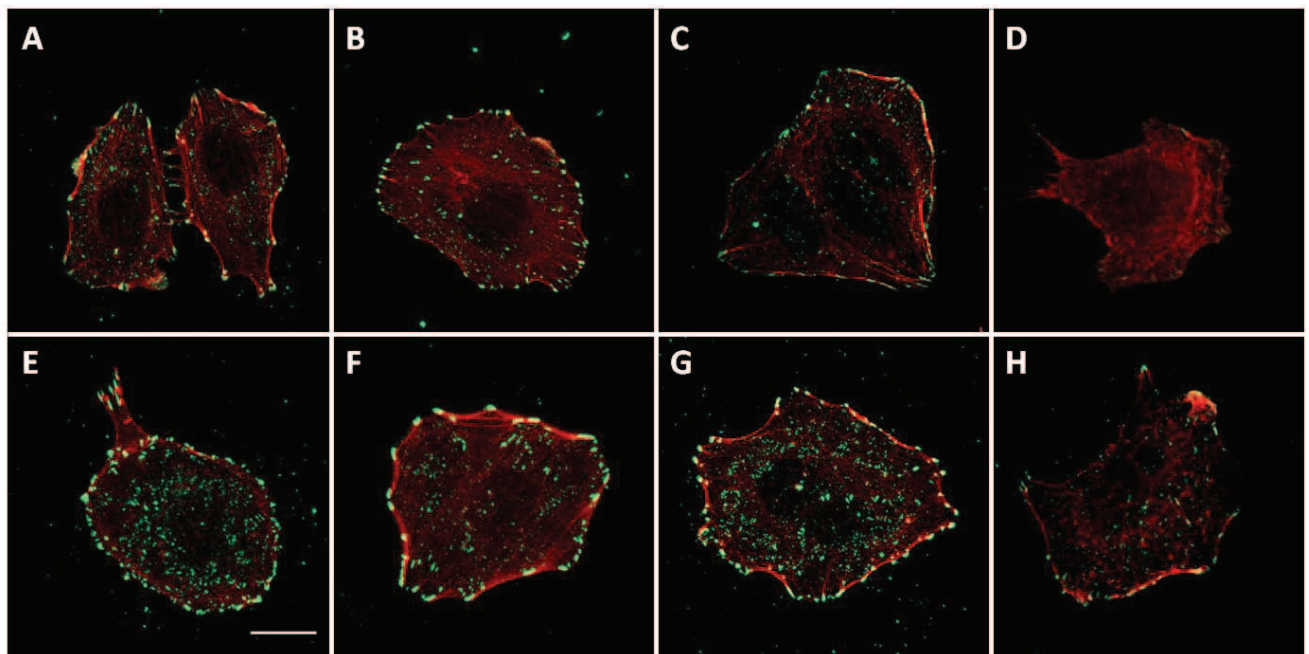
Les points focaux d'adhérence des cellules A549 ont été révélés par immunomarquage de la phosphotyrosine 99. Ce graphique montre le nombre de points focaux par cellule et leur répartition en fonction de leur taille (surface inférieure ou supérieure à $1 \mu\text{m}^2$) pour une exposition d'1h à la condition contrôle (n=10) ou aux trois concentrations (0,5, 5, 10 nM) de CyaA (n=10). Plus la concentration de la toxine augmente, plus le nombre de

points focaux par cellule diminue. Concernant leur répartition en taille, quelle que soit la condition testée, le nombre de points dont la surface est inférieure à $1 \mu\text{m}^2$ sont toujours très majoritaires comparativement à ceux dont la surface est supérieure à $1 \mu\text{m}^2$. D'autre part, il apparaît que la toxine tend à diviser par 2 le nombre de points focaux de grande taille, même à la plus basse concentration de toxine. $\pm$ SEM en barre d'erreur. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$.

4.3.2. Réversibilité partielle des effets de CyaA sur l'adhésion

La réversibilité de l'intoxication a été étudiée par l'ajout de manganèse dans les cultures de cellules exposées à CyaA. Le but est de réactiver l'adhésion *via* les intégrines des cellules A549 sachant que l'adhésion est affectée par l'exposition à la toxine. Le manganèse possède une haute affinité pour les intégrines et est connu pour être un puissant activateur des intégrines (Chen, Salas, and Springer 2003; Mould et al. 2002).

Pour cela, nous avons exposé les cellules A549 à 30 min de Mn^{2+} ($5 \mu\text{M}$) préalablement exposées à la toxine pendant 1 heure aux trois concentrations (0,5 ; 5 et 10 nM) (figure 45). L'exposition au Mn^{2+} est un moyen de vérifier si le manganèse peut contrebalancer l'effet de l'intoxication par CyaA en regardant la taille des adhésions focales.



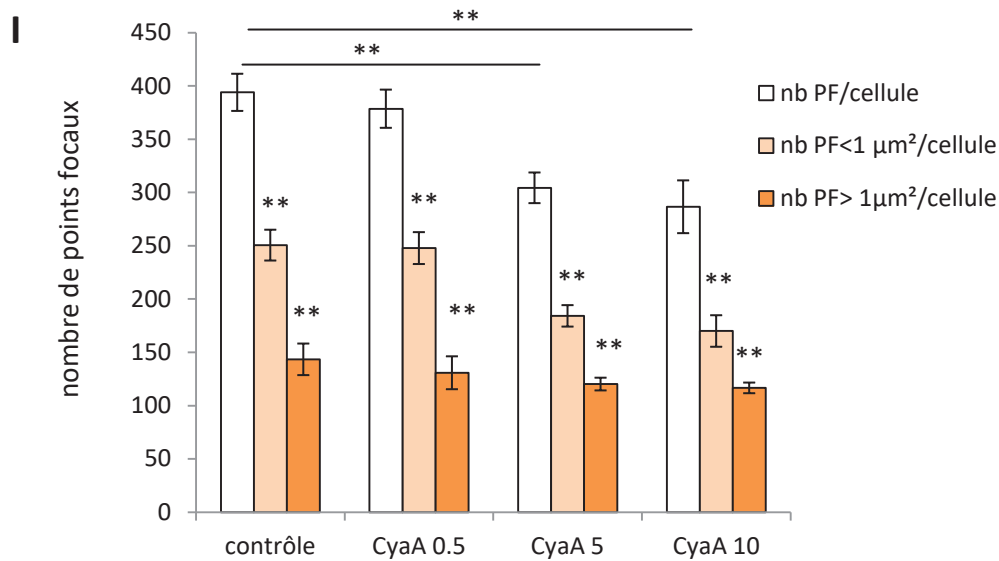


Figure 45 : Marquages et quantification du nombre et de la taille des points focaux d'adhérence des cellules A549 exposées respectivement aux trois concentrations de CyaA puis 30 minutes au Mn^{2+}

(A-D) Les images représentent la superposition de l'immunomarquage des fibres d'actine (rhodamine-phalloïdine) et des points focaux d'adhérence (phosphotyrosine 99) des cellules A549 avant ajout de Mn^{2+} et (E-H) après ajout de Mn^{2+} 5 μM pendant 30 min. (I) Le graphique montre le nombre de points focaux d'adhérence par cellule et leur répartition en fonction de la taille (surface inférieure ou supérieure à 1 μm^2) pour une exposition d'1h en condition contrôle (n=10) ou aux différentes concentrations (0.5, 5, 10 nM) de CyaA (n=10) et à 30 min de Mn^{2+} (5 μM). L'exposition à 30 min de Mn^{2+} (5 μM) permet aux cellules exposées à CyaA de maintenir un nombre plus important de points focaux d'adhérence et de maintenir une répartition plus équilibrée entre points focaux de grandes et petites tailles pour toutes les conditions d'exposition à CyaA. $\pm$ SEM en barre d'erreur. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$.

Il apparaît qu'en présence de Mn^{2+} , le nombre de points focaux d'adhérence dans les cellules exposées à CyaA est plus important que sans Mn^{2+} , y compris aux fortes concentrations de CyaA (5 et 10 nM). Sans Mn^{2+} , le nombre de points focaux s'élevait respectivement à 260 et à 120 suite à une exposition à CyaA de 5 et 10 nM. L'exposition à Mn^{2+} (5 μM) permet de réaugmenter le nombre de points focaux jusqu'à 300 pour les 2 concentrations les plus élevées. Nous constatons également que la quantité de points focaux dont la surface est supérieure à 1 μm^2 est bien plus élevée et se situe entre 120 et 150 quelle que soit la condition testée.

Ces résultats montrent que l'effet de l'exposition à CyaA sur le nombre et la taille des points focaux d'adhérence peut être en partie contrecarré par le traitement au manganèse. Cela suggère que la toxine est susceptible de désactiver certaines intégrines qui seraient responsables de l'affaiblissement de l'adhésion.

Ces derniers résultats confirment un **rôle de la toxine CyaA sur l'adhésion cellulaire** mais le mécanisme d'action reste à éclaircir. Nous ne savons pas si la toxine agit sur l'adhésion **en modifiant l'énergie chimique des liens intégrines** ou encore si elle agit **en modifiant l'association de ces liens *via* le remodelage du cytosquelette d'actine**.

Nous allons donc mener une étude exhaustive des propriétés mécaniques et des paramètres d'adhésion sur les cellules exposées à la toxine en utilisant des techniques de micro/nanomanipulation qui combinent des mesures mécaniques et une caractérisation fine des paramètres de l'adhésion basés sur les éléments théoriques présentés précédemment.

4.4. Propriétés mécaniques et d'adhésion des cellules épithéliales alvéolaires exposées à CyaA

4.4.1. Magnétocytométrie

La magnétocytométrie (MTC) est basée sur la détermination de la relation entre une contrainte appliquée contrôlée et une déformation induite sur l'ensemble des cellules vivantes (voir *Matériel et Méthodes*). Des travaux théoriques récents ont permis de réaliser une nouvelle analyse du signal et notamment de sa composante non réversible qui aboutit à l'évaluation des paramètres d'adhésion. À notre connaissance, il n'existe pas de données MTC à propos des effets de la toxine CyaA sur les cellules épithéliales alvéolaires.

○ Validation de la méthode

Les résultats évoqués dans ce paragraphe ont été publiés dans le chapitre 4 du livre *Nanomagnetic Actuation of Cell Receptors* (Isabey et al. 2018), dans l'article André Dias et al. (André Dias et al. 2018) ainsi que dans l'article Isabey et al. (Isabey et al. 2016).

Les cellules A549 ont été largement utilisées pour l'étude des propriétés mécaniques et d'adhésion des cellules adhérentes en MTC. En effet, elles forment une monocouche de

cellules adhérentes en créant des complexes d'adhésion sur tout substrat fonctionnalisé par un ligand (par exemple, la fibronectine) reconnu par les intégrines. Notons que les billes ferromagnétiques utilisées pour sonder les propriétés cellulaires sont également fonctionnalisées et prennent l'aspect de mini-matrices reconnues par la cellule à partir desquelles sont évaluées les propriétés intracellulaires (structurales) et interfaciales (adhésives). La faisabilité de la technique MTC a été évaluée à partir de la cohérence biologique des comportements cellulaires attendus. Par exemple, en faisant varier la concentration (de 0.05 à 0.8 mg/ml) du ligand RGD recouvrant les billes, nous observons : (1) un renforcement de l'adhésion de la cellule à son substrat associé à une diminution très marquée du taux de dissociation naturel K_{off}^0 (temps de vie augmentée) et une augmentation de la contrainte de référence σ_c (nombre de liens impliqués augmenté) et (2) une augmentation importante de la rigidité cellulaire E , associée à une diminution du temps de relaxation viscoélastique T (figure 5 de Isabey et al. 2016).

De plus, la spécificité de la liaison entre la bille et le cytosquelette a été vérifiée à partir des effets d'une drogue exogène : la cytochalasine D (CytoD) qui dépolymérise le cytosquelette d'actine en bloquant la polymérisation des filaments d'actine à l'extrémité « plus ». L'exposition à la CytoD, qui est connue pour diminuer le nombre et la longueur des filaments d'actine qui se retrouvent donc moins disponibles pour former des liens, entraînant des changements dans l'équilibre des forces et la direction de la tension au sein du cytosquelette. Ces évolutions ont été quantifiées par l'augmentation du taux de dissociation K_{off}^0 et une diminution de la contrainte de référence σ_c qui représente un changement de la configuration des liens et/ou une diminution du nombre de liens, et également, une diminution marquée de la rigidité du cytosquelette E et du temps de relaxation viscoélastique T , qui suggère une

diminution encore plus marquée du module de perte ou viscosité intracytoplasmique (figure 6 de Isabey et al. 2016).

Le rôle des propriétés mécaniques de l'environnement a été étudié en 3D (gels de collagènes avec des rigidités différentes) sur les mêmes cellules A549 avec la MTC. Comme attendu, il apparaît que plus l'environnement extracellulaire est rigide, plus le renforcement de l'ancrage cellulaire est important : K_{off}^0 diminue, ce qui indique une stabilisation des liens dans l'environnement plus rigide alors que σ_c augmente, ce qui indique un changement de configuration des liens et/ou une augmentation de leur nombre dans l'environnement le plus rigide. Par ailleurs, la rigidité cellulaire s'adapte à l'environnement : la rigidité cellulaire E et le temps de relaxation (donc la viscosité) augmentent dans un environnement extracellulaire plus rigide (figure 8 de Isabey et al. 2016).

Les résultats MTC semblent confirmer la **validité du modèle de Bell généralisé** à la description du **comportement de liens interfaciaux nécessairement multiples**. La magnétocytométrie apparaît dans les études de validations déjà citées plus haut comme une **technique de micromanipulation respectant les niveaux physiologiques des contraintes mécaniques** et capable de **fournir des paramètres reflétant l'évolution de l'état d'adhésion cellulaire et des propriétés mécaniques du cytosquelette** dans des conditions variées d'altérations intra et extracellulaire.

Pour toutes ces raisons, la MTC apparaît comme une méthode adaptée à l'évaluation des cellules épithéliales alvéolaires exposées à la toxine bactérienne CyaA.

○ *Application à l'étude des cellules épithéliales alvéolaires exposées à CyaA*

Les effets de CyaA sur les propriétés mécaniques et d'adhésion des cellules A549 ont été observés à différentes concentrations (0.5, 5 et 10 nM) d'abord pour un temps court

d'exposition (30 min). La CytoD à 10 µg/ml durant 20 min a été utilisée comme contrôle de l'effet de la dépolymérisation du CSQ d'actine sur les propriétés mécaniques et d'adhésion des cellules en culture comparativement à l'effet de CyaA. Les résultats sont présentés en figure 46.

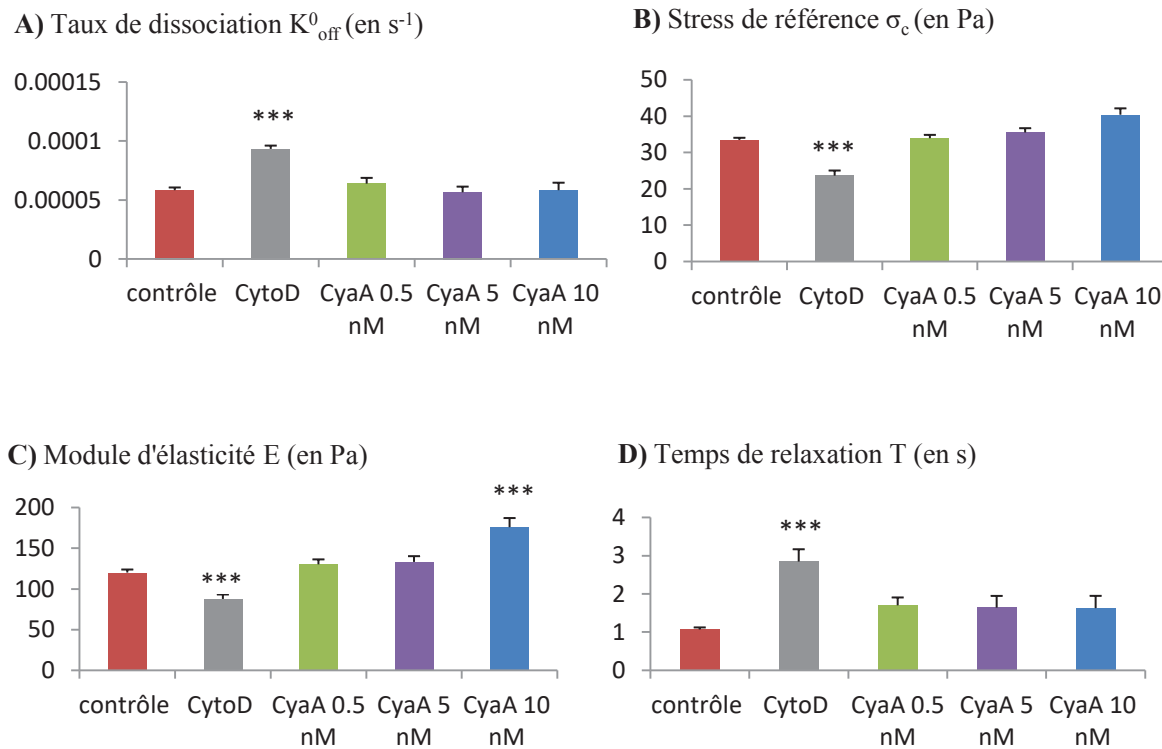


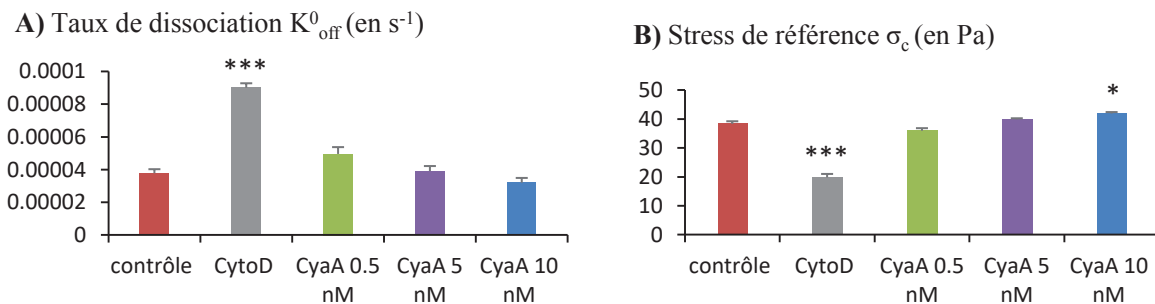
Figure 46 : Mesure par MTC des paramètres d'adhésion et des propriétés mécaniques des cellules A549 exposées 30 min à différentes concentrations de CyaA

Les paramètres du modèle solide viscoélastique (Simple Voigt) mesurés sont : **(A)** le taux de dissociation naturel K_{off}^0 en s^{-1} , **(B)** le contrainte de référence σ_c , **(C)** le module d'élasticité du cytosquelette E en Pa, **(D)** le temps de relaxation viscoélastique T en s. Les cellules A549 ont été exposées 30 min à la condition contrôle ou à différentes concentrations de CyaA (0.5, 5 et 10 nM). Les différences entre l'exposition à CyaA et le groupe contrôle ont été quantifiées par un test ANOVA. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$. n Contrôle=75, n CyaA 0.5nM=22, n CyaA 5nM=21, n CyaA 10nM=16, n CytoD=33.

Les résultats MTC montrent que la toxine CyaA n'a pas d'effet apparent sur les paramètres de l'adhésion K_{off}^0 et σ_c ce qui est plutôt en faveur d'une configuration zipper des liens multiples maintenue quand la concentration de CyaA augmente. L'absence d'effet apparent sur K_{off}^0 sera abordée dans la *Discussion Générale*. L'effet de la CytoD qui augmente très significativement le taux de dissociation naturel et donc diminue le temps de vie, diminue en

revanche, très significativement la contrainte de référence σ_c est en accord avec les résultats déjà publiés avec la technique et va dans le sens d'un changement de configuration (de zipper à parallèle) causé par l'atteinte du cytosquelette induit par CytoD mais cette évolution de la configuration reste à confirmer.

L'effet de CyaA sur les propriétés mécaniques des cellules A549 est négligeable aux deux plus basses concentrations (0.5 et 5 nM) même si la tendance est à l'augmentation qui devient significative à 10 nM. Le contrôle CytoD montre un effet marqué de diminution de la rigidité cellulaire qui confirme le lien entre un cytosquelette d'actine polymérisé et la rigidité cellulaire fournie par l'analyse du signal des billes fixées aux intégrines à la surface des cellules. Nous constatons que CyaA, à la plus forte concentration, rigidifie le cytosquelette. Le temps de relaxation viscoélastique n'est, quant à lui, pas modifié par l'exposition à la toxine, y compris à 10 nM, ce qui suggère une augmentation parallèle de la viscosité intracellulaire. Le modèle microrhéologique simple Voigt ne permet pas de savoir quel compartiment du cytosquelette est le plus modifié mais l'analyse avec un double modèle de Voigt (résultats non présentés) nous a montré que c'est le compartiment cortical du cytosquelette qui est le plus modifié par CyaA. Les résultats obtenus à 30 min d'exposition peuvent être comparés aux effets de CyaA sur un temps beaucoup plus long (24 heures). Les résultats sont présentés en figure 47.



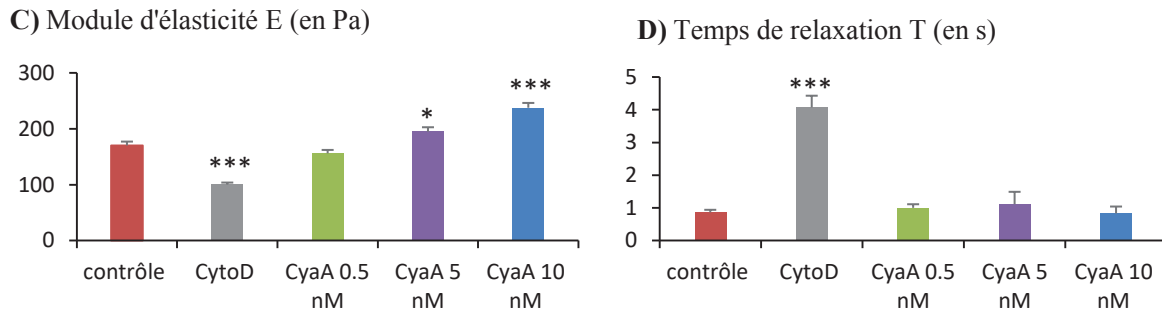


Figure 47 : Mesure par MTC des paramètres d'adhésion et des propriétés mécaniques des cellules A549 exposées 24 heures à différentes concentrations de CyaA

Les paramètres du modèle solide viscoélastique (Simple Voigt) mesurés sont : (A) le taux de dissociation naturel K_{off}^0 en s^{-1} , (B) le contrainte de référence σ_c , (C) le module d'élasticité du cytosquelette E en Pa, (D) le temps de relaxation viscoélastique T en s. Les cellules A549 ont été exposées 24h à la condition contrôle ou à différentes concentrations de CyaA (0.5, 5 et 10 nM). Les différences avec le groupe contrôle et l'exposition à CyaA ont été quantifiées par un test ANOVA. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$. n Control=38, n CyaA 0.5nM =33, n CyaA 5nM =25, n CyaA 10nM =25, n CytoD=34.

Une exposition longue de 24 heures à CyaA ne change pas fondamentalement les résultats obtenus aux temps courts pour l'adhésion, sauf peut-être pour la contrainte de référence à la plus forte concentration de 10nM. La rigidité cellulaire mesurée aux deux concentrations les plus élevées est significativement augmentée après 24 heures d'exposition à ces concentrations mais le temps de relaxation reste inchangé. Cet essai à 24 heures d'exposition de la toxine n'apporte pas réellement de nouvelles informations suggérant que les modifications intracellulaires sont immédiates et atteignent rapidement un plafond sur lequel le temps d'exposition n'a pas réellement d'effet.

Les résultats à 30 min ou à 24 h d'exposition à la toxine **ne permettent pas à eux seuls de juger de l'effet de la toxine sur l'adhésion** alors que les tests fonctionnels (**migration/réparation et immunomarquage**) suggèrent fortement que **l'adhésion est modifiée par la toxine CyaA**. La MTC, en tant que technique de **mesure moyennée** des paramètres d'adhésion **pourrait gommer certains effets** pour des raisons qui seront précisées dans la *Discussion Générale*.

Nous allons utiliser dans la suite de ce travail une technique de nanomanipulation permettant une évaluation beaucoup plus locale et spécifique de l'adhésion précoce (*via* les récepteurs intégrine) qui est basée sur la mesure cellule par cellule en utilisant la microscopie à force atomique (AFM).

4.4.2. Microscopie à Force Atomique (AFM)

Pour évaluer l'effet de la toxine CyaA sur la mécanique et l'adhésion cellulaires, nous allons considérer l'adhésion dans la phase précoce de constitution de sites dits « initiaux » et donc de structures d'adhésion simples, dépourvues de la complexité des adhésions focales. Nous considérons que, dans ces conditions, les hypothèses simplificatrices sur lesquelles s'appuie l'approche théorique, notamment en ce qui concerne la configuration parallèle des liens en AFM, sont relativement bien satisfaites par le dispositif expérimental, ce qui n'était pas forcément le cas en MTC. D'autre part, nous souhaitons mettre en évidence les effets de CyaA dans sa phase précoce d'intoxication et également caractériser la façon dont CyaA perturbe l'adhésion cellulaire dans sa phase initiale de développement. Notons que dans cette phase où les intégrines sont associées, les techniques d'imagerie ne sont pas toujours adaptées en raison des niveaux de fluorescence qui apparaissent insuffisant pour pouvoir capter les événements moléculaires à l'aide d'outils optiques conventionnels (Laukaitis et al. 2001). La mesure des forces d'adhésion telle que celle développée pour ce travail (Nguyen et al. 2017) apparaît alors comme un outil de choix pour caractériser les effets de CyaA.

La méthode développée est une spectroscopie de force dédiée aux liens multiples (MFS pour Multiple bond Force Spectroscopy) utilisant la microscopie à force atomique (AFM) appliquée aux cellules épithéliales alvéolaires de type A549.

- *Validation de la méthode MFS*

L'évaluation de la méthode utilisée est publiée dans l'article Nguyen et al. 2017 [document annexe des publications].

Alors que la plupart des équipes travaillant avec l'AFM se sont concentrées sur l'étude des liens individuels, nous avons cherché à évaluer les liens quand ils sont associés, ce qui se révèle être plus proche de la réalité biologique (voir chapitre *Matériel et Méthodes*). La méthode AFM est adaptée à l'évaluation des liens multiples car la direction des efforts est bien définie (unidirectionnelle et verticale). Ceci nous a permis de valider la faisabilité de la méthode qui utilise l'approche stochastique décrivant la rupture des liens multiples non coopératifs en configuration parallèle ce qui correspond à l'application de la force distribuée de façon homogène entre les liens au fur et à mesure de leur rupture.

Nous avons d'abord évalué le rôle de la fonctionnalisation des billes en comparant la situation où les billes sont recouvertes d'un ligand (peptide RGD) spécifiquement reconnu par les intégrines à des situations où la spécificité n'est que partielle. Pour cela, la force de détachement a été mesurée dans différentes conditions de traitements spécifiques et non spécifiques de la sonde. Les quatre conditions étudiées sont : (1) la sonde nettoyée au Triton puis à l'éthanol, (2) la sonde nettoyée par un traitement au four à plasma, (3) la sonde nettoyée par un traitement au four à plasma puis recouverte de BSA (pour Bovin Serum Albumin) et enfin, (4) la sonde est nettoyée par un traitement au four à plasma puis fonctionnalisée au RGD. Les résultats sont présentés en figure 48.

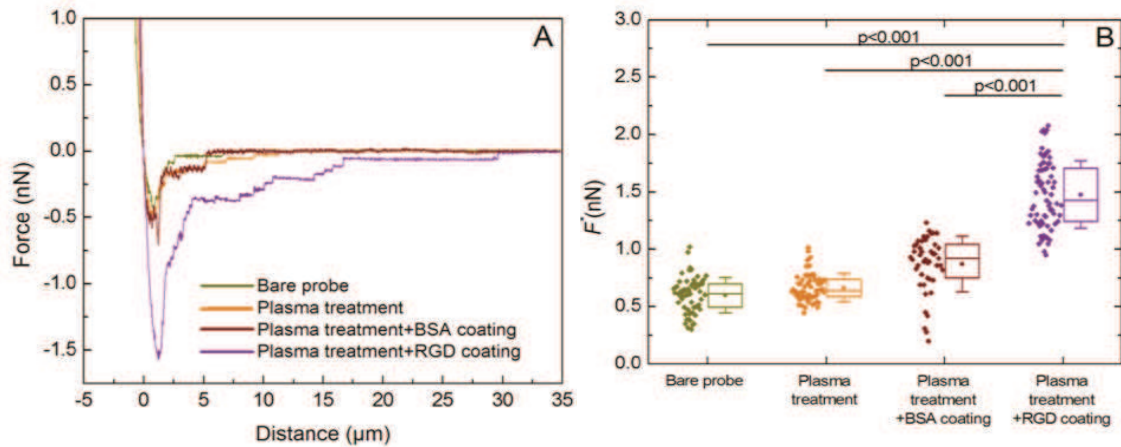


Figure 48 : Etude de quatre conditions différentes utilisées pour le traitement des sondes AFM (A) par observation des courbes force-distance et (B) par mesure des forces de détachement relative à chaque condition

Les quatre traitements testés sont : la sonde nettoyée au Triton puis à l'éthanol (en vert), la sonde nettoyée par un traitement au plasma (en orange), la sonde nettoyée par un traitement au plasma puis coatée au BSA (en marron) et la sonde nettoyée par un traitement au plasma puis coatée au RGD 2.5 mg/ml (en violet). (A) Courbes force-distance caractéristique dans les quatre conditions de traitement. (B) Mesure de la force de détachement F^* (en nN) pour les quatre conditions de traitement des sondes. Les données obtenues avec le traitement plasma+RGD (intégrine spécifique) sont significativement différentes de celles obtenues avec les traitements non spécifiques. $\pm$ SEM en barre d'erreur.

La décroissance de la courbe force-distance obtenue avec la condition (4) est bien plus importante que pour les trois autres conditions (figure 44 A), révélant que le traitement intégrine-spécifique permet d'obtenir des forces de détachement plus grandes (figure 44 B) et donc un nombre plus important d'événements de rupture sur la courbe force-distance. Ces résultats montrent clairement qu'un traitement spécifique des intégrines révèle des forces de détachement maximales bien supérieures à celles de toutes les autres liaisons non spécifiques. Il faut donc souligner que le traitement de la sonde au four à plasma réalisé dans cette étude (O₂ injecté) a l'avantage de rendre la surface de la sonde hydrophile. Cela confère à la sonde des conditions énergétiques de surface favorables au contact de la solution aqueuse contenant le RGD en empêchant la formation de bulles d'air.

Après avoir validé la procédure la plus adaptée au traitement des sondes, nous avons évalué l'effet de la vitesse de déplacement de la sonde (2, 5 et 10 μm/s maintenue identique en phase

d'indentation et de séparation) dans le but de faire varier le taux de chargement. Les résultats sont présentés en figure 49.

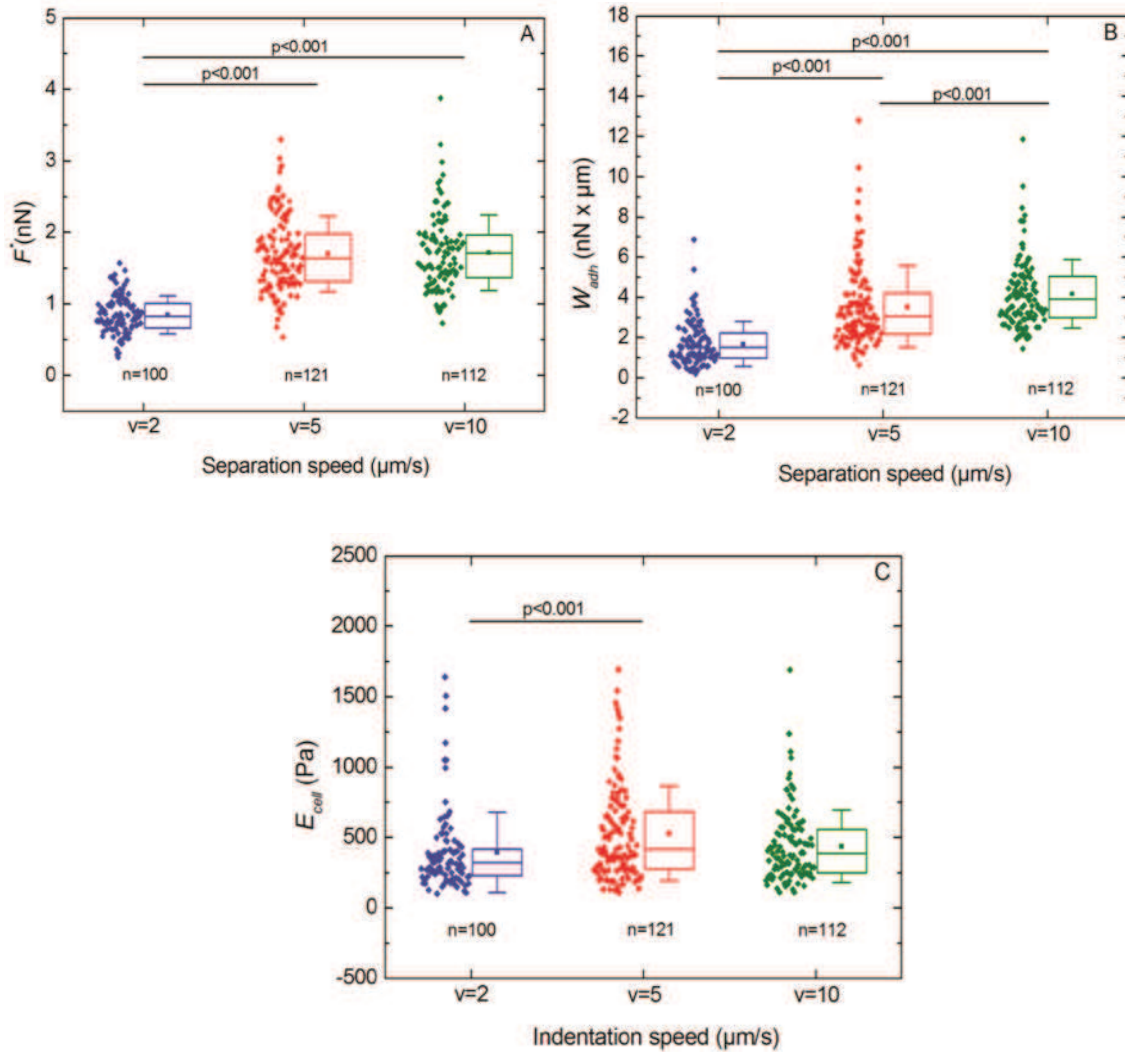


Figure 49 : Evaluation statistique de la force de détachement F^* , du travail d'adhésion W_{adh} et du module d'élasticité E_{cell} mesurés pour trois vitesses différentes de déplacement de la sonde en rétraction (F^* et W_{adh}) ou en indentation (E_{cell})

(A) La force maximale de détachement (F^* en nN) et (B) le travail d'adhésion (W_{adh} en nN×μm) ont été mesurés cellule par cellule pendant la phase de rétraction sur les cellules A549 pour 3 vitesses de séparation prédéterminées (v=2 μm/s en bleu, v=5 μm/s en rouge et v=10 μm/s en vert). Chaque point représente une cellule. Le nombre de cellules testées pour chaque condition est : n=100 (v=2 μm/s) ; n=121 (v=5 μm/s) et n=112 (v=10 μm/s). (C) Mesure du module d'élasticité (E_{cell} en Pa) qui a été mesuré cellule par cellule pendant la phase d'indentation sur les cellules A549 pour 3 vitesses d'indentation différentes (v=2 μm/s en bleu, v=5 μm/s en rouge et v=10 μm/s en vert). Le nombre de cellules testées pour chaque condition est identique à (A) et (B). Le point dans les boîtes à moustache représente la valeur moyenne pour chaque condition, les barres d'erreur sont les valeurs ±SD et la ligne horizontale dans chaque boîte à moustache représente la valeur médiane.

La force maximale de détachement F^* ainsi que le travail d'adhésion W_{adh} augmentent statistiquement lorsque la vitesse de séparation augmente. Il est important de souligner que la dispersion importante est le reflet de la variabilité intracellulaire. Les valeurs du module d'élasticité E_{cell} , mesurées dans la phase d'indentation, sont également sujettes à de larges variations qui ont la même origine : la variabilité intercellulaire. En raison de cette variabilité physiologique de la rigidité cellulaire, les données de dé-adhésion (F^* et W_{adh}) sont obtenues dans des cellules ayant chacune leurs propriétés mécaniques. Les valeurs moyennes de ces deux paramètres (voir F^* et W_{adh} présentées dans le tableau 1) mettent en évidence une corrélation imparfaite avec la vitesse de rétraction. En réalité, les données de dé-adhésion sont obtenues dans des conditions où le taux de chargement est différent pour chaque cellule. Le taux de chargement est obtenu par la formule $r_f = k_{cell} \times v$ (équation (11)) avec k_{cell} la raideur cellulaire, donnée par $k_{cell} = E_{cell} \times \delta$. Le paramètre δ correspond à la distance caractéristique de la déformation cellulaire que nous proposons de calculer cellule par cellule à partir de la formule $\delta = W_{adh} / F^*$. Cette estimation nous paraît plus fine que celle faite à partir de la pente de la courbe force-distance qui n'est pas constante (voir figure 44A). Les valeurs moyennes et les écarts types de ces différents paramètres sont donnés dans le tableau 1. Les valeurs moyennes de δ sont de l'ordre de 2 μm avec un écart supérieur à 1 μm . Il est donc possible de calculer, cellule par cellule, la valeur du taux de chargement (global) correspondant à la force maximale de détachement F^* mesurée. Le tableau 1 présente les valeurs moyennes et les écarts types du taux de chargement global qui sont clairement corrélées à la vitesse de rétraction. Elles varient entre 1420 et 10200 pN/s mais les écarts types sont très importants alors que les forces maximales de détachement varient de 0,84 nN à 1,71 nN. Ces valeurs correspondent à la force globale de rupture du système d'adhésion créée après 2 s de stabilité entre la sonde et la cellule A549. Il s'agit d'un système de liens

multiples qui va subir un détachement progressif à mesure que la distance de séparation continue d'augmenter (figure 29). La démarche utilisée pour extraire les paramètres clés de ce système d'adhésion multiple consiste à chercher une corrélation linéaire entre F^* et $\ln r_f$ (équation (10) et figure 3 de Nguyen et al. 2017) à partir d'un graphique représentant l'ensemble des points mesurés (un par cellule et « n » dans le tableau 1 représente le nombre de cellules mesurées).

Tableau 1 : Valeurs moyennes des paramètres globaux de mécanique et d'adhésion, estimation de la distance caractéristique de la déformation cellulaire et calcul du loading rate global pour différentes vitesses d'indentation ou de séparation (v= 2, 5 ou 10 $\mu\text{m/s}$)

	v=2 $\mu\text{m/s}$ (n=100)		v=5 $\mu\text{m/s}$ (n=121)		v=10 $\mu\text{m/s}$ (n=112)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Global detachment force F^* (nN)	0.84	0.27	1.7	0.53	1.71	0.53
Work of detachment W_{adh} (nN $\times\mu\text{m}$)	1.68	1.1	3.53	2.03	4.17	1.7
Young's modulus E_{cell} (Pa)	394	284	528	337	438	256
Characteristic distance δ (μm)	1.96	1.02	2.18	1.27	2.58	1.14
Global loading rate r_f (pN/s)	1.42×10^3	1.13×10^3	5.02×10^3	3.19×10^3	1.02×10^4	5.81×10^3

L'analyse statistique des événements de rupture individuels a été effectuée sur les mêmes cellules. Le tableau 2 présente les valeurs moyennes de f^* avec les écarts types. Les valeurs de f^* sont dans une gamme de 60 à 115 pN. Il s'avère que ces valeurs sont en accord avec la gamme de forces de rupture de liens simples (40-100 pN) obtenus sur les intégrines $\alpha_2\beta_1$ avec une méthode de spectroscopie de force appliquée sur les liens individuels (Taubenberger et al. 2007).

Tableau 2 : Valeurs moyennes des forces de rupture et du taux de chargement à l'échelle locale estimées pour trois vitesses de séparation prédéterminées ($v = 2, 5$ ou $10 \mu\text{m/s}$)

	$v=2\mu\text{m/s}$ ($n=64$)		$v=5\mu\text{m/s}$ ($n=79$)		$v=10\mu\text{m/s}$ ($n=28$)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Local rupture force f^* (pN)	59.1	35.8	77.3	35.4	114.6	40.6
Local stiffness $k_{local} = df/dx$ (pN/ μm)	131.7	114.9	61.9	45.1	93.2	75.5
Local loading rate r_f (pN/s)	263.3	229.7	309.6	225.3	931.9	755.3

Nos conditions expérimentales et celles de l'étude de Taubenberger sont assez similaires : le temps de contact $\ll 1$ min (respectivement 2s et 50 ms), le taux de chargement modéré $< 10^4$ pN/s, les intégrines $\alpha_2\beta_1$ présentes dans les deux études et notamment sur les cellules A549. Les valeurs moyennes des forces de rupture sont corrélées à la vitesse de rétraction mais leur dispersion est importante (voir tableau 2 et figure 4 de Nguyen et al. 2017) et doit être associée à la dispersion des taux de chargement locaux $r_f = k_{local} \times v$, eux-mêmes liés à la raideur locale $k_{local} (= df/dx)$ (figure 25) qui n'est pas corrélée à la vitesse de rétraction (tableau 2). En revanche, elle dépend de chaque cellule et surtout du système moléculaire auquel est connectée chaque intégrine individuelle. Au bilan, il apparait clairement dans le tableau 2 que le taux de chargement local est corrélé à la vitesse de rétraction. Pour obtenir les paramètres clés de cette adhésion individuelle, il convient de rechercher une corrélation entre f^* et $\ln r_f$ (figure 5 de Nguyen et al. 2017) à partir d'un graphique représentant l'ensemble des points mesurés (un par évènement et « n » dans le tableau 2 représente le nombre d'évènements interprétables en termes de raideur, c'est-à-dire, permettant de calculer k_{local} juste avant la rupture).

Tableau 3 : Relation linéaire entre force et le taux de chargement globalement à l'échelle cellulaire (haut du tableau) et localement pour chaque évènement de rupture (bas du tableau)

		Slope ($\approx F_\beta$) (pN)	Intercept (pN)	R	x_β (nm)	K_{off}^0 (s ⁻¹)	T_{off}^0 (s)
Global detachment force-global loading rate	Whole data set (n=332)	342	-1.36×10 ³	0.57	0.012	0.16	6.4
		Slope ($\approx f_\beta$) (pN)	Intercept (pN)	R	x_β (nm)	k_{off}^0 (s ⁻¹)	t_{off}^0 (s)
Local rupture force-local loading rate	Whole data set (n=171)	29.7	-88.1	0.69	0.138	0.65	1.53

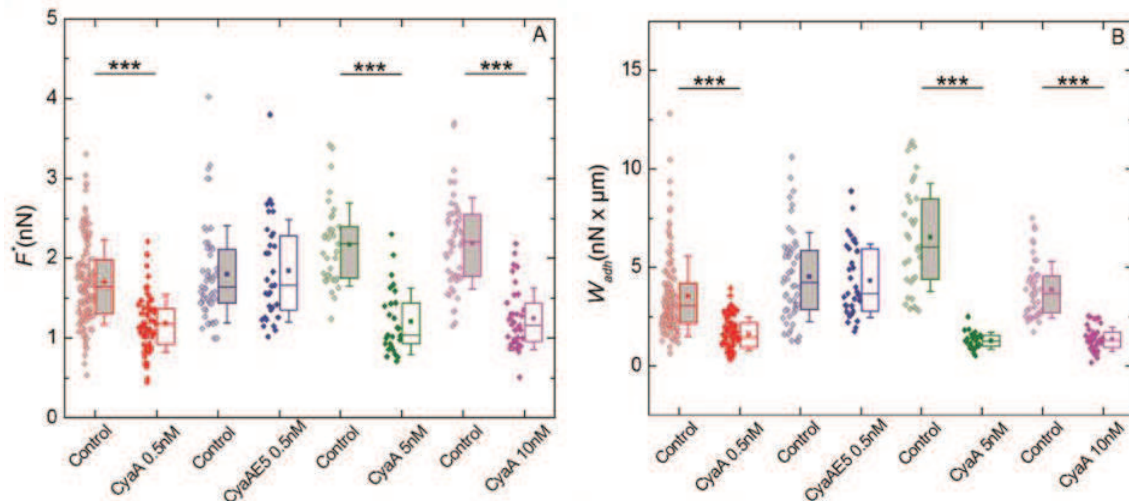
Le tableau 3 présente la dernière étape de la mise en œuvre de la méthode MFS. La régression linéaire calculée avec la méthode des moindres carrés pour la relation globale $F^* - \ln r_f$ (estimée sur 332 cellules) et pour la relation locale $f^* - \ln r_f$ (estimée sur 171 évènements des 332 cellules). L'équation (10) montre que la pente de la relation $F^* - \ln r_f$ représente F_β alors que la pente de la relation $f^* - \ln r_f$ représente f_β . L'hypothèse de la configuration parallèle (en AFM) permet de déterminer le nombre de liens associés (mais gardant leur propre cinétique) puisque $F_\beta = Nf_\beta$. Les valeurs reportées dans le tableau 3 nous amènent à $N \approx 12$. Les calculs de K_{off}^0 et k_{off}^0 ou leurs inverses respectifs T_{off}^0 et t_{off}^0 effectués à partir des intersections des relations linéaires sur l'axe vertical aboutit à des temps de vie globaux de 6,4 s et individuels de 1,53 s pour les liens. Le fait que $T_{off}^0 > t_{off}^0$ ne soit qu'un aspect du renforcement permis par l'association des liens en parallèle (équation (4)), la contribution la plus manifeste apparaît sur les forces de ruptures puisque d'une façon générale, nous observons $F^* \gg f^*$, mais toute comparaison quantitative précise est hasardeuse. En effet, il faut tenir compte des taux de chargement globaux et locaux. Nous

noterons que le rapport des taux de chargement (par exemple à $v = 5 \mu\text{m/s}$) est de l'ordre de grandeur de N (tableaux 1 et 3) comme attendu en configuration parallèle.

La **méthode MFS** validée sur les cellules épithéliales alvéolaires permet de fournir les paramètres fondamentaux extrapolés de **l'adhésion multiple** et la relation avec les **paramètres individuels des intégrines qui composent ce lien collectif**. Cela permet de **déterminer le nombre de liens associés** (en gardant leur propre dynamique aléatoire). Nous trouvons ici $N \approx 12$ en condition contrôle. Nous noterons que les valeurs trouvées pour les différents paramètres (f^* , f_β , k_{off}^0) caractérisant les liens intégrines-ligand individuels, sont en accord avec la littérature (Li et al. 2003 ; Sun et al. 2005).

○ *Application à l'étude des effets cellulaires et moléculaires de CyaA*

Nous avons d'abord cherché à évaluer l'effet des différentes concentrations de CyaA sur les paramètres d'adhésion (F^* et W_{adh}) et de mécanique (E_{cell}) mesurés par la méthode MFS. Pour cela, nous avons exposé les cellules A549 aux trois concentrations de la toxine (0.5, 5 et 10 nM) durant le temps nécessaire à l'expérience c'est-à-dire 30 min en moyenne. Les résultats sont présentés en figure 50 (extrait de Angely et al. 2017).



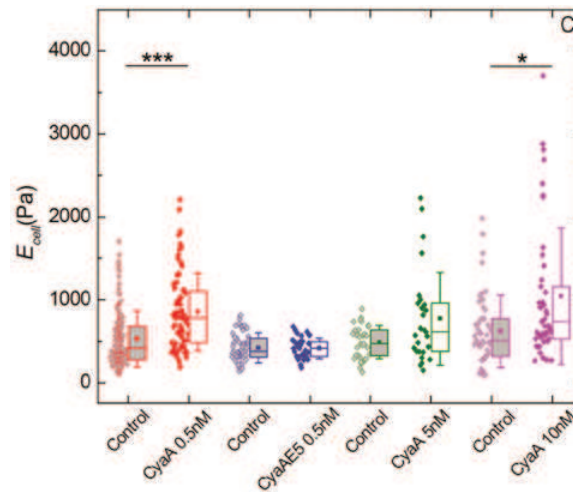


Figure 50 : Évaluation statistique des paramètres d'adhésion (F^* et W_{adh}) et de mécanique (E_{cell}) mesurés par la méthode MFS sur des cellules A549 exposées aux trois concentrations de la toxine CyaA

(A) La force maximale de détachement (F^* en nN), (B) le travail d'adhésion (W_{adh} en nN $\times\mu$ m) et (C) le module d'élasticité E_{cell} (en Pa) ont été mesurés sur des cellules A549 par la méthode MFS. Les mesures ont été obtenues pour une même valeur de vitesse de rétraction et d'indentation, soit 5 μ m/s. Des cellules A549 ont été exposées à la condition contrôle, ou aux trois concentrations de CyaA (0.5, 5 et 10 nM) ou encore à la toxine modifiée CyaAE5 à 0.5 nM, et cela, pour tout le temps de l'expérience, c'est-à-dire 30 min en moyenne. Chaque point représente une cellule. Le nombre de cellules est compris entre 30 et 120 selon les conditions. Les points dans les boîtes à moustache représentent la valeur moyenne pour chaque condition, les barres d'erreur sont les valeurs $\pm$ SD et la ligne horizontale dans chaque boîte à moustache représente la médiane. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$.

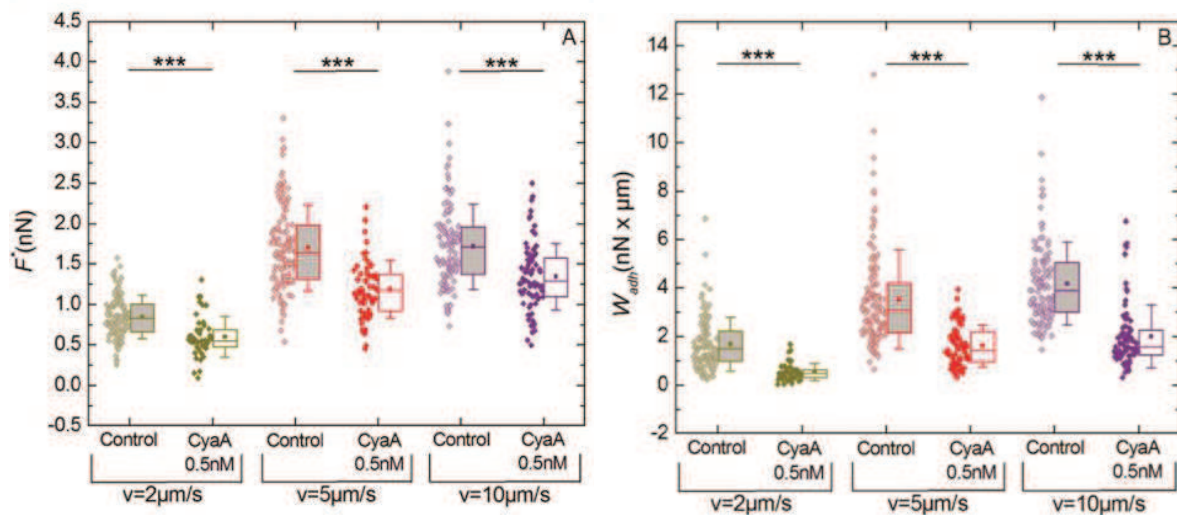
L'analyse de ces résultats montre que l'exposition à la toxine CyaA induit, comparativement aux contrôles, une diminution très significative de la force de détachement maximale F^* et du travail d'adhésion W_{adh} à toutes les concentrations de la toxine. En revanche, l'exposition au mutant CyaAE5 n'a pas d'effet sur ces paramètres puisque les valeurs obtenues sont similaires à celles obtenues pour la condition contrôle.

Nous constatons par ailleurs que la toxine CyaA à la plus faible concentration (0.5 nM), augmente de façon significative le module d'élasticité, ce que l'on retrouve de façon moins marquée pour la plus forte concentration de CyaA, à savoir, 10 nM mais n'a pas d'effet significatif à 5nM. Ces résultats obtenus sur le module d'élasticité confirment et précisent une tendance qui avait été observée en MTC, c'est-à-dire une augmentation de la rigidité

cellulaire induite par la toxine. En revanche, ils mettent en évidence un effet marqué de la toxine sur l'adhésion cellule-matrice multiple et précoce qui n'avait pas été détectée en MTC.

Il est important de rapporter une observation que nous avons faite lors de cette expérience. Aux plus fortes concentrations (5 et 10 nM) de la toxine, nous avons remarqué la présence de petits débris cellulaires (probablement due à la part de cellules mortes quantifiée avec les tests de viabilité présentés au début de ce chapitre de *Résultats et Discussion*). Ces débris sont susceptibles d'occasionner une gêne au cours des manœuvres spectroscopiques. C'est une des raisons pour lesquelles les expériences ultérieures ont été faites uniquement à la concentration 0,5 nM de la toxine, concentration qui génère un nombre quasi négligeable de mort cellulaire comme montré précédemment.

Nous avons ensuite cherché à évaluer l'effet de la vitesse d'indentation/rétraction sur les paramètres d'adhésion et de mécanique en présence de CyaA 0.5 nM. L'objectif est d'obtenir des données d'adhésion sur une plage suffisante de taux de chargement.



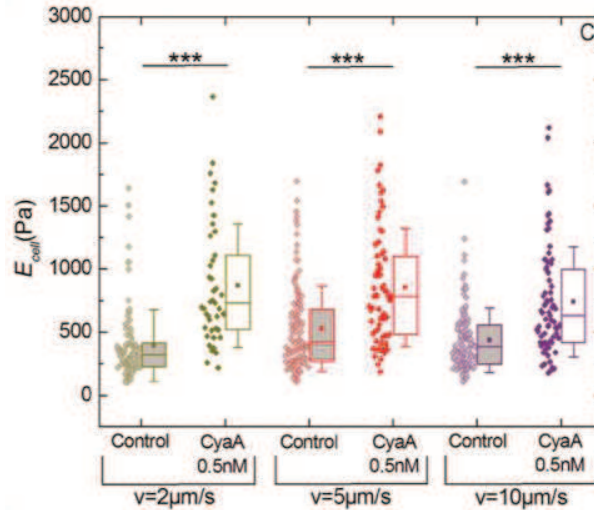


Figure 51 : Évaluation statistique des paramètres d'adhésion et de mécanique par la méthode MFS de cellules A549 exposées à toxine CyaA 0.5 nM pour trois vitesses d'indentation/rétraction (échelle globale ou cellulaire)

(A) La force maximale de détachement (F^* en nN), (B) le travail d'adhésion (W_{adh} en nN $\times\mu$ m) et (C) le module d'élasticité E_{cell} (en Pa) ont été mesurés sur des cellules A549 par la méthode MFS. Les mesures ont été obtenues pour une même concentration de CyaA (0.5 nM) mais pour différentes vitesses d'indentation ou de rétraction ($v= 2, 5$ ou $10 \mu\text{m/s}$) pour une exposition moyenne de 30 min. Les données à $5 \mu\text{m/s}$ ont déjà été présentées en figure 50. Le nombre de cellules varie entre 42 et 77 selon les conditions. Les points dans les boîtes à moustaches représentent la valeur moyenne pour chaque condition, les barres d'erreur sont les valeurs $\pm$ SD et la ligne horizontale dans chaque boîte à moustache représente la médiane. * : $p<0.05$; ** : $p<0.01$; *** : $p<0.001$.

Les résultats, présentés en figure 51, montrent que pour les trois vitesses de séparation (2, 5 ou $10 \mu\text{m/s}$), l'exposition à CyaA 0.5 nM agit en diminuant très significativement la force maximale de détachement F^* et le travail d'adhésion W_{adh} (figure 51A et B). Le rôle de CyaA 0.5 nM sur le module d'élasticité E_{cell} est observé aux trois vitesses. La toxine augmente significativement E_{cell} comparé aux valeurs de contrôle (figure 51C). Les données obtenues avec la toxine CyaA présentent une dispersion au moins aussi importante que celle obtenue sans CyaA. La dispersion des modules d'élasticité nécessite avec ou sans toxine de calculer le taux de chargement cellule par cellule en utilisant la méthodologie indiquée plus haut. Les valeurs moyennes et écart-types des différents paramètres d'adhésion et de mécanique obtenus sur les cellules exposées à CyaA 0,5 nM au niveau global (cellulaire) sont présentés sur le tableau 4 (extrait du SM7 de Angely et al. 2017). Dans ce tableau 4, les

données obtenues sur les cellules non exposées à CyaA sont entre parenthèse (déjà présentées sur le tableau 2). F^* et W_{adh} augmentent avec la vitesse de rétraction alors que les valeurs de module d'élasticité ne sont pas corrélées avec cette vitesse. Les distances caractéristiques δ sont systématiquement plus basses dans les cellules exposées à la toxine que les cellules non exposées. Finalement, l'effet de l'exposition à CyaA sur la gamme de taux de chargement moyens est négligeable en raison d'un phénomène de compensation entre E_{cell} qui augmente et δ qui diminue. La recherche d'une corrélation linéaire entre F^* et $\ln r_f$ est faite comme précédemment à partir du graphique présenté en figure 52 (voir également tableau 4). Le nombre total de cellules « n » analysées est de 187.

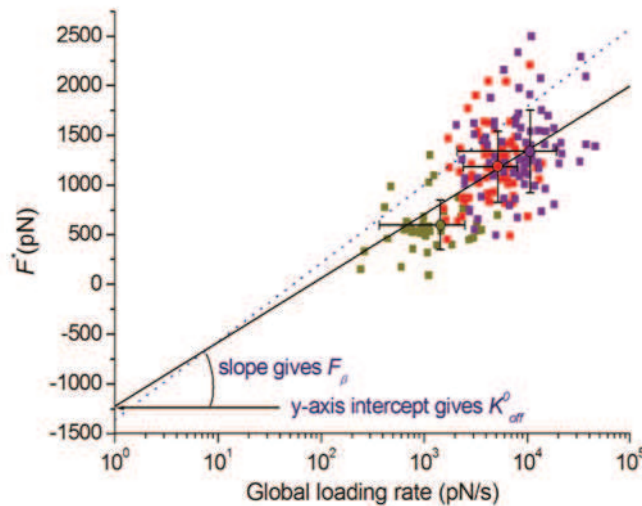


Figure 52 : Relation entre la force maximale de détachement F^* et le taux de chargement r_f à l'échelle globale (cellulaire) pour les cellules exposées à la toxine CyaA 0,5 nM

La relation entre la force maximale de détachement (en pN) et le *loading rate* global (en pN/s) a été tracée selon une échelle logarithmique dont les cellules A549 (n=187) ont été exposées à la plus faible concentration de CyaA (0.5 nM) et pour 3 vitesses de rétraction prédéterminées $v=2 \mu\text{m/s}$ (points verts), $v=5 \mu\text{m/s}$ (points rouges) et $v=10 \mu\text{m/s}$ (points violets). Chaque point représente une cellule. La droite continue représente la régression linéaire obtenue pour les cellules exposées à la toxine CyaA. La droite en pointillée correspond aux cellules non exposées (condition contrôle).

La pente de la régression linéaire (droite continue) permet d'obtenir la force de référence F_β = 280 pN qui est sensiblement plus basse pour les cellules exposées comparé aux cellules non exposées où F_β = 342 pN (voir tableau 4).

La comparaison doit être menée pour les événements de rupture localisés, c'est-à-dire, les liens individuels intégrines pour les cellules exposées à la toxine. Les données individuelles sont présentées dans le tableau 4 (n=50). La force de rupture moyenne f^* est corrélée à la vitesse de rétraction de la sonde comme le montre le tableau 4 et la figure 51. La toxine CyaA a un effet significatif sur les liens individuels puisqu'elle augmente la force de rupture moyenne f^* pour les trois vitesses de rétraction testées. Ce résultat suggère un renforcement des liaisons intégrines à la concentration de CyaA la plus basse (0,5 nM). Il faut cependant souligner que cette évolution locale s'opère dans un contexte global où l'adhésion est affaiblie par la toxine. Ce résultat peut sembler paradoxal mais nous allons en discuter plus loin.

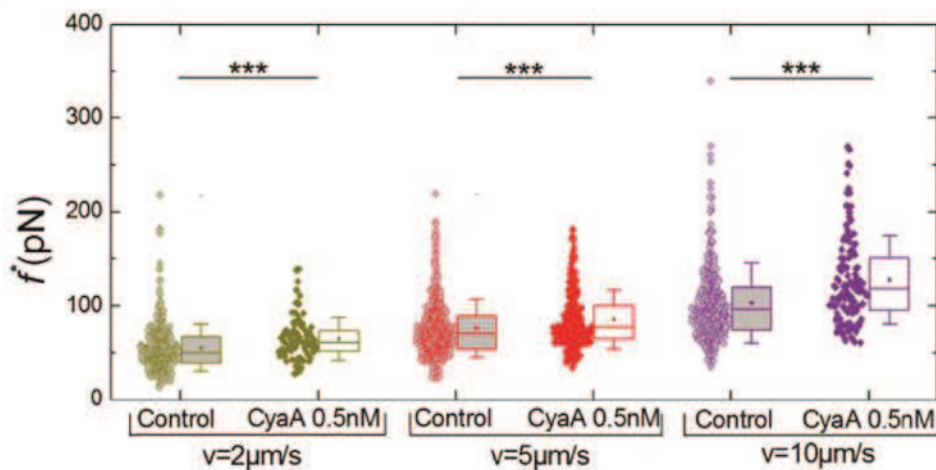


Figure 53 : Evaluation statistique des forces de rupture à partir des événements locaux pour les cellules A549 exposées à la toxine CyaA 0,5 nM pour différentes vitesses de rétraction

La force de rupture (f^* en pN) a été mesurée pour les événements de rupture interprétables sur des cellules A549 par la méthode MFS n=187 (détails dans le tableau 4). Les mesures ont été obtenues pour une même concentration de CyaA (0,5 nM) et pour les trois vitesses de rétraction ($v=2, 5$ et $10 \mu\text{m/s}$) pour une exposition moyenne de 30 min. Les points dans les boîtes à moustaches représentent la valeur moyenne pour chaque condition, les barres d'erreur sont les valeurs $\pm\text{SD}$ et la ligne horizontale dans chaque boîte à moustache représente la valeur médiane. * : $p<0,05$; ** : $p<0,01$; *** : $p<0,001$.

La valeur du taux de chargement précédant chaque événement de rupture (uniquement obtenues quand la raideur de la pente de la courbe force-distance est mesurable) est plus élevée dans les cellules traitées (tableau 4), ce qui suggère que la toxine produit une

rigidification à l'échelle moléculaire de la cellule exposée à CyaA, ce qui est cohérent avec l'augmentation de la force de rupture observée sur la figure 53. Les valeurs individuelles de force de rupture f^* sont corrélées au taux de chargement r_f local comme le montre la figure 54. La pente de la relation $f^* - \ln r_f$ (n=50) donne la valeur des f_β individuels dans les cellules exposées à la toxine soit $f_\beta = 45$ pN, ce qui est supérieur aux cellules de la condition contrôle : ($f_\beta \approx 30$ pN) (tableau 4).

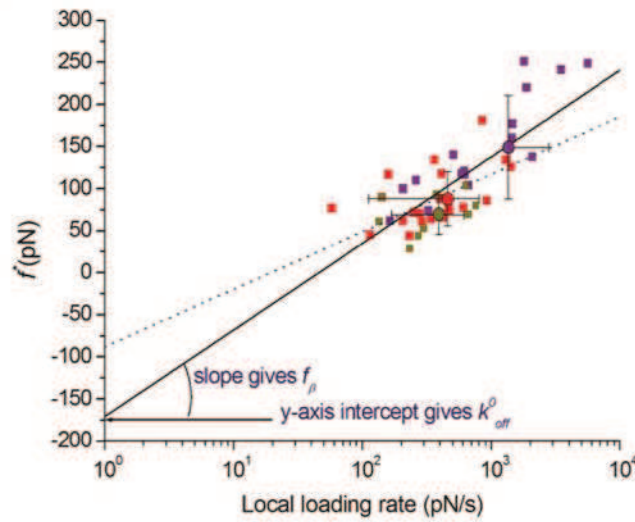


Figure 54 : Relation entre la force de rupture f^* et le taux de chargement $\ln r_f$ à l'échelle locale

La relation entre la force de rupture f^* (en pN) et le taux de chargement local (en pN/s) a été tracée selon une échelle logarithmique dont les cellules A549 ont été exposées à la plus faible concentration de CyaA (0,5 nM) et pour 3 vitesses de rétraction $v=2$ $\mu\text{m/s}$ (points verts) ; $v=5$ $\mu\text{m/s}$ (points rouges) et $v=10$ $\mu\text{m/s}$ (points violets). Chaque point représente un événement de rupture n=50 (détail dans le tableau 4). La droite continue représente la corrélation linéaire obtenue dont la pente permet de déterminer f_β . La droite en pointillés représente la régression linéaire obtenue en condition contrôle (voir tableau 2 et figure 5 dans Nguyen et al. 2017).

Le rapport $F_\beta / f_\beta = 280/45$ soit $N \approx 6$ obtenu pour les cellules exposées à la toxine CyaA montre une diminution par 2 du nombre de liens associés (ou clusterisés) comparé au $N \approx 12$ trouvé pour les cellules non exposées.

L'intersection avec l'axe vertical $r_f = 1$ pN/s permet de calculer le taux de dissociation naturel k_{off}^0 (en s^{-1}) d'après la relation $[f^*]_{\ln(r_f)=0} = -f_\beta \ln(k_{off}^0 f_\beta)$. Alternativement, le temps de vie naturel (à la force nulle) et local (lien individuels) t_{off}^0 peut être obtenu. La toxine CyaA a un effet d'augmentation sur k_{off}^0 puisque $k_{off}^0 = 1.02 s^{-1}$ dans les cellules exposées alors que $k_{off}^0 = 0.65 s^{-1}$ dans les cellules non exposées. La diminution de la valeur de x_β dans les cellules exposées à la toxine suggère que la barrière énergétique des intégrines individuelles est déplacée vers l'intérieur avec CyaA et sa hauteur est abaissée en l'absence de force (k_{off}^0 augmente). L'effet de la toxine sur la force de rupture f^* est dû à l'augmentation du taux de chargement local induit par CyaA (tableau 4). Les raisons de cette augmentation restent à préciser mais le remodelage de la structure pourrait jouer un rôle.

Tableau 4: Paramètres d'adhésion obtenus par l'analyse des régressions linéaires aux échelles globale et locale sur cellules exposées à la toxine et cellules non exposées (valeurs entre parenthèses)

		Values for exposure to CyaA 0.5 nM					
		Slope ($\approx F_\beta$) (pN)	Intercept (pN)	R	x_β (nm)	K_{off}^0 (s^{-1})	T_{off}^0 (s)
Relationship: Maximal detachment force- Ln(global loading rate)	Whole data set n=187 (n=332)	280 (342)*	-1.22×10^3 (-1.36×10^3)	0.6 (0.57)	0.015 (0.012)	0.28 (0.16)	3.52 (6.4)
		Slope ($\sim f_\beta$) (pN)	Intercept (pN)	R	x_β (nm)	k_{off}^0 (s^{-1})	t_{off}^0 (s)
Relationship: Individual rupture force- Ln(local loading rate)	Whole data set n=50 (n=171)	45 (29.7)	-170.8 (-88.1)	0.77 (0.69)	0.092 (0.138)	1.02 (0.65)	0.98 (1.53)

La **méthode MFS** a été spécialement développée pour permettre l'**évaluation de l'adhésion multiple** et notamment le **nombre et la force des liens intégrines travaillant en association** mais restés **dynamiquement indépendants** (c'est-à-dire capables de rompre de

façon aléatoire). La caractérisation des forces de rupture des liens collectifs et individuels suppose de **quantifier le taux de chargement correspondant à chaque condition**, c'est-à-dire, au niveau de la cellule globale (par la loi de Hertz) et au niveau des événements de rupture individuels (par la pente de la courbe force-distance). Appliquée aux cellules épithéliales alvéolaires (A549), la méthode MFS fait apparaître pour la première fois que la **toxine CyaA**, même à la plus petite concentration (0.5 nM) et pour des temps courts d'exposition (~ 30 min), **affaiblit l'adhérence dans la phase initiale de son renforcement**. Les résultats obtenus mettent en évidence que ce processus d'affaiblissement de l'adhérence dans les cellules intoxiquées est causé par deux mécanismes qui sont quantifiés dans les conditions expérimentales étudiées : (1) une **diminution de l'énergie d'adhésion des liens individuels** (après exposition à la toxine, le taux de dissociation à force nulle k_{off}^0 des liens intégrines composant le lien multiple est augmenté (ou inversement, leur temps de vie t_{off}^0 est diminué d'environ 60%), et (2) **le nombre de liens travaillant en association est diminué** (par 2 environ) après exposition à la toxine. Ainsi, la méthode **MFS permet d'évaluer les modifications induites par la toxine CyaA en termes d'énergie des liens individuels et de nombre de liens associés**. Ainsi, nous pouvons montrer que la toxine a un effet sur ces deux paramètres fondamentaux pour toute adhésion. L'hypothèse selon laquelle l'exposition à CyaA diminue par 2 le nombre de liens néoformés à la surface apicale de la cellule suggère une **atteinte du clustering des intégrines** (par une baisse de leur activation et/ou par d'autres processus à déterminer) puisque l'énergie des liens intégrine-ligand individuels est affectée.

5. DISCUSSION GENERALE

5.1. Contribution à la connaissance des effets physiopathologiques de CyaA

La toxine adénylate cyclase (CyaA) est l'un des facteurs virulents les plus importants de la bactérie *Bordetella pertussis* (*Bp*), agent responsable de la coqueluche. Cette toxine agit dans la phase précoce d'intoxication de l'appareil respiratoire par la bactérie *Bp* (Goodwin and Weiss 1990). L'étude *in vitro* que nous avons réalisée sur cellules vivantes confirme la rapidité des processus d'invasion puis d'intoxication cellulaires. Ainsi, des temps de 30 min d'exposition à la toxine sont largement suffisants pour observer des effets cellulaires majeurs, ce qui veut dire reconnaissance, pénétration intracytoplasmique, et changements structuraux et adhésifs des cellules infectées.

La toxine CyaA a été identifiée il y a plus de trente ans et a été remarquée pour ses multiples compétences en termes d'invasion et d'intoxication : elle est capable de pénétrer dans un grand nombre de cellules eucaryotes avec une grande affinité pour les cellules de l'immunité comme les macrophages et les neutrophiles en raison de l'expression par ces cellules du récepteur $\alpha_M\beta_2$ (connu également sous le nom de CD11b/CD18 ou CR3) sur lequel CyaA vient se fixer (Guermonprez et al. 2001). En l'absence d'expression de ce récepteur chez la cellule-cible, CyaA est capable de transloquer son domaine catalytique directement au travers de la membrane plasmique des cellules cibles (Hewlett, Donato, and Gray 2006). Nos résultats confirment l'efficacité de ce mécanisme dans les cellules dépourvues d'intégrines $\alpha_M\beta_2$ comme les cellules épithéliales alvéolaires et les cellules épithéliales des voies aériennes bronchiques et supérieures, avec toutefois des différences de sensibilité à la toxine que ce travail a permis de mettre en évidence. Les causes de ces différences restent à préciser. Nous avons déjà souligné plus haut que les cellules épithéliales alvéolaires ne possèdent pas les moyens de défense des cellules épithéliales bronchiques et de voies supérieures,

notamment une couche de mucus dont la fonction première est la captation des polluants et des pathogènes (Eby et al. 2010; Hasan et al. 2018).

Une fois l'étape de translocation intracytoplasmique du domaine catalytique réalisée, la toxine CyaA détourne la machinerie de la cellule cible (*via* la calmoduline) pour catalyser de hauts niveaux d'AMPc qui vont mener à un dysfonctionnement de la cellule cible (Ladant and Ullmann 1999). Nos résultats confirment les changements considérables (sur plusieurs ordres de grandeur) du taux d'AMPc résultant de l'exposition à la forme active de CyaA. L'absence d'effets fonctionnels qui caractérise l'exposition à la forme inactive de la toxine, CyaAE5, laquelle est incapable de transloquer son domaine catalytique, apporte une nouvelle preuve que cette translocation est une étape obligée de l'intoxication.

C'est grâce à ses capacités de translocation y compris dans les cellules non immunitaires que la toxine adénylate cyclase est vue comme un outil de pénétration intracytoplasmique exceptionnel qui ouvre de nouveaux champs d'applications dans les domaines de la microbiologie et de la biochimie (notamment pour la vaccination) (El-azami-el-idrissi et al. 2003).

Très récemment, une équipe a mis en évidence le rôle de CyaA sur l'altération des jonctions cellule-cellule de l'épithélium bronchiques et sur les conséquences physiopathologiques de ces disjonctions cellulaires (Hasan et al. 2018). Notre étude apporte un ensemble de résultats complémentaires montrant des modifications fonctionnelles de l'épithélium intoxiqué, et en particulier l'augmentation de la perméabilité d'un épithélium reconstitué cohérente avec les travaux d'Hasan et al.

Par ailleurs, il a été montré dans différentes études sur la barrière endothéliale, dont certaines ont été menées au laboratoire (Caluch 2013), que la perte de l'intégrité d'une barrière cellulaire confluyente signifie une remise en cause des équilibres de forces mécaniques entre la tension interne du cytosquelette de chaque cellule et les interactions moléculaires

basolatérales avec le microenvironnement. Ces déséquilibres, qu'ils résultent d'une intoxication ou d'un stress mécanique ou chimique, impliquent des modifications des voies de mécanotransduction et de mécanotransmission, lesquelles sont indispensables au bon fonctionnement cellulaire. Dans notre étude menée sur des cellules épithéliales, nous montrons comment le cytosquelette d'actine d'une part et les protéines de liaison à la MEC (intégrines) d'autre part, sont affectés par l'intoxication induite par CyaA. Le sens des évolutions observées constitue la signature de la toxine CyaA et cela mérite donc d'être discuté.

Dans les conditions de notre étude, ces évolutions ne peuvent pas résulter de la mort cellulaire puisque les effets de l'intoxication sont testés à la concentration de 0,5 nM, concentration pour laquelle nous avons mesuré une viabilité cellulaire proche de 100 %.

Concernant les réponses cellulaires observées, il convient premièrement d'examiner la cohérence entre les changements de propriétés mécaniques et les changements de forme cellulaire observés en imagerie. Nous avons en effet observé à l'aide de la microscopie confocale, un arrondissement de la forme cellulaire confirmé par l'augmentation de la hauteur, qui devient nettement significative pour les plus fortes concentrations de CyaA (voir figure 43). Cette évolution de la forme cellulaire a été par ailleurs rapportée dans d'autres études sur les effets de la toxine CyaA (après 2h d'exposition à 20 ng/ml $\approx$ 40 nM pour des cellules épithéliales alvéolaires de rat dans l'étude d'Ohnishi et al. 2007) et sur les cellules musculaires lisses après exposition à la souche *Clostridium botulinum* C3 dans l'étude de Pelletier et al. 2005. Ce changement de morphologie cellulaire, s'accompagne d'un remodelage du cytosquelette d'actine tant cortical que profond mais de nombreuses fibres de stress subsistent à la plus faible concentration de la toxine CyaA (0,5 nM) (voir figure 2 de l'article Angely et al. 2017). Paradoxalement, les outils de mécanique cellulaire (MTC et AFM) nous ont permis de mettre en évidence une augmentation de la rigidité cellulaire dans

un contexte où le niveau d'actine diminue globalement (figures 46C, 47C et 50C) et où les points focaux d'adhésion diminuent en nombre et en taille après intoxication (figure 44). Un examen plus détaillé des résultats mécaniques permet de remarquer que le module d'élasticité mesuré par indentation en AFM augmente dans les cellules exposées à 0,5 nM, ce qui traduit une augmentation de la rigidité corticale (figure 50C). En revanche, les résultats obtenus en MTC concernant le module d'élasticité ne montrent pas d'augmentation significative à 0,5 nM même après 24 heures d'exposition à CyaA, mais cette augmentation de rigidité cellulaire devient significative à 5 et 10 nM (figure 47C). Les deux méthodes (MTC et AFM) ne réalisent pas la même déformation cellulaire. En conséquence, les résultats, bien que cohérents pour les tendances observées, peuvent présenter des différences quantitatives. D'autre part, les retentissements cellulaires induits par l'augmentation supraphysiologique des taux d'AMPc ne sont pas réellement connues dans les cellules épithéliales étudiées. Des modifications de la balance des Rho GTPases (Rac1 et RhoA) pourraient jouer un rôle dans ces changements de rigidité cellulaire en raison des augmentations d'AMPc. Il a en effet été montré sur des cellules du muscle lisse vasculaire (SMCV) que l'augmentation d'AMPc inhibe les voies de signalisation Rac1-dépendantes alors que RhoA n'est pas ciblée par ces changements, entraînant des modifications de forme cellulaire et notamment un arrondissement cellulaire (Pelletier et al. 2005) comme celui observé dans notre étude. En outre, avec l'AFM, la sonde est positionnée pour tester préférentiellement le CSQ cortical alors qu'avec la MTC, la sonde est en relation avec les composantes profonde et corticale du CSQ (Laurent et al. 2003). Il n'est donc pas étonnant que l'AFM soit plus adapté que la MTC pour détecter des changements de rigidité cellulaire induits par la toxine qui, en inhibant Rac1, va agir préférentiellement sur la formation des structures corticales aux dépens de la structure profonde (Allen et al. 1997; Hasan et al. 2018).

À notre connaissance, la diminution du nombre de liens constitutifs d'un site d'adhésion initial de type cellule-matrice est actuellement documentée et quantifiée pour la première fois sur les cellules épithéliales alvéolaires exposées à la toxine CyaA. Il est important de noter que ce résultat révèle une altération du clustering des intégrines, ce qui apparaît cohérent avec l'hypothèse précédente à propos d'une inhibition de la voie de signalisation Rac1-dépendante induite par les hauts niveaux d'AMPc. La maturation des sites d'adhésion en formation de type complexes focaux (« Focal Complex » structures d'adhésion caractéristiques du lamellipodium) est connue pour être sous le contrôle de Rac1 (Kaverina, Krylyshkina, and Small 2002). L'atteinte par la toxine de l'adhésion dans sa phase de développement est également en accord avec l'atteinte des jonctions cellule-cellule et l'augmentation de la perméabilité cellulaire après exposition à CyaA comme nous l'avons montré en figure 42 et comme l'ont montré des travaux récents (Hasan et al. 2018). Le mécanisme de réponse cellulaire à la toxine CyaA serait donc un peu différent de celui causé par un stress mécanique cyclique observé sur HPMEC (Caluch 2013). Le schéma présenté en figure 55 résume les effets interdépendants attendus sur les cellules épithéliales alvéolaires. L'augmentation de la rigidité cellulaire (notamment corticale) induite par la toxine est associée à un changement de forme cellulaire (arrondissement) et à un affaiblissement des adhésions cellule-matrice et cellule-cellule en raison de la modification des équilibres mécaniques entre tension corticale (augmentée) et forces d'adhésion (diminuées).

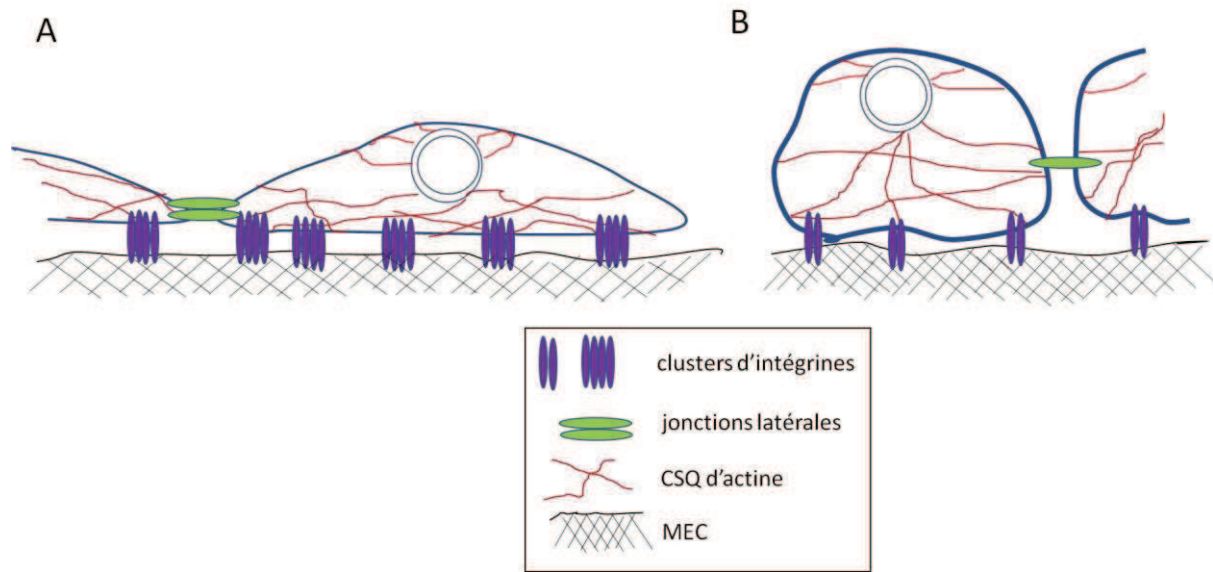


Figure 55 : Schéma synthétique des effets cellulaires et moléculaires de la toxine CyaA sur les cellules épithéliales respiratoires adhérentes

A) Cellules épithéliales respiratoires adhérentes en condition contrôle typiquement étalées en monocouche et exposant un nombre important de liens cellule-matrice, cellule-cellule avec un clustering important. Les jonctions latérales sont étanches témoignant d'une perméabilité limitée. **B)** Cellules épithéliales respiratoires adhérentes exposées à la toxine CyaA 0.5 nM disposant d'un nombre réduit de liens cellule-matrice, cellule-cellule et d'un clustering limité. Ces changements conduisent à l'arrondissement de la cellule et entraînent un affaiblissement de l'adhésion en général. La rigidité cellulaire mesurée en AFM est augmentée pour des raisons qui restent à préciser. Les jonctions latérales sont en moindre nombre indiquant une perméabilité plus importante comme observé.

Dans un contexte où la formation du lamellipodium et la maturation des adhésions initiales (Focal Complex) est ralentie par l'inhibition de la signalisation Rac1-dépendante, il n'est pas étonnant d'observer que la toxine ralentie, voire bloque complètement la migration et la réparation cellulaires dans notre modèle (figure 36). D'ailleurs, cela a déjà été montré dans le cas d'une étude sur des kératinocytes exposés à deux pathogènes : *Porphyromonas gingivalis* et *Fusobacterium nucleatum* (Bhattacharya et al. 2014). La présente étude a permis de réunir un ensemble de données expérimentales montrant les effets cellulaires et moléculaires essentiellement induits par l'exposition à la toxine CyaA. Les effets de l'augmentation de l'AMPc intracellulaire ont été étudiés au travers de l'étude de l'activation de sa kinase PKA (cAMP-dependent Protein Kinase) qui est impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine et de l'adhérence par les Rho-GTPases et Rap-1 (Howe 2004). Récemment, une analyse phospho-protéomique quantitative de la signalisation liée à l'AMPc a révélé que la

toxine CyaA provoque une altération de la phosphorylation d'un certain nombre de protéines impliquées dans la régulation de l'homéostasie du cytosquelette d'actine et de la phagocytose des cellules dendritiques (Novak et al. 2017). En plus des effets fonctionnels décrits dans ce paragraphe, des effets mécanobiologiques sont observés et méritent d'être discutés, ce qui fait l'objet du paragraphe suivant.

5.2. Contribution à l'étude des effets mécanobiologiques induits par la toxine CyaA

La présente étude montre que la toxine CyaA modifie plusieurs propriétés mécanobiologiques essentielles comme les forces d'adhérence, l'association des intégrines (clustering) et les propriétés mécaniques du cytosquelette d'actine. Ces changements suggèrent des modifications profondes de la mécanotransduction dans les cellules intoxiquées. Cette mise en évidence d'effets mécanobiologiques propres à la toxine n'aurait pas été possible sans la mise en œuvre d'outils sophistiqués d'investigation des propriétés mécaniques et d'adhésion des cellules vivantes. D'un point de vue fondamental, les techniques de MTC et d'AFM ont une base théorique commune qui prend en compte la multiplicité des liens créés entre la sonde sphérique et la cellule. Cependant, la configuration des liens ne peut être équivalente entre les deux techniques car la direction des efforts n'est pas la même. Pour l'AFM, la direction des efforts est clairement unidirectionnelle et verticale (figure 56 gauche) et la force appliquée est distribuée de façon homogène à travers les liens existants et à chaque étape de la rupture. Nous faisons donc l'hypothèse d'une configuration parallèle de liens. Pour la MTC, la direction des efforts n'est pas unidirectionnelle car il s'agit d'un couple appliqué sur la bille (figure 56 droite) qui produit des déformations dans les 3 directions de l'espace (compression à l'avant de la bille, étirement à l'arrière, cisaillement dans la partie basse). Dans ce cas de figure, nous ne pouvons espérer une distribution homogène des efforts appliqués et la configuration zipper (distribution hétérogène) semble la

plus appropriée. Il est également possible que ces deux types de configurations coexistent mais nous n'avons pas développé les outils théoriques pour traiter cet aspect.

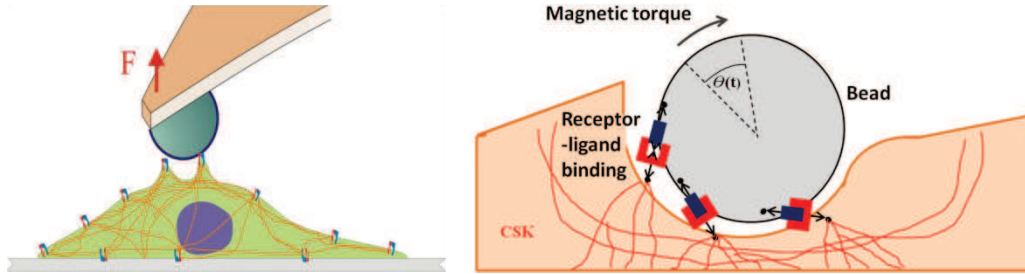


Figure 56 : Schéma illustrant la différence entre les efforts appliqués sur les liens à l'interface sonde-cellule en AFM (à gauche) et en MTC (à droite). Cela conduit à des différences de comportement du lien collectif en fonction du nombre de lien N .

De façon surprenante, les résultats obtenus en MTC n'ont pas révélé de différence significative entre la condition contrôle et l'exposition à CyaA en ce qui concerne les paramètres d'adhérence (taux de dissociation naturel K_{off}^0 et la contrainte de référence σ_c) (figures 46A et B, figures 47A et B) alors que les résultats AFM nous indiquent que les forces de rupture globale et locale ont été significativement modifiées suite à l'exposition à la toxine (figures 50A, 51A et 53). Il faut d'abord rappeler que les points d'adhésion ne sont pas dans le même état de maturation puisqu'un temps de contact de 2 s (en AFM) n'est pas suffisant pour permettre la maturation d'un site d'adhésion focale alors qu'en MTC, les billes incubées 30 min ont largement le temps de former des adhésions focales en lien avec un cytosquelette d'actine tendu. En prenant en compte les résultats obtenus en AFM, à savoir, la diminution du nombre de liens (divisé par 2) et l'augmentation du taux de dissociation à force nulle (multiplié par 1,6) de ces liens individuels (tableau 4), nous devrions trouver, pour la configuration zipper qui semble mieux caractériser la MTC, les évolutions suivantes :

$$K_{off}^0 = \frac{k_{off}^0}{N} \uparrow \text{ et } \sigma_c = \sigma_0 = \text{constante (en configuration zipper).}$$

Or cette évolution n'est observée expérimentalement que pour σ_c qui est effectivement constant (figure 46B et 47B) alors que K_{off}^0 devrait augmenter, ce qui n'est pas le cas expérimentalement (figure 46A et 47A). Les raisons de ce désaccord entre l'expérience et le modèle sont à rechercher dans le caractère probablement trop simplifié du modèle de lien. Les résultats MTC obtenus dans différents contextes biologiques (autres que CyaA) suggèrent que la réalité biologique correspond plutôt à un mixte entre la configuration parallèle et la configuration zipper pour l'interaction entre les microbilles et les cellules en MTC (Isabey et al. 2016 ; André Dias et al. 2018).

En revanche, l'AFM, et plus particulièrement la méthode MFS apparaît plus adaptée à la mise en évidence des effets de la toxine car celle-ci modifie l'adhérence en jouant sur ces différents paramètres que sont : (1) la baisse du niveau d'activation chimique vu par l'augmentation de k_{off}^0 des intégrines individuelles et (2) la baisse du clustering qui conduit à la diminution du nombre de liens N travaillant en association. Nous pouvons noter que cette caractérisation des effets de la toxine sur l'adhésion réalisée *via* la face apicale des cellules épithéliales est en accord avec les évolutions observées sur la face basale par immunomarquage. Cette cohérence des résultats à court et long termes suggère que la détection des événements d'adhérence très précoces (quelques secondes) induits par l'intoxication augure des événements à plus long terme.

5.3. Mécanismes physiopathologiques mis en jeu par CyaA

CyaAE5, mutant délété pour l'activité adénylate cyclase (aussi nommé CyaA-AC⁻), permet de bloquer l'augmentation de l'AMPc en empêchant la translocation de son domaine catalytique au travers de la membrane plasmique de la cellule cible. L'utilisation de ce mutant nous a permis de confirmer le rôle de l'AMPc (figures 33, 35, 37, 41 et 50) dans les cellules épithéliales alvéolaires exposées, confirmant l'importance de la translocation dans le

processus d'intoxication. Ce type de démarche est commun à plusieurs études, comme par exemple celle de Hasan qui utilise CyaA-AC⁻ pour démontrer l'absence d'effet sur la perméabilité cellulaire (Hasan et al. 2018). De façon complémentaire, une drogue agoniste de l'activité adénylate cyclase de CyaA appelée forskoline permettant l'augmentation du taux d'AMPc intracellulaire a été utilisée dans plusieurs études afin d'en comparer les effets induits à ceux de la toxine. Des effets similaires à ceux de CyaA ont été trouvés comme le changement de morphologie cellulaire et la restructuration du CSQ d'actine (Pelletier et al. 2005).

Les présents résultats sur l'effet de CyaA sont donc en accord avec ceux de la littérature. Ils nous permettent en plus de proposer une voie de signalisation mécano-chimique constituée par les petites protéines G dont l'expression serait fortement affectée par CyaA. Il est largement admis que l'organisation dynamique du cytosquelette d'actine et l'adhésion cellule-MEC sont contrôlées par les Rho GTPases (Allen et al. 1997; Kaverina et al. 2002; Singh et al. 2017). RhoA, Rac et cdc42 sont les trois membres de cette famille de protéines qui ont été le mieux caractérisés. RhoA est connue pour réguler la formation des fibres de stress et les points focaux d'adhésion alors que Rac1 est impliquée dans la formation du lamellipodium et la maturation des sites d'adhésion très dynamiques comme par exemple les sites d'adhésion initiaux et les lamellipodes (Allen et al. 1997; Hasan et al. 2018). Ainsi, à la plus faible concentration de la toxine (0,5 nM), l'intoxication par CyaA n'agirait pas tant sur la signalisation *via* RhoA, preuve en est que nous observons des fibres de stress sur les images d'immunomarquage. Une telle évolution ne s'oppose pas non plus au changement de rigidité cellulaire, qui non seulement ne diminue pas, mais augmente de façon significative. À l'inverse, l'intoxication par CyaA inhiberait l'expression de la signalisation *via* Rac1 en raison de l'augmentation d'AMPc comme le suggère la diminution du nombre et de la

résistance à la rupture des liens associés aboutissant à l'affaiblissement des structures d'adhésion nouvellement, voire plus tardivement formées (baisse du clustering).

En plus de l'utilisation de CyaAE5 comme contrôle négatif, nous avons testé d'autres substances actives sur la structure cellulaire telles que la CytoD et le manganèse (Mn^{2+}) comme contrôles des effets de CyaA sur le CSQ d'actine et sur la réversibilité partielle des phénomènes en contrebalançant l'altération du clustering des intégrines. Les données obtenues en MTC en présence de CytoD (figures 46 et 47) ont confirmé que la réponse cellulaire est bien spécifique du CSQ d'actine et donc que nous avons bien évalué le rôle d'un CSQ sous tension dans le cadre d'une exposition à CyaA (Wang et al. 1993; Wendling et al. 2000; Zhang and Moy 2003). Le manganèse (Mn^{2+}) est connu pour activer les intégrines et aider à la formation de clusters (Cluzel et al. 2005). Le fait d'ajouter du Mn^{2+} secondairement à une exposition à la toxine CyaA a permis de montrer que l'effet de CyaA sur la diminution de la taille des adhésions focales (et donc sur le clustering des intégrines) est partiellement réversible (figure 45). En parallèle au rôle de CyaA sur la signalisation chimique induite par l'élévation surphysiologique de l'AMPc, notre étude a permis de démontrer l'impact d'une exposition à CyaA sur les structures cellulaires mécanosensibles comme les sites d'adhésion, le cytosquelette et sa tension interne.

5.4. Les autres cibles potentielles de CyaA (perspectives)

Dans ce travail, nous nous sommes efforcés de tester différentes cibles cellulaires de CyaA. Considérant que les cellules épithéliales respiratoires constituent la première ligne de défense contre l'invasion, ces cellules tissulaires constituent l'essentiel de ce premier travail sur l'intoxication par CyaA. Les macrophages bronchiques et alvéolaires constituent un objectifs également de premier plan puisque ces cellules immunitaires sont essentielles à la protection du poumon contre les pathogènes. Ils pourraient faire l'objet d'une suite à ce travail surtout s'ils sont étudiés dans des conditions d'interaction avec d'autres cellules, c'est à dire, dans

des modèles de co-culture « macrophages/cellules épithéliales » comme nous avons commencé à le faire dans cette étude. Après inhalation, *Bp* s'installe au niveau de la trachée et/ou des bronches et peut atteindre les alvéoles par le biais des toxines mais également des adhésines (A. Moore et al. 2017). Les adhésines de *Bp* et notamment FHA nous intéressent tout particulièrement car nous avons à disposition au laboratoire des outils sophistiqués permettant d'évaluer l'adhésion tels que la méthode MFS.

L'évaluation des effets de CyaA sur les cellules épithéliales nasales humaines (CENH) a montré la diversité des réponses cellulaires en cas d'exposition à la toxine CyaA. Les cellules CENH, ensemencées en interface air-liquide et exposées à la toxine, n'ont pas montré de sensibilité à CyaA en ce qui concerne la migration et la réparation cellulaires. En revanche, l'augmentation de perméabilité de l'épithélium reconstitué a révélé une atteinte des jonctions latérales. Affaiblir les jonctions cellule-cellule tout en conservant une migration normale, peut sembler paradoxal. D'un côté la migration met en jeu un mécanisme collectif à l'échelle d'un groupe de cellules, le mouvement de chaque cellule étant corrélé au mouvement global de la population (Friedl and Gilmour 2009; Rørth 2009). D'un autre côté, les cellules migrantes (dans l'espace de la blessure *in vitro*) retrouvent un phénotype migratoire de cellule isolée (Féréol et al. 2006). Il n'est pas aisé de déterminer, dans notre cas, le rôle des interactions entre cellules au sein du groupe et notamment de savoir comment ces interactions affectent leur trajectoire. Pour déterminer s'il s'agit d'un processus collectif ou d'un processus seulement collaboratif (cellules indépendantes mais migrant de la même façon au même moment), il conviendrait de réaliser un immunomarquage des cadhérines impliquées dans les jonctions latérales après exposition à CyaA ainsi qu'une analyse du comportement de cellules isolées et en groupe d'un point de vue de la migration.

Quant au modèle de co-culture macrophages alvéolaires/cellules épithéliales alvéolaires, nous avons évalué l'effet de la toxine CyaA sur ce modèle afin de nous approcher d'une situation plus réaliste sur le plan biologique. Il s'avère qu'en présence de macrophages, les A549 migrent deux fois plus vite que les A549 seules en présence de la toxine CyaA. Nous avons supposé que ces résultats peuvent s'expliquer par le rôle attracteur vis-à-vis de la toxine et finalement protecteur des macrophages. La seule expérience de migration et de réparation réalisée dans notre travail ne permet pas d'affirmer notre hypothèse mais ouvre un nouveau champ d'exploration. Il serait donc judicieux de mener une étude d'évaluation, par exemple, de la fonction d'endocytose des macrophages en présence de CyaA. Il a en effet été montré que l'activité adénylate cyclase de CyaA conduit à l'inhibition de la fonction phagocytaire du macrophage (Kamanova et al. 2008).

L'activité hémolytique, bien que secondaire à l'activité adénylate cyclase, est également un mécanisme d'intoxication par CyaA clairement identifié dans la littérature. L'activité hémolytique permet de former de petits pores dans la membrane cellulaire spécifiquement dans celle des érythrocytes.

Bien que la translocation dite « directe » soit mise en avant dans de nombreuses publications (Bauche et al. 2006; Gordon et al. 1989; Guernonprez et al. 1999; Rogel et al. 1989; Vojtova-vodolanova et al. 2009), d'autres études émettent l'hypothèse d'une rapide internalisation par endocytose, bien qu'étant marginale, au niveau des radeaux lipidiques contenus dans la membrane plasmique de certaines cellules (Martin et al. 2011). L'outil AFM couplé à l'imagerie confocale, pourrait permettre de mieux connaître le mécanisme de translocation de CyaA dans les cellules non inflammatoires et ainsi permettre de mieux déterminer les modes de protection appropriés pour contrebalancer l'intoxication bactérienne au niveau cellulaire.

6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La problématique de cette thèse a été de s'interroger sur les effets fonctionnels que pourrait avoir la toxine CyaA sur les cellules épithéliales respiratoires. De nombreuses recherches ont été menées afin de déterminer le mécanisme de translocation de CyaA si particulier – qui peut être récepteur-dépendant dans les cellules de l'immunité pourvue du récepteur $\alpha_M\beta_2$ ou récepteur-indépendant dans les autres types cellulaires par translocation directe de son domaine catalytique (Bassinet et al. 2000; Ewanowich et al. 1989; Friedman et al. 1992; Ladant and Ullmann 1999; Lamberti et al. 2010) – tout en s'interrogeant sur les effets physiopathologiques de la toxine impliquant une augmentation supraphysiologique du taux d'AMPc intracellulaire (Karst et al. 2014; Ladant and Ullmann 1999; Wolff et al. 1980).

Nous nous sommes donc attachés à répondre à cette problématique au travers de différents tests biologiques (voir *Matériel et Méthodes*) et nous avons constaté que la toxine CyaA est à l'origine d'effets fonctionnels précoces et de longue durée (voir *Résultats et Discussion*) sur les phénomènes de migration et de réparation (diminution de la migration), la perméabilité cellulaire (affaiblissement de la perméabilité), le battement ciliaire (augmentation de la fréquence) mais également sur la viabilité cellulaire aux fortes concentrations de CyaA (à partir de 5 nM).

Fort de ce constat, nous avons poursuivi l'étude en s'inspirant de Donald Ingber qui prétend que l'on ne peut dissocier la physique de la biologie. En effet, il a été admis que le comportement cellulaire prend en compte les propriétés physiques des cellules et des tissus qui les entourent (contraintes mécaniques, force de cisaillement et de compression) comme étant de potentiels acteurs de la signalisation inter et intracellulaire au même titre que les signaux biochimiques (facteurs de croissance et régulation hormonale). D'ailleurs nos résultats vont dans ce sens : l'augmentation de l'AMPc intracellulaire (signalisation

chimique) induite par CyaA a entraîné une altération de la voie canonique de la mécanotransduction (liant le clustering des intégrines et la tension interne du CSQ d'actine) entraînant ici une diminution du clustering des intégrines, le remodelage du cytosquelette d'actine et une atteinte des propriétés mécaniques et d'adhésion (propriétés physiques).

Une autre question majeure de cette étude a été s'interroger sur les mécanismes communs à l'origine des perturbations à la fois physiologiques et mécaniques induites par l'exposition à la toxine. L'absence d'effet obtenu avec la forme inactive CyaAE5 montrent clairement que l'augmentation surphysiologique d'AMPc causée par la forme active de la toxine était responsable des effets cellulaires et moléculaires observés. Pour identifier plus précisément la voie de signalisation possiblement impliquée, nous nous sommes appuyés sur la littérature, ce qui nous a finalement permis de faire le lien entre l'AMPc et la protéine Rac1. Cette protéine, impliquée dans diverses voies de régulation d'évènements cellulaires, est connue pour participer à la réorganisation rapide du cytosquelette (lamellipodium par exemple) et à l'altération des jonctions cellule-cellule secondairement à l'augmentation d'AMPc (Allen et al. 1997; Hasan et al. 2018). Pour notre part, nous avons constaté une réorganisation du cytosquelette d'actine (*via* l'immunomarquage) et une augmentation de la perméabilité cellulaire laissant présager d'une atteinte des jonctions cellules-cellules qui coïncident l'une et l'autre avec les domaines où la protéine Rac1 joue un rôle régulateur.

De plus, les perturbations mécanobiologiques fines observées en AFM sur les cellules épithéliales alvéolaires, après exposition à la toxine CyaA, reflètent prioritairement une atteinte du cytosquelette cortical (voir *Discussion Générale*), résultats en accord avec nos études sur la structure du cytosquelette d'actine et les fonctions de migration/réparation cellulaires. La présente étude a donc permis de montrer les effets de CyaA dans leur spécificité, c'est à dire que la toxine CyaA cible quelques éléments particuliers de la structure cellulaire et moléculaire qui sont responsables des changements de perméabilité, d'adhésion

et de rigidité cellulaires), conduisant à de forts bouleversements de la mécanotransduction (diminution de la force de rupture et diminution du nombre de liens intégrine-MEC).

Pour aller plus loin, il serait donc judicieux d'évaluer expérimentalement l'effet de Rac1 au travers de son inhibition (ex. : SiRNA de Rac 1) et d'étudier d'autres molécules de sa voie de signalisation comme la protéine WAVE qui agit en amont de Rac1 et qui contribue à la formation de sites d'adhésion initiaux (Miki, Suetsugu, and Takenawa 1998) ou encore la protéine IQGAP qui est impliquée dans les adhésions cellule-cellule (Iden and Collard 2008).

Le projet FRM dans lequel s'inscrit cette thèse, en plus de la toxine CyaA évoquait également l'étude de l'adhésine FHA (voir *Études Bibliographiques*), protéine malheureusement indisponible pendant le temps de notre étude. L'adhésine FHA est, au même titre que la toxine CyaA, produite par *Bp*. Il a été montré que *Bp* sécrète dans le même temps FHA et CyaA ainsi que des lipides et le lipopolysaccharide (LPS). Il est donc justifié de se demander dans quelle mesure CyaA interagit avec FHA et si FHA peut influencer sur la réponse cellulaire et particulièrement sur les phénomènes de mécanotransduction. Notons que FHA, en collaboration avec la toxine pertussique PT est déjà connue pour jouer un rôle sur le battement ciliaire.

Enfin, il serait intéressant de discuter de la portée des résultats obtenus sur CyaA en relation avec d'autres toxines produites par d'autres bactéries mais dotées des mêmes caractéristiques que la toxine CyaA. CyaA appartient à une catégorie de toxines qui se caractérise par son mode d'action, lequel a été largement décrit dans la partie *Études Bibliographiques*. C'est en effet sa capacité à induire la translocation d'un fragment catalytique dans le cytoplasme de la cellule cible qui caractérise CyaA. Dans cette même catégorie, nous trouvons les toxines diphtériques et tétaniques (respectivement l'exotoxine TD de *Corynebacterium diphtheriae* et la toxine C3 de *Clostridium botulinum*). Notons également que certaines toxines sont capables de détourner certaines enzymes (comme la toxine TD), certains composants du

cytosquelette (comme la toxine CyaA) ou en encore les systèmes d'adressage des vésicules (comme la toxine C3) à des fins de colonisation, d'invasion de la cellule/du tissu cible ou de leur propre activation (Cossart 1997; Finlay and Cossart 1997). Ces caractéristiques font d'ailleurs de ces toxines des réactifs de choix dans de nombreuses études de biologie cellulaire.

- Abhilash, A. S., Brendon M. Baker, Britta Trappmann, Christopher S. Chen, and Vivek B. Shenoy. 2014. "Remodeling of Fibrous Extracellular Matrices by Contractile Cells : Predictions from Discrete Fiber Network Simulations." *Biophysj* 107:1829–40. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2014.08.029>).
- Aepfelbacher, M., M. Essler, E. Huber, M. Sugai, and Peter C. Weber. 1997. "Evidence That Rho GTPases Conrol Cytoskeletal Rearrangements in Migrating Endothelial Cells." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17:1623–29.
- Aktories, Klaus, Alexander E. Lang, Carsten Schwan, and Hans G. Mannherz. 2011a. "Actin as Target for Modification by Bacterial Protein Toxins." *FEBS Journal* 278:4526–43.
- Aktories, Klaus, Alexander E. Lang, Carsten Schwan, and Hans G. Mannherz. 2011b. "Actin as Target for Modification by Bacterial Protein Toxins." *FEBS Journal* 278:4526–43.
- Aktories, Klaus, Carsten Schwan, Panagiotis Papatheodorou, and Alexander E. Lang. 2012. "Bidirectional Attack on the Actin Cytoskeleton . Bacterial Protein Toxins Causing Polymerization or Depolymerization of Actin." *Toxicon* 60:572–81. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.04.338>).
- del Alamo, Juan C., Gerard N. Norwich, Yi-shuan Julie Li, Juan C. Lasheras, and Shu Chien. 2008. "Anisotropic Rheology and Directional Mechanotransduction in Vascular Endothelial Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(40):15411–16.
- Allen, William E., Gareth E. Jones, Jeffrey W. Pollard, and Anne J. Ridley. 1997. "Rho , Rac and Cdc42 Regulate Actin Organization and Cell Adhesion in Macrophages." *Journal of Cell Science* 110:707–20.
- Andrade, Bruno Gabriel N. et al. 2014. "Complete Genome Sequence of a Clinical Bordetella Pertussis Isolate from Brazil." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 109(7):972–74.
- André Dias, Sofia. 2017. "Réponse Des Cellules Épithéliales Pulmonaires À L'exposition Au Perfluorocarbone Dans Le Contexte Des Applications de La Ventilation Liquide Totale."
- André Dias, Sofia et al. 2018. "Perfluorocarbon Induces Alveolar Epithelial Cell Response through Structural and Mechanical Remodeling." *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*. Retrieved (<https://doi.org/10.1007/s10237-018-1005-z>).
- Andreasen, Charlotte, Daniel A. Powell, and Nicholas H. Carbonetti. 2009. "Pertussis Toxin Stimulates IL-17 Production in Response to Bordetella Pertussis Infection in Mice." *PloS One* 4(9):1–11.
- Angely, Christelle et al. 2017. "Exposure to Bordetella Pertussis Adenylate Cyclase Toxin Affects Integrin-Mediated Adhesion and Mechanics in Alveolar Epithelial Cells." *Biology of the Cell* 109(8):1–19.
- Anselme, Karine, Nayana Tusamda Wakhloo, Pablo Rougerie, and Laurent Pieuchot. 2018. "Role of the Nucleus as a Sensor of Cell Environment Topography." *Avanced Healthcare Materials* 1701154:1–17.
- Aplin, AE, AK Howe, and RL Juliano. 1999. "Cell Adhesion Molecules, Signal Transduction and Cell Growth." *Current Opinion in Cell Biology* 11(6):737–44.
- Arico, Beatrice, Sandra Nuti, Vincenzo Scarlato, and Rino Rappuoli. 1993. "Adhesion of Bordetella Pertussis to Eukaryotic Cells Requires a Time-Dependent Export and Maturation of Filamentous Hemagglutinin." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:9204–8.

- Arnadottir, Johanna and Martin Chalfie. 2010. "Eukaryotic Mechanosensitive Channels." *Annual Review of Biophysics* 39:111–37.
- Balaban, Nathalie Q. et al. 2001. "Force and Focal Adhesion Assembly : A Close Relationship Studied Using Elastic Micropatterned Substrates." *Nature Cell Biology* 3:466–73.
- Balland, M. et al. 2006. "Power Laws in Microrheology Experiments on Living Cells: Comparative Analysis and Modeling." *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics* 74(2 Pt 1):1–8.
- Barbieri, Joseph T., Matthew J. Riese, and Klaus Aktories. 2002. "Bacterial Toxins That Modify the Actin Cytoskeleton." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 18:315–44.
- Bassinat, Laurence et al. 2000. "Role of Adhesins and Toxins in Invasion of Human Tracheal Epithelial Cells by Bordetella Pertussis." *Infection and Immunity* 68(4):1934–41.
- Bauche, Cécile et al. 2006. "Structural and Functional Characterization of an Essential RTX Subdomain of Bordetella Pertussis Adenylate Cyclase Toxin." *The Journal of Biological Chemistry* 281(25):16914–26.
- Bell, G. 1978. "Models for the Specific Adhesion of Cells to Cells." *Science* 200(4342):618–27. Retrieved February 6, 2015 (<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.347575>).
- Benanti, Erin L., Catherine M. Nguyen, and Matthew D. Welch. 2015. "Virulent Burkholderia Species Mimic Host Actin Polymerases to Drive Actin-Based Motility." *Cell* 161(2):348–60.
- Bhattacharya, Rupa et al. 2014. "Effect of Bacteria on the Wound Healing Behavior of Oral Epithelial Cells." *PloS One* 9(2):1–10.
- Bissell, Mina J., H. Glenn Hall, and Gordon Parry. 1982. "How Does the Extracellular Matrix Direct Gene Expression ?" *Journal of Theoretical Biology* 99:31–68.
- Bonakdar, Navid et al. 2016. "Mechanical Plasticity of Cells." *Nature Materials* 15:1090–95.
- Bottier, Mathieu, Sylvain Blanchon, et al. 2017. "A New Index for Characterizing Micro-Bead Motion in a Flow Induced by Ciliary Beating : Part I." *Plos Computational Biology* 13(7):1–19.
- Bottier, Mathieu, Marta Pena Fernandez, et al. 2017. "A New Index for Characterizing Micro-Bead Motion in a Flow Induced by Ciliary Beating : Part II." *Plos Computational Biology* 13(7):1–21.
- Brennan, Michael J. et al. 1988. "Identification of a 69-Kilodalton Nonfimbrial Protein As Agglutinin of Bordetella Pertussis." *Infection and Immunity* 56(12):3189–95.
- Brown, R. A., R. Prajapati, D. A. M. C. Grouther, and I. V Yannas. 1998. "Tensional Homeostasis in Dermal Fibroblasts : Mechanical Responses to Mechanical Loading in Three-Dimensional Substrates." *Journal of Cellular Physiology* 175:323–32.
- Bruinsma, Robijn. 2005. "Theory of Force Regulation by Nascent Adhesion Sites." *Biophysical Journal* 89(1):87–94. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.104.048280>).
- Butt, HJ and Manfred Jaschke. 1995. "Calculation of Thermal Noise in Atomic Force Microscopy." *Nanotechnology* 6:1–7. Retrieved July 23, 2015 (<http://iopscience.iop.org/0957-4484/6/1/001>).
- Caille, N., O. Thoumine, Y. Tardy, and JJ Meister. 2002. "Contribution of the Nucleus to the Mechanical Properties of Endothelial Cells." *Journal of Biomechanics* 35(2):177–87.

- Caluch, Adam. 2013. "Rôle de La Tension Interne Du Cytosquelette et de La Mécanotransduction Dans Le Contrôle de La Perméabilité de L'endothélium Vasculaire Pulmonaire Agressé."
- Carbonetti, Nicholas H., Galina V Artamonova, Charlotte Andreasen, and Nicholas Bushar. 2005. "Pertussis Toxin and Adenylate Cyclase Toxin Provide a One-Two Punch for Establishment of Bordetella Pertussis Infection of the Respiratory Tract." *Infection and Immunity* 73(5):2698–2703.
- Carlier, Marie-france. 1991. "Actin: Protein Structure and Filament Dynamics." *The Journal of Biological Chemistry* 266(1):1–4.
- Cau, Julien, Sandrine Faure, Michel Comps, Claude Delsert, and Nathalie Morin. 2001. "A Novel p21-Activated Kinase Binds the Actin and Microtubule Networks and Induces Microtubule Stabilization." *Journal of Cell Biology* 155(6):1029–42.
- Chen, Jianfeng, Azucena Salas, and Timothy A. Springer. 2003. "Bistable Regulation of Integrin Adhesiveness by a Bipolar Metal Ion Cluster." *Nature Structural Biology* 10(12):995–1001.
- Chen, Junjian et al. 2016. "Efficient Extravasation of Tumor-Repopulating Cells Depends on Cell Deformability." *Scientific Reports* 6:19304. Retrieved (<http://www.nature.com/articles/srep19304>).
- Choquet, D., D. P. Felsenfeld, and M. P. Sheetz. 1997. "Extracellular Matrix Rigidity Causes Strengthening of Integrin-Cytoskeleton Linkages." *Cell* 88(1):39–48. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9019403>).
- Chowdhury, Farhan et al. 2008. "Is Cell Rheology Governed by Nonequilibrium-to-Equilibrium Transition of Noncovalent Bonds ?" *Biophysical Journal* 95:5719–27.
- Chowdhury, Farhan et al. 2010. "Cell Material Property Dictates Stress-Induced Spreading and Differentiation in Embryonic Stem Cell." *Nature Materials* 9(1):82–88.
- Cluzel, Caroline et al. 2005. "The Mechanisms and Dynamics of $\alpha\beta3$ Integrin Clustering in Living Cells." *Journal of Cell Biology* 171(2):383–92.
- Colombi, Débora, Denise S. P. Q. Horton, Leonor Maria S. Oliveira, Maria Aparecida Sakauchi, and Paulo L. Ho. 2004. "Antibodies Produced against a Fragment of Filamentous Haemagglutinin (FHA) of Bordetella Pertussis Are Able to Inhibit Hemagglutination Induced by the Whole Adhesin." *FEMS Microbiology Letters* 240:41–47.
- Coraux, Christelle, Rodolphe Hajj, Pierre Lesimple, and E. Pluchelle. 2005. "Réparation et Régénération de L'épithélium Respiratoire." *Médecine Sciences* 21:1063–69.
- Cossart, P. 1997. "Subversion of the Mammalian Cell Cytoskeleton by Invasive Bacteria." *Journal of Clinical Investigation* 99:2307–11.
- Critchley, D. R. 2004. "Cytoskeletal Proteins Talin and Vinculin in Integrin-Mediated Adhesion." *Biochemical Society Transactions* 32(5):831–36.
- Discher, DE, Paul Janmey, and Yu-li Wang. 2005. "Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate." *Science* 310(NOVEMBER):1139–43. Retrieved May 28, 2013 (<http://www.sciencemag.org/content/310/5751/1139.short>).
- Discher, Dennis E., David J. Mooney, and Peter W. Zandstra. 2009. "Growth Factors, Matrices, and Forces Combine and Control Stem Cells." *Science* 324(5935):1673–77.

- DuFort, Christopher, Matthew J. Paszek, and Valerie M. Weaver. 2011. "Balancing Forces: Architectural Control of Mechanotransduction." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12(5):308–19.
- Eby, Joshua C. et al. 2010. "Selective Translocation of the Bordetella Pertussis Adenylate Cyclase Toxin across the Basolateral Membranes of Polarized Epithelial Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 285(14):10662–70. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2856274&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Eby, Joshua C. et al. 2013. "Quantification of the Adenylate Cyclase Toxin of Bordetella Pertussis in Vitro and during Respiratory Infection." *Infection and Immunity* 81(5):1390–98.
- El-azami-el-idrissi, Mohammed et al. 2003. "Interaction of Bordetella Pertussis Adenylate Cyclase with." 278(40):38514–21.
- Engler, Adam J., Shamik Sen, H. Lee Sweeney, and Dennis E. Discher. 2006. "Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification." *Cell* 126:677–89.
- Erdmann, T., S. Pierrat, P. Nassoy, and U. Schwarz. 2008. "Dynamic Force Spectroscopy on Multiple Bonds: Experiments and Model." *EPL (Europhysics Letters)* 81:48001. Retrieved (<papers://93f2eea4-15a4-4ebf-aabd-9521e30fc280/Paper/p1661>).
- Erickson, Harold P. and E. Timothy O'Brien. 1992. "Microtubule Dynamic Instability and GTP Hydrolysis." *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 21:145–66.
- Euckler, Tyson P. and Michael E. Konkel. 2012. "The Cooperative Action of Bacterial Fibronectin-Binding Proteins and Secreted Proteins Promote Maximal Campylobacter Jejuni Invasion of Host Cells by Stimulating Membrane Ruffling." *Cellular Microbiology* 14(2):226–38.
- Evans, E. 1998. "Energy Landscapes of Biomolecular Adhesion and Receptor Anchoring at Interfaces Explored with Dynamic Force Spectroscopy." *Faraday Discussions* (111):1–16.
- Evans, E. A. and D. A. Calderwood. 2007. "Forces and Bond Dynamics in Cell Adhesion." *Science* 316(May):1148–54. Retrieved (<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1137592%5Cnpapers3://publication/doi/10.1126/science.1137592>).
- Evans, EA. 1998. "Energy Landscapes of Biomolecular Adhesion and Receptor Anchoring at Interfaces Explored with Dynamic Force Spectroscopy." *Faraday Discussions* 111:1–16.
- Evans, Evan. 2001. "Probing the Relation Between Force—Lifetime—and Chemistry in Single Molecular Bonds." *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 30(1):105–28. Retrieved (<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biophys.30.1.105>).
- Evans, Evan and Koji Kinoshita. 2007. "Using Force to Probe Single-Molecule Receptor-Cytoskeletal Anchoring beneath the Surface of a Living Cell." *Methods in Cell Biology* 83(7):373–96. Retrieved May 28, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17613317>).
- Evans, Evan and Ken Ritchie. 1997. "Dynamic Strength of Molecular Adhesion Bonds." *Biophysical Journal* 72(4):1541–55. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1184350&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Ewanowich, Carol A., Richard K. Sherburne, S. F. P. Man, and Mark S. Peppler. 1989. "Bordetella

- Parapertussis Invasion of HeLa 229 Cells and Human Respiratory Epithelial Cells in Primary Culture." *Infection and Immunity* 57(4):1240–47.
- Fabry, B. et al. 2001. "Scaling the Microrheology of Living Cells." *Physical Review Letter* 87(14):1–7.
- Féréol, S. et al. 2006. "Sensitivity of Alveolar Macrophages to Substrate Mechanical and Adhesive Properties." *Cell Motility and the Cytoskeleton* 63:321–40.
- Féréol, Sophie. 2005. "Caractérisation et Modélisation de La Sensibilité Du Macrophage Alvéolaire Aux Propriétés Mécaniques et Adhésives Du Substrat."
- Féréol, Sophie et al. 2006. "Sensitivity of Alveolar Macrophages to Substrate Mechanical and Adhesive Properties." *Cell Motility and the Cytoskeleton* 63(6):321–40. Retrieved August 28, 2013 (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cm.20130/abstract>).
- Féréol, Sophie et al. 2009. "Prestress and Adhesion Site Dynamics Control Cell Sensitivity to Extracellular Stiffness." *Biophysical Journal* 96(5):2009–22. Retrieved May 7, 2013 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2717368&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Féréol, Sophie, Redouane Fodil, Gabriel Pelle, Bruno Louis, and Daniel Isabey. 2008. "Cell Mechanics of Alveolar Epithelial Cells (AECs) and Macrophages (AMs)." *Respiratory Physiology & Neurobiology* 163(1–3):3–16. Retrieved May 7, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18565804>).
- Finlay, BB and P. Cossart. 1997. "Exploitation of Mammalian Host Cell Functions by Bacterial Pathogens." *Science* 276:718–25.
- Foster, KA, CG Oster, MM Mayer, Avery MJ, and KI Audus. 1998. "Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism." *Experimental Cell Research* 243(359366):1–13.
- Friedl, Peter and Darren Gilmour. 2009. "Collective Cell Migration in Morphogenesis, Regeneration and Cancer." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10:445–57. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nrm2720>).
- Friedman, Richard L., Kathryn Nordensson, Linda Wilson, Emmanuel T. Akporiaye, and David E. Yocum. 1992. "Uptake and Intracellular Survival of Bordetella Pertussis in Human Macrophages." *Infection and Immunity* 60(11):4578–85.
- Fung, Yuan-cheng. 1981. *Biomechanics : Mechanical Properties of Living Tissues*.
- Garat, Chrystelle, Farrah Kheradmand, Kurt H. Albertine, Hans G. Folkesson, and Michael A. Matthay. 1996. "Soluble Alveolar and Insoluble Fibronectin Epithelial Wound Healing Increases in Vitro." *American Journal of Physiology* 271(5 Pt 1):844–53.
- Geiger, Benjamin and Alexander Bershadsky. 2001. "Assembly and Mechanosensory Function of Focal Contacts." *Current Opinion in Cell Biology* 13:584–92.
- Geiger, Benjamin, Joachim P. Spatz, and Alexander D. Bershadsky. 2009. "Environmental Sensing through Focal Adhesions." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10:21–33.
- Geuijen, Cecile A. W. et al. 1997. "Role of the Bordetella Pertussis Minor Fimbrial Subunit , FimD , in Colonization of the Mouse Respiratory Tract." *Infection and Immunity* 65(10):4222–28.
- Geuijen, Cecile A. W. and R. O. B. J. L. Willems. 1996. "The Major Fimbrial Subunit of Bordetella

- Pertussis Binds to Sulfated Sugars." *Infection and Immunity* 64(7):2657–65.
- Golji, Javad and Mohammad R. K. Mofrad. 2010. "A Molecular Dynamics Investigation of Vinculin Activation." *Biophysical Journal* 99(4):1073–81. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2010.05.024>).
- Goodwin, Matina St Mary and Alison Ann Weiss. 1990. "Adenylate Cyclase Toxin Is Critical for Colonization and Pertussis Toxin Is Critical for Lethal Infection by Bordetella Pertussis in Infant Mice." *Infection and Immunity* 58(10):3445–47.
- Gordon, V. M. et al. 1989. "Adenylate Cyclase Toxins from Bacillus Anthracis and Bordetella Pertussis. Different Processes for Interaction with and Entry into Target Cells." *Journal of Biological Chemistry* 264(25):14792–96.
- Guermonprez, P. et al. 2001. "The Adenylate Cyclase Toxin of Bordetella Pertussis Binds to Target Cells via the alphaMbeta2 Integrin (Cd11b/Cd18)." *Journal of Experimental Medicine* 193(9):1035–44. Retrieved (<http://jem.rupress.org/content/193/9/1035>).
- Guermonprez, Pierre, Daniel Ladant, Gouzel Karimova, Agnes Ullmann, and Claude Leclerc. 1999. "Direct Delivery of the Bordetella Pertussis Adenylate Cyclase Toxin to the MHC Class I Antigen Presentation Pathway." *The Journal of Immunology* 162:1910–16.
- Guiso, Nicole. 2017. "Bordetella Adenylate Cyclase-Hemolysin Toxins." *Toxins* 9(277):1–13.
- Harris, HE, JR Bamburg, and AG Weeds. 1980. "Actin Filament Disassembly in Blood Plasma." *FEBS Letters* 121(1):175–77.
- Hasan, Shakir et al. 2018. "Bordetella Pertussis Adenylate Cyclase Toxin Disrupts Functional Integrity of Bronchial Epithelial Layers." *Infection and Immunity* 86(3):1–19.
- Hazenbos, WL, CA Geuijen, BM van den Berg, Frits R. Mooi, and R. van Furth. 1995. "Bordetella Pertussis Fimbriae Bind to Human Monocytes via the Minor Fimbrial Subunit FimD." *The Journal of Infectious Diseases* 17(4):924–29.
- Heidemann, SR and RE Buxbaum. 1990. "Tension as a Regulator and Integrator of Axonal Growth." *Cell Motility and the Cytoskeleton* 17(1):6–10.
- Herrmann, Harald and Ueli Aebi. 2000. "Intermediate Filaments and Their Associates : Multi-Talented Structural Elements Specifying Cytoarchitecture and Cytodynamics." *Current Opinion in Cell Biology* 12:79–90.
- Hewlett, Erik L. et al. 2014. "Pertussis Pathogenesis — What We Know and What We Don ' T Know." *Journal of Infectious Diseases* 209(7):982–85.
- Hewlett, Erik L., Gina M. Donato, and Mary C. Gray. 2006. "Macrophage Cytotoxicity Produced by Adenylate Cyclase Toxin from Bordetella Pertussis : More than Just Making Cyclic AMP !" *Molecular Microbiology* 59(2):447–59.
- Hill, David B. et al. 2010. "Force Generation and Dynamics of Individual Cilia under External Loading." *Biophysj* 98:57–66. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2009.09.048>).
- Hoffman, Brenton D., Carsten Grashoff, and Martin A. Schwartz. 2011. "Dynamic Molecular Processes Mediate Cellular Mechanotransduction." *Nature* 475:316–23.
- Howe, AK. 2004. "Regulation of Actin-Based Cell Migration by cAMP/PKA." *Biochimica et Biophysica Acta* 1692(2–3):159–74.

- Hu, Shaohua et al. 2004. "Mechanical Anisotropy of Adherent Cells Probed by a Three-Dimensional Magnetic Twisting Device." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 287:C1184–91. Retrieved May 13, 2013 (<http://ajpcell.physiology.org/content/287/5/C1184.short>).
- Huang, Sui and Donald E. Ingber. 1999. "The Structural and Mechanical Complexity of Cell-Growth Control." *Nature Cell Biol.* 1:131–38.
- Humphries, Jonathan D., Adam Byron, and Martin J. Humphries. 2006. "Integrin Ligands at a Glance." *Journal of Cell Science* 119(19):3901–3.
- Hynes, Richard O. 2002. "Integrins : Bidirectional , Allosteric Signaling Machines." *Cell* 110:673–87.
- Hynes, Richard O. 2002. "Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines." *Cell*.
- Hytönen, Vesa P. and Bernhard Wehrle-Haller. 2016. "Mechanosensing in Cell – Matrix Adhesions – Converting Tension into Chemical Signals." *Experimental Cell Research* 343(1):35–41. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.027>).
- Iden, S. and JG Collard. 2008. "Crosstalk between Small GTPases and Polarity Proteins in Cell Polarization." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9:846–59.
- Ingber, D. E. 1997. "Tensegrity: The Architectural Basis of Cellular Mechanotransduction." *Annual Review of Physiology* 59:575–99. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9074778>).
- Ingber, DE. 2004. "The Mechanochemical Basis of Cell and Tissue Regulation." *Mechanics and Chemistry of Biosystems* 1(1):53–68.
- Ingber, DE, Ning Wang, and Dimitrije Stamenović. 2014. "Tensegrity, Cellular Biophysics, and the Mechanics of Living Systems." *Report on Progress in Physics* 77(4):1–42.
- Ingber, Donald E., Joseph A. Madri, and James D. Jamieson. 1981. "Role of Basal Malina in Neoplastic Disorganisation of Tissue Architecture." *Medical Sciences* 78(6):3901–5.
- Isabey, D. et al. 2013. "Force Distribution on Multiple Bonds Controls the Kinetics of Adhesion in Stretched Cells." *Journal of Biomechanics* 46(2):307–13.
- Isabey, Daniel et al. 2016. "Multiscale Evaluation of Cellular Adhesion Alteration and Cytoskeleton Remodeling by Magnetic Bead Twisting." *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 15(4):947–63.
- Isabey, Daniel, Christelle Angely, Adam Caluch, Bruno Louis, and Gabriel Pelle. 2018. *Magnetic Twisting Cytometry*.
- Isberg, R. 1991. "Discrimination Between Intracellular Uptake and Surface Adhesion of Bacterial Pathogens." *Science* 252:934–39.
- Jacob-Dubuisson, F., Camille Loch, and R. Antoine. 2001. "Two-Partner Secretion in Gram-Negative Bacteria : A Thrifty , Specific Pathway for Large Virulence Proteins." *Molecular Microbiology* 40(2):306–13.
- Jain, Rakesh K. 2005. "Normalization of Tumor Vasculature : An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy." *Science* 307:58–63.
- Jiang, G., G. Giannone, DR Critchley, E. Fukumoto, and MP Sheetz. 2003. "Two-Piconewton Slip Bond between Fibronectin and the Cytoskeleton Depends on Talin." *Nature* 424:334–37.

- Jones, Nick. 2001. "The Nose and Paranasal Sinuses Physiology and Anatomy." *Advanced Drug Delivery Reviews* 51:5–19.
- Kamanova, Jana et al. 2008. "Adenylate Cyclase Toxin Subverts Phagocyte Function by RhoA Inhibition and Unproductive Ruffling." 181:5587–97.
- Karim, MA. 1998. "In Vivo Role of the Extracellular Matrix during Vascular Repair." *Basic Research in Cardiology* 93:50–53.
- Karst, Johanna C. et al. 2014. "Calcium, Acylation, and Molecular Confinement Favor Folding of Bordetella Pertussis Adenylate Cyclase CyaA Toxin." *Journal of Biological Chemistry* 289(44):30702–16.
- Kaverina, Irina, Olga Krylyshkina, and Victor J. Small. 2002. "Regulation of Substrate Adhesion Dynamics during Cell Motility." *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 34:746–61.
- Keck, T., R. Leiacker, A. Heinrich, S. Kuhnemann, and G. Rettinger. 2000. "Humidity and Temperature Profile in the Nasal Cavity." *Rhinology* 38(4):167–71.
- Khelef, Nadia, Claude-marie Bachelet, B.Boris Vargaftig, and Nicole Guisol. 1994. "Characterization of Murine Lung Inflammation after Infection with Parental Bordetella Pertussis and Mutants Deficient in Adhesins or Toxins." *Infection and Immunity* 62(7):2893–2900.
- Khelef, Nadia, Hiroshi Sakamoto, and Nicole Guiso. 1992. "Both Adenylate Cyclase and Hemolytic Activities Are Required by Bordetella Pertussis to Initiate Infection." *Microbial Pathogenesis* 12(3):227–35.
- Kirschner, Marc W., Robley C. Williamst, Murray Weingarten, and John C. Gerhardt. 1974. "Microtubules from Mammalian Brain : Some Properties of Their Depolymerization Products and a Proposed Mechanism of Assembly and Disassembly." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 71(4):1159–63.
- Kloos, WE, N. Mohapatra, WJ Dobrogosz, W. Ezzell, and CR Manclark. 1981. "Desoxyribonucleotide Sequence Relationships among Bordetella Species." *International Journal of Systematic Bacteriology* 31(2):173–76.
- Kubow, Kristopher E. et al. 2015. "Mechanical Forces Regulate the Interactions of Fibronectin and Collagen I in Extracellular Matrix." *Nature Communications* 6:1–11. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms9026>).
- Kühn, S. and Hans G. Mannherz. 2017. "Actin: Structure, Function, Dynamics, and Interactions with Bacterial Toxins." *Current Topics in Microbiology and Immunology* 399:1–34.
- Kumar, Abhishek et al. 2016. "Talin Tension Sensor Reveals Novel Features of Focal Adhesion Force Transmission and Mechanosensitivity." *Journal of Cell Biology* 213(3):371–83.
- Kuznetsova, Tatyana G., Maria N. Starodubtseva, Nicolai I. Yegorenkov, Sergey a Chizhik, and Renat I. Zhdanov. 2007. "Atomic Force Microscopy Probing of Cell Elasticity." *Micron* 38:824–33. Retrieved February 28, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17709250>).
- Ladant, Daniel and Agnes Ullmann. 1999. "Bordetella Pertussis Adenylate Cyclase : A Toxin with Multiple Talents." (99):172–76.
- Ladoux, Benoit and A. Nicolas. 2012. "Physically Based Principles of Cell Adhesion

- Mechanosensitivity in Tissues." *Report on Progress in Physics* 75(11):116601.
- Lamberti, Yanina A., Jimena Alvarez Hayes, Maria L. Perez Vidakovics, Eric T. Harvill, and Maria Eugenia Rodriguez. 2010. "Intracellular Trafficking of Bordetella Pertussis in Human Macrophages." *Infection and Immunity* 78(3):907–13.
- Lapidot, Tsvee et al. 1994. "A Cell Initiating Human Acute Myeloid Leukaemia after Transplantation into SCID Mice." *Nature* 397:645–48.
- Laukaitis, Christina M., Donna J. Webb, Karen Donais, and Alan F. Horwitz. 2001. "Differential Dynamics of alpha5 Integrin, Paxillin, and Alpha-Actinin during Formation and Disassembly of Adhesions in Migrating Cells." *Journal of Cell Biology* 153(7):1427–40.
- Laurent, V. et al. 2002. "Assessment of Mechanical Properties of Adherent Living Cells by Bead Micromanipulation: Comparison of Magnetic Twisting Cytometry versus Optical Tweezers." *Journal of Biomechanical Engineering* 124:408–21.
- Laurent, V. et al. 2003. "Partitioning of Cortical and Deep Cytoskeleton Responses from Transient Magnetic Bead Twisting." *Annals of Biomedical Engineering* 31(10):1263–78.
- Laurent, Valérie M. et al. 2003. "Partitioning of Cortical and Deep Cytoskeleton Responses from Transient Magnetic Bead Twisting." *Annals of Biomedical Engineering* 31(10):1263–78. Retrieved August 19, 2013 (<http://link.springer.com/10.1114/1.1616932>).
- Lee, Seung E., Roger D. Kamm, and Mohammad R. Mofrad. 2007. "Force-Induced Activation of Talin and Its Possible Role in Focal Adhesion Mechanotransduction." *Journal of Biomechanics* 40(9):2096–2106.
- Lele, Tanmay P. et al. 2007. "Tools to Study Cell Mechanics and Mechanotransduction." *Methods in Cell Biology* 83:443–72. Retrieved May 24, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17613320>).
- Li, Feiya, Sambra D. Redick, Harold P. Erickson, and Vincent T. Moy. 2003. "Force Measurements of the alpha5beta1 Integrin-Fibronectin Interaction." *Biophysical Journal* 84(2 Pt 1):1252–62. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1302701&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Li, Li, Qian Zhao, and Wei Kong. 2017. "Extracellular Matrix Remodeling and Cardiac Fibrosis." *Matrix Biology* 1411:1–17.
- Liddington, R. C. and M. H. Ginsberg. 2002. "Integrin Activation Takes Shape." *Journal of Cell Biology* 158(5):833–39.
- Loeffelholz, MJ and GN Sanden. 2007. "Bordetella." Pp. 803–14 in *Manual of clinical microbiology, 9th edition*.
- Malik, Aijaz Ahmad, Chompounoot Imtong, Nitat Sookrung, and Gerd Katzenmeier. 2016. "Structural Characterization of Humanized Nanobodies with Neutralizing Activity against the Bordetella Pertussis CyaA-Hemolysin : Implications." *Toxins* 8(99):1–13.
- Martin, C., Kepa B. Uribe, Geraxane Gomez-Bilbao, and Helena Ostolaza. 2011. "Adenylate Cyclase Toxin Promotes Internalisation of Integrins and Raft Components and Decreases Macrophage Adhesion Capacity." *PloS One* 6(2):1–10.

- Martín, César, Asier Etxaniz, Kepa B. Uribe, Aitor Etxebarria, and David González-bullón. 2015. "Adenylate Cyclase Toxin Promotes Bacterial Internalisation into Non Phagocytic Cells." *Scientific Reports* 5:1–16. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/srep13774>).
- Michael, Kristin E., David W. Dumbauld, Kellie L. Burns, Steven K. Hanks, and André J. Garcia. 2009. "Focal Adhesion Kinase Modulates Cell Adhesion Strengthening via Integrin Activation." *Molecular Biology of the Cell* 20:2508–19.
- Miki, H., S. Suetsugu, and T. Takenawa. 1998. "WAVE, a Novel WASP-Family Protein Involved in Actin Reorganization Induced by Rac." *EMBO Journal* 17:6932–41.
- Mitchison, T. and M. Kirschner. 1984. "Dynamic Instability of Microtubule Growth." *Nature* 312(5991):237–42.
- Moeendarbary, Emad and Andrew R. Harris. 2014. "Cell Mechanics : Principles , Practices , and Prospects." *Cell Mechanics* 6:371–88.
- Moore, Abigail et al. 2017. "Clinical Characteristics of Pertussis-Associated Cough in Adults and Children." *Chest* 152(2):353–67.
- Moore, Simon W., Pere Roca-cusachs, and Michael P. Sheetz. 2017. "Stretchy Proteins on Stretchy Substrates: The Important Element of Integrin-Mediated Rigidity Sensing." *Developmental Cell* 19(2):1–30.
- Mould, A. Paul et al. 2002. "Integrin Activation Involves a Conformational Change in the $\alpha 1$ Helix of the β Subunit A-Domain." *The Journal of Biological Chemistry* 277(22):19800–805.
- Na, Sungsoo et al. 2008. "Rapid Signal Transduction in Living Cells Is a Unique Feature of Mechanotransduction." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(18):6626–31. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2373315&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Nguyen, Ngoc Minh et al. 2017. "Characterization of Cellular Adhesion Reinforcement by Multiple Bond Force Spectroscopy in Alveolar Epithelial Cells." *Biology of the Cell* 109:255–72.
- Novak, J. et al. 2017. "Phosphoproteomics of cAMP Signaling of Bordetella Adenylate Cyclase Toxin in Mouse Dendritic Cells." *Scientific Reports* 7(16298):1–14.
- O'Brien, ET, Jeremy Cribb, D. Marshburn, RM Taylor II, and Richard Superfine. 2008. "Magnetic Manipulation for Force Measurement in Cell Biology." Pp. 433–50 in *Biophysical Tools for Biologists: In vivo techniques*.
- Odorico, Michael et al. 2007. "Energy Landscape of Chelated Uranyl: Antibody Interactions by Dynamic Force Spectroscopy." *Biophysical Journal* 93(2):645–54.
- Ohayon, J. et al. 2005. "Analysis of Nonlinear Responses of Adherent Epithelial Cells Probed by Magnetuc Bead Twisting: A Finite Element Model Based on a Homogenization Approach." *Journal of Biomechanical Engineering* 126(6):685–98.
- Ohnishi, Hiroe, Masami Miyake, Shigeki Kamitani, and Yasuhiko Horiguchi. 2007. "The Morphological Changes in Cultured Cells Caused by Bordetella Pertussis Adenylate Cyclase Toxin." *FEMS Microbiology Letters* 279:174–79.
- Papon, Jean-françois et al. 2012. "Quantitative Analysis of Ciliary Beating in Primary Ciliary

- Dyskinesia : A Pilot Study." *Orphanet Journal of Rare Diseases* 7(78):1–11.
- Paszek, Matthew J. et al. 2005. "Tensional Homeostasis and the Malignant Phenotype." *Cancer Cell* 8:241–54.
- Pelletier, Phane, Catherine Julien, Michel R. Popoff, Nathalie Lamarche-Vane, and Sylvain Meloche. 2005. "Cyclic AMP Induces Morphological Changes of Vascular Smooth Muscle Cells by Inhibiting a Rac-Dependent Signaling Pathway." *Journal of Cellular Physiology* 204:412–22.
- Planus, Emmanuelle et al. 1997. "Binding of Urokinase to Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 Mediates Cell Adhesion and Spreading." *Journal of Cell Science* 110:1091–98.
- Planus, Emmanuelle et al. 1999. "Role of Collagenase in Mediating in Vitro Alveolar Epithelial Wound Repair." *Journal of Cell Science* 112 (Pt 2:243–52. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9858477>).
- Plodinec, M. et al. 2012. "The Mechanical Signature of Breast Cancer." *Nature Nanotechnology* 7(11):757–65.
- Poh, Yeh-chuin et al. 2014. "Generation of Organized Germ Layers from a Single Mouse Embryonic Stem Cell." *Nature Communications* 5(4000):1–12. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5000>).
- Poh, Yeh-chuin, Sungsoo Na, Farhan Chowdhury, Mingxing Ouyang, and Yingxiao Wang. 2009. "Rapid Activation of Rac GTPase in Living Cells by Force Is Independent of Src." *PloS One* 4(11):1–7.
- Pollard, T. D. 1990. "Actin." *Current Opinion in Cell Biology* 2:33–40.
- Radmacher, Manfred. 2002. "Measuring the Elastic Properties of Living Cells by the Atomic Force Microscope." *Methods in Cell Biology* 68:67–90. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12053741>).
- Rankl, Christian et al. 2008. "Multiple Receptors Involved in Human Rhinovirus Attachment to Live Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(46):17778–83. Retrieved (<http://www.pnas.org/content/105/46/17778.abstract>).
- del Rio, Armando et al. 2009. "Stretching Single Talin Rod Molecule Activates Vinculin Binding." *Science* 323(5914):638–41.
- Riveline, Daniel et al. 2001. "Focal Contacts as Mechanosensors : Externally Applied Local Mechanical Force Induces Growth of Focal Contacts by an mDia1-Dependent and ROCK-Independent Mechanism." *The Journal of Cell Biology* 153(6):1175–85.
- Roca-cusachs, Pere, Nils C. Gauthier, Armando del Rio, and Michael P. Sheetz. 2009. "Clustering of alpha5beta1 Integrins Determines Adhesion Strength Whereas alphavbeta3 and Talin Enable Mechanotransduction." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(38):16245–50.
- Rogel, Arie et al. 1989. "Bordetella Pertussis Adenylate Cyclase : Purification and Characterization of the Toxic Form of the Enzyme." *The EMBO Journal* 8(9):2755–60.
- Rørth, Pernille. 2009. "Collective Cell Migration." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25:407–29.
- Sandros, Jens and Elaine Tuomanen. 1993. "Attachment Factors of Bordetella Pertussis : Mimicry of Eukaryotic Cell Recognition Molecules." *Trends in Microbiology* 1(5):192–96.

- Sato, M., K. Nagayama, N. Kataoka, M. Sasaki, and K. Hane. 2000. "Local Mechanical Properties Measured by Atomic Force Microscopy for Cultured Bovine Endothelial Cells Exposed to Shear Stress." *Journal of Biomechanics* 33(1):127–35.
- Saukkonen, By K., C. Cabellos, M. Burroughs, S. Prasad, and E. Tuomanen. 1991. "Integrin-Mediated Localization of Bordetella Pertussis within Macrophages : Role in Pulmonary Colonization." *Journal of Experimental Medicine* 173:1143–49.
- Sawada, Yasuhiro et al. 2006. "Force Sensing by Extension of the Src Family Kinase Substrate, p130Cas." *Cell* 127(5):1015–26.
- Schmid, Andreas et al. 2006. "Real-Time Analysis of cAMP-Mediated Regulation of Ciliary Motility in Single Primary Human Airway Epithelial Cells." *Journal of Cell Science* 119(20):4176–86.
- Schwartz, U. S. and M. L. Gardel. 2012. "United We Stand - Integrating the Actin Cytoskeleton and Cell-Matrix Adhesions in Cellular Mechanotransduction." *Journal of Cell Science* 125(13):3051–60. Retrieved (<http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.079509%5Cnpapers3://publication/doi/10.1242/jcs.079509>).
- Seong, Jihye et al. 2013. "Distinct Biophysical Mechanisms of Focal Adhesion Kinase Mechanoactivation by Different Extracellular Matrix Proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(48):19372–77.
- Sheetz, MP, DP Felsenfeld, and CG Galbraith. 1998. "Cell Migration: Regulation of Force on Extracellular-Matrix-Integrin Complexes." *Trends in Cell Biology* 8:51–54.
- Singh, Vikash, Anthony C. Davidson, Peter J. Hume, Daniel Humphreys, and V. Koronakis. 2017. "Arf GTPase Interplay with Rho GTPases in Regulation of the Actin Cytoskeleton." *Small GTPases* 0(0):1–8. Retrieved (<https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1329691>).
- Sleigh, MA, JR Blake, and N. Liron. 1988. "The Propulsion of Mucus by Cilia." *The American Review of Respiratory Disease* 137(3):726–41.
- Smith, Adam M., Carlos A. Guzman, and Mark J. Walker. 2001. "The Virulence Factors of Bordetella Pertussis : A Matter of Control." *FEMS Microbiology Reviews* 25:309–33.
- Smith, Michael L. et al. 2007. "Force-Induced Unfolding of Fibronectin in the Extracellular Matrix of Living Cells." *PLoS Biology* 5(10):2243–54.
- Sneddon, I. A. N. N. 1965. "The Total Depth of Penetration of the Tip of the Punch, and for." *International Journal Of Engineering Science* 3:47–57.
- Stamenovic, Dimitrije, Jeffrey J. Fredberg, Wang N, James P. Butler, and Donald E. Ingber. 1996. "A Microstructural Approach to Cytoskeletal Mechanics Based on Tensegrity." *Journal of Theoretical Biology* 181:125–36.
- Stamenović, Dimitrije, Srboľjub M. Mijailovich, Iva Marija Tolić-Nørrelykke, Jianxin Chen, and Ning Wang. 2002. "Cell Prestress. II. Contribution of Microtubules." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 282(3):C617-24. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11832347>).
- Stamenović, Dimitrije and Ning Wang. 2011. "Stress Transmission within the Cell." *Comprehensive Physiology* 1(1):499–524.
- Stibitz, Scott and Teri L. Garletts. 1992. "Derivation of a Physical Map of the Chromosome of

- Bordetella Pertussis Tohama I." *Journal of Bacteriology* 174(23):7770–77.
- Sulchek, Todd et al. 2005. "Dynamic Force Spectroscopy of Parallel Individual Mucin1-Antibody Bonds." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(46):16638–43. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1276867&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Sun, Z. et al. 2005. "Mechanical Properties of the Interaction between Fibronectin and $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin on Vascular Smooth Muscle Cells Studied Using Atomic Force Microscopy." *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 289(6):H2526–35. Retrieved (<http://ajpheart.physiology.org/cgi/content/full/289/6/H2526%5Cnpapers://4c48fe13-7c69-4b65-a0fa-467dcccdec3f/Paper/p10839>).
- Svitkina, Tatyana M. 2018. "Ultrastructure of the Actin Cytoskeleton." *Current Opinion in Cell Biology* 54:1–8. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2018.02.007>).
- Tan, T. 2005. "Epidemiology of Pertussis." *Pediatric Infectious Disease Journal* 24:35–38.
- Taubenberger, Anna et al. 2007. "Revealing Early Steps of $\alpha 2 \beta 1$ Integrin-Mediated Adhesion to Collagen Type I by Using Single-Cell Force Spectroscopy." *Molecular Biology of ...* 18(May):1634–44. Retrieved May 23, 2013 (<http://www.molbiolcell.org/content/18/5/1634.short>).
- Thomas, Wendy E., Viola Vogel, and Evgeni Sokurenko. 2008. "Biophysics of Catch Bonds." *Annual Review of Biophysics* 37:399–416.
- Thompson, A. B. et al. 1995. "Immunological Functions of the Pulmonary Epithelium." *European Respiratory Journal* 8:127–49.
- Tilley, Ann E., Matthew S. Walters, Renat Shaykhiev, and Ronald G. Crystal. 2015. "Cilia Dysfunction in Lung Disease." *Annual Review of Physiology* 77:379–406.
- Toivola, DM and JE Eriksson. 1999. "Toxins Affecting Cell Signalling and Alteration of Cytoskeletal Structure." *Toxicology in Vitro* 13:521–30.
- Ueki, Ayaka and Satoru Kidoaki. 2015. "Manipulation of Cell Mechanotaxis by Designing Curvature of the Elasticity Boundary on Hydrogel Matrix." *Biomaterials* 41:45–52. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.11.030>).
- Valiron, O., N. Caudron, and D. Job. 2001. "Microtubule Dynamics." *Cellular and Molecular Life Science* 58:2069–84.
- Verkman, A. S. 2002. "Aquaporin Water Channels and Endothelial Cell Function." *Journal of Anatomy* 200:617–27.
- Vogel, Viola and Michael Sheetz. 2006. "Local Force and Geometry Sensing Regulate Cell Functions." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7(4):265–75. Retrieved May 26, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16607289>).
- Vojtova-vodolanova, Jana et al. 2009. "Oligomerization Is Involved in Pore Formation by Bordetella Adenylate Cyclase Toxin." *The FASEB Journal* 23(9):2831–43.
- Wang, Bin et al. 2012. "Force Control of Endothelium Permeability in Mechanically Stressed Pulmonary Micro-Vascular Endothelial Cells." *Bio-Medical Materials and Engineering* 22(1–

- 3):163–70.
- Wang, Hailong, A. S. Abhilash, Christopher S. Chen, Rebecca G. Wells, and Vivek B. Shenoy. 2014. "Article Long-Range Force Transmission in Fibrous Matrices Enabled by Tension-Driven Alignment of Fibers." *Biophys J* 107(11):2592–2603. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2014.09.044>).
- Wang, Hong-bei, Micah Dembo, Steven K. Hanks, and Yu-li Wang. 2001. "Focal Adhesion Kinase Is Involved in Mechanosensing during Fibroblast Migration." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(20):11295–300.
- Wang, Ju Guang, Motoi Miyazu, Etsushi Matsushita, Masahiro Sokabe, and Keiji Naruse. 2001. "Uniaxial Cyclic Stretch Induces Focal Adhesion Kinase (FAK) Tyrosine Phosphorylation Followed by Mitogen- Activated Protein Kinase (MAPK) Activation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288:356–61.
- Wang, Ning. 1998. "Mechanical Interactions Among Cytoskeletal Filaments." *Hypertension* 32:162–65.
- Wang, Ning et al. 2002. "Cell Prestress. I. Stiffness and Prestress Are Closely Associated in Adherent Contractile Cells." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 282(3):C606-16. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11832346>).
- Wang, Ning. 2017. "Review of Cellular Mechanotransduction." *Journal of Physics D: Applied Physics* 50:1–8. Retrieved (<https://doi.org/10.1088/1361-6463/aa6e18>).
- Wang, Ning, James P. Butler, and Donald E. Ingber. 1993. "Mechanotransduction Across the Cell Surface and Through the Cytoskeleton." *Science* 260:1124–28.
- Wang, Ning and Zhigang Suo. 2005. "Long-Distance Propagation of Forces in a Cell." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328(4):1133–38. Retrieved August 23, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15707995>).
- Wang, Xuefeng et al. 2015. "Integrin Molecular Tension within Motile Focal Adhesions." *Biophysj* 109:2259–67. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2015.10.029>).
- Wanner, A., M. Salathe, and TG O’Riordan. 1996. "Mucociliary Clearance in the Airways." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medecine* 154(6 Pt 1):1868–1902.
- Wendling, S. et al. 2000. "Role of Cellular Tone and Microenvironmental Conditions on Cytoskeleton Stiffness Assessed by Tensegrity Model." *The European Physical Journal Applied Physics* 9(1):51–62.
- Wendling, S., C. Oddou, and D. Isabey. 1999. "Stiffening Response of a Cellular Tensegrity Model." *Journal of Theoretical Biology* 196(3):309–25.
- Wichert, Götz Von et al. 2003. "RPTP- Alpha Acts as a Transducer of Mechanical Force on alphavbeta3-Intégrin-Ctoskeleton Linkages." *Journal of Cell Biology* 161(1):143–53.
- Widdicombe, JH and JG Widdicombe. 1995. "Regulation of Human Airway Surface Liquid." *Respiration Physiology* 99:3–12.
- Willems, Rob J. L. et al. 1994. "Mutational Analysis of the Bordetella Pertussis Fim / Fha Gene Cluster : Identification of a Gene with Sequence Similarities to Haemolysin Accessory Genes Involved in Export of FHA." *Molecular Microbiology* 11(2):337–47.

- Williams, Philip M. 2003. "Analytical Descriptions of Dynamic Force Spectroscopy: Behaviour of Multiple Connections." *Analytica Chimica Acta* 479(1):107–15.
- Wilson, R. et al. 1991. "Effects of Bordetella Pertussis Infection on Human Respiratory Epithelium In Vivo and In Vitro." *Infection and Immunity* 59(1):337–45.
- Wilson, R., Dowling RB, and AD Jackson. 1996. "The Effects of Bacterial Products on Airway Cells and Their Function." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 154(4 Pt 2):197–201.
- Wolff, J., G. Cook Hope, Alan R. Goldhammer, and SA Berkowitz. 1980. "Calmodulin Activates Prokaryotic Adenylate Cyclase." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77(7):3841–44.
- Woodhead, M. et al. 2011. "Guidelines for the Management of Adult Lower Respiratory Tract Infections - Full Version." *Clinical Microbiology and Infection* 17(6):E1–59. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03672.x>).
- Wozniak, Michele A. and Christopher S. Chen. 2009. "Mechanotransduction in Development: A Growing Role for Contractility." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10(1):34–43.
- Xiao, Tsan, Junichi Takagi, Barry S. Collier, Jia-huai Wang, and Timothy A. Springer. 2004. "Structural Basis for Allostery in Integrins and Binding to Fibrinogen-Mimetic Therapeutics." *Nature* 432(7013):1–18.
- Yeo, Nam-kyung and Yong Ju Jang. 2010. "Rhinovirus Infection-Induced Alteration of Tight Junction and Adherens Junction Components in Human Nasal Epithelial Cells." *The Laryngoscope* 120:346–52.
- Zee, Anneke Van der, Cleem Agterberg, Marcel Peeters, Joop Schellekens, and Frits R. Mooi. 1993. "Polymerase Chain Reaction Assay for Pertussis : Simultaneous Detection and Discrimination of Bordetella Pertussis and Bordetella Parapertussis." *Journal of Clinical Microbiology* 31(8):2134–40.
- Zhang, Xiaohui and Vincent T. Moy. 2003. "Cooperative Adhesion of Ligand-Receptor Bonds." *Biophysical Chemistry* 104(1):271–78.