

**Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg**

**Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Biologie moléculaire et cellulaire**

par Leyla Kocgozlu

**Rôle de l'élasticité du substrat sur des cellules
épithéliales en cours de division et sur la
régulation d'activités nucléaires**

Soutenue publiquement le 09 Juillet 2010

JURY

Directeurs de Thèse	M. Dominique VAUTIER Docteur, INSERM 977, Strasbourg
	M. Henri TENENBAUM Professeur des Universités, (PUPH) Strasbourg
Rapporteurs externes	Mme Catherine PICART Professeur des Universités, Grenoble
	M. Matthieu PIEL Chargé de Recherches, CNRS 144, Paris
Examineur	M. Jean-Noël FREUND Directeur de Recherches, INSERM 682, Strasbourg
Membre invité	M. Jean-Claude VOEGEL Directeur de Recherches, INSERM 977, Strasbourg

La vie est une aventure audacieuse ou elle n'est rien.

(Hellen Keller)

À mes Parents, Fikret et Şahinder
À ma Sœur Kezban
À mes Frères, Erdal et Sadik
À mes neveux, Fatih, Yasin, Selçuk et Kemal-Can
À mes amis

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse, Dominique Vautier, Docteur à l'INSERM 977, pour m'avoir encadrée tout au long de ces années de thèse avec une générosité entière et une implication perpétuelle. Ton encadrement et ton enseignement scientifique m'ont permis d'accomplir ce travail dans d'excellentes conditions. Ta disponibilité, ton optimisme et ta passion de la recherche m'ont toujours donné l'enthousiasme, l'envie d'aller encore plus loin.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Professeur Henri Tenenbaum, mon co-directeur de thèse, pour l'intérêt qu'il a manifesté à mon égard, pour ses encouragements notamment lors de mes premières communications. Je le remercie également pour la confiance qu'il m'a accordée lors de mes premiers travaux de recherches lors du Master.

Je remercie vivement Jean-Claude Voegel, Directeur de Recherches de l'INSERM 977 pour son soutien permanent, pour ses conseils avisés qui ont donné de l'assurance et de l'audace à ce travail. Son intérêt, son suivi ont toujours permis de négocier de la meilleure façon possible les tournants de ce travail.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude à la Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg pour m'avoir rémunérée tout au long de la thèse. Je remercie sincèrement Monsieur le Professeur Youssef Haïkel, Doyen de la Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg, pour sa confiance et son intérêt manifesté à mon travail.

Je suis très sensible à l'honneur que me font les membres du jury en acceptant de juger ce travail. Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Madame Catherine Picart, Professeur des Universités à Grenoble, à Monsieur Matthieu Piel, Chargé de Recherches au CNRS 144 et à Monsieur Jean-Noël Freund, Directeur de recherches à l'INSERM 682. Je leurs adresse mes sincères remerciements.

Je ne peux oublier de remercier Pierre Schaaf, Professeur à l'Université de Strasbourg, son intérêt, ces discussions scientifiques acharnées, animées et enthousiastes, ont permis d'approfondir ce travail.

Je remercie également le Docteur Philippe Laval pour sa disponibilité, son écoute et son soutien. Je n'oublie pas sa pensée sur les « brindilles » et sa présence à cette période sans compter sur quelques unes de ces phrases percutantes qui m'ont bien fait sourire.

Je remercie Madame Benkirane Jessel Nadia pour ses conseils, ses encouragements et ses discussions scientifiques pleins d'enthousiasmes et d'ingéniosités. Je n'oublie pas ta sympathie et ton accueil au laboratoire lors de mon arrivée.

J'adresse une mention spéciale à Monsieur Bernard Senger, non seulement pour son aide au cours de cette thèse mais aussi pour son élégance toujours à la pointe de l'excellence et sa galanterie digne d'un grand gentleman. Te rencontrer dans les couloirs fût toujours un plaisir.

Je remercie Monsieur Vincent Ball, certainement une des personnes les plus passionné par la recherche que j'ai rencontré. Toujours prêt à vous donner des explications avec un immense enthousiasme à nos questions. Monsieur l'agitateur continuez d'agiter la science.

Un grand merci à Madame Christiane Bouthier pour tes phrases bien dosées, tes remarques judicieuses et tes conseils hautement stratégiques.

J'adresse mes remerciements à Monsieur René Elkaïm et à Mademoiselle Sandra Werner pour m'avoir encadrée successivement lors de mes recherches en Master. Je ne pourrai oublier les quelques fous rires que nous avons eu, notamment lors des sonneries incessantes venues de nulle part.

Je remercie chaleureusement Olivier Huck, que je nomme mon successeur dans la recherche parodontale. Il a toujours été un parfait bleu malgré mes boutades, il n'a jamais

failli. Merci pour ta sympathie toujours égale et ton humour face aux situations quelques peu rocambolesques.

Je tiens à remercier Madame Géraldine Koenig pour son investissement que j'ai pu apprécier à sa juste valeur. Etre à ton contact m'a appris bien des choses, et je t'en suis reconnaissante pour cela.

Je remercie chaleureusement Cosette Betscha, pour nos échanges animés souvent d'un fou rire, pour ta gentillesse et ta sympathie. Je crois que les pauses café étaient des moments essentiels pour le bon déroulement des expériences.

J'en arrive à présent à mes compagnons de bureau. Je remercie vivement Cédric Vogt, pour nos discussions riches, pour ta réactivité à toutes les interpellations que j'ai pu te faire, pour ta vivacité d'esprit et les quelques débats animés que tu sais si bien susciter. J'adresse un clin d'œil à Nihal Engin Vrana pour sa sympathie, les échanges pleins de dynamisme et ses conseils avisés.

Je salue la communauté des thésards, anciens comme nouveaux, j'ai partagé avec vous des échanges scientifiques mais aussi des moments sympathiques et quelques éclats de rires. Merci à Falk Bernsmann, Alae El Haitami, Mathias Lefort, Hajare Mjahed, Damien Mertz, Nadhia Ladhari, Adnane Nait Lechguer, Laurent Jourdain, Gregory Francius, Erell Leguen...

Je remercie toute l'équipe de l'INSERM 977, Florent Meyer, Isabelle Nguyen, Christine Affolter, Florence Fioretti, Jean-Jacques Fluck, François Clauss, Armelle Chassepot, Pierre Simonis, Christian Ringwald, Eric Mathieu, Joseph Hemmerlé, Carlos Mendoza, Yves Cam,... pour les moments partagés au détour de quelques expériences.

Je n'oublie pas Youri Arntz, je le remercie pour son écoute, sa présence durant toute la thèse et sa façon bien particulière de faire face aux événements quelques peu inattendus. Tes

encouragements continuels et ton appui ont été toujours la bienvenue, merci aussi d'avoir su me faire rire même dans les moments les plus ardues.

Un grand merci à Ludovic Richert pour tes conseils avisés, ta générosité et ta sincérité. J'ai su apprécier les discussions scientifiques mais aussi ton aide et ton partage de ta propre expérience de post-doc qui effectivement semblait être remplie de surprises.

J'adresse un merci particulier à mes amis connus au travers d'actions associatives. Pour le côté non scientifique, pour l'élargissement de mon esprit, les connaissances apportées qui m'ont enrichie et les nombreux fous rires qui m'ont fait prendre conscience d'une chose, il n'y a pas que les scientifiques dans la vie.

Je remercie mes amis, ceux qui ont été présents et ont su m'encourager, ceux qui vous donnent du temps, vous écoutent sans condition, ceux qui vous apportent de l'affection. Sans vous, cela aurait été moins facile d'avancer et de surmonter les baisses de régime.

Un merci chaleureux à celle que je connais depuis l'époque du collègue, à Penbe Kurtul pour son amitié, sa présence et son altruisme. Pour les coups de tête, les échanges animés et sincères.

Enfin, je remercie ma famille. Je suis profondément reconnaissante à mes parents, le parfait mélange de la douceur et de la force. A ma sœur, Kezban, j'ai toujours pris exemple sur sa droiture. A mon frère Erdal, lui qui m'a aidée à négocier le virage le plus décisif, ton soutien à ce moment précis sera gravé à jamais dans mon esprit. A mon autre frère, Sadik, l'incarnation de l'honnêteté et de la loyauté, merci pour ta présence, et les quelques innombrables navettes que tu as pu faire entre Strasbourg et la maison. Je n'oublie pas mes neveux, ils m'ont toujours communiqué leurs énergies, et m'ont permis de me détendre au cours de certains jeux bien animés. Au reste de ma famille, bien trop grande pour les citer tous, mais les moments passés autour d'un barbecue, et les thés pris sous les étoiles accompagnés de discussions cocasses font partie des moments de détente inestimables.

Abréviations & Symboles	9
Liste des figures et des tableaux.....	13
Avant-propos	16

Chapitre 1: Généralités

1.1 Problématique.....	21
1.2 Techniques d'évaluations de la réponse cellulaire à un signal physique extracellulaire ...	23
1.2.1 Forces générées par la cellule.....	23
1.2.2 Application d'une force externe pour sonder la réponse cellulaire.....	24
1.2.3 Rigidité du substrat.....	24
1.3 Module de Young et spectroscopie de force	25
1.4 Substrats synthétiques à élasticités variables	28
1.4.1 Les membranes de silicone PDMS.....	29
1.4.2 Les gels de polyacrylamide (PA)	29
1.4.3 Les films multicouches de polyélectrolytes	30
1.4.3.1 Principe du dépôt couche par couche	31
1.4.3.2 Différentes techniques de dépôt	33
1.4.3.3 Diversité de substrat	33
1.4.3.4 Modes de croissance.....	34
1.4.4 Propriétés mécaniques des films multicouches.....	37
1.4.5 Quelques considérations moléculaires des propriétés mécaniques	38
1.4.6 Le système (PLL/HA) ₂₄ -(PSS/PAH) _n	39
1.4.7 Elasticité du système (PLL/HA) ₂₄ -(PSS/PAH) _n	40
1.4.8 Quelques perspectives d'application des multicouches de polyélectrolytes	40
1.5 La mécanotransduction	42
1.5.1 Définition	42
1.5.2. Quelques considérations sur la mécanotransduction.....	44
1.6 Principaux constituants cellulaires abordés dans ce travail de thèse.....	46
1.6.1 Les intégrines	46
1.6.2 Points focaux d'adhésion	48
1.6.3 Les protéines de signalisation FAK	50
1.6.4 La voie des MAP-kinases.....	51
1.6.5 Le cytosquelette de la cellule : cas des filaments d'actines	52
1.7 Activités nucléaires	53
1.7.1 La Réplication chez les eucaryotes	53
1.7.2 La transcription chez les eucaryotes.....	55
1.7.3 Relation fonctionnelle entre la réplication et la transcription	57
1.7.4 hnRNP A1	59
1.8 Comportements cellulaires dépendants de l'élasticité du substrat.....	61
1.8.1 Adhésion, migration, tractions	61
1.8.2 Différenciation cellulaire.....	63
1.8.3 Invasion tumorale	64

Chapitre 2: Matériels et méthodes

2.1 Matériels.....	66
2.1.1 Les polyélectrolytes.....	66
2.1.2 Construction des films.....	68
2.1.3 Méthodes de caractérisation et d'analyse.....	70
2.1.3.1 Microscopie confocale à balayage laser.....	70
2.1.3.2 Microscopie à épi-fluorescence.....	74
2.2 Méthodes.....	74
2.2.1 Les modèles cellulaires étudiés.....	74
2.2.2 La Synchronisation mécanique.....	75
2.2.3 Adhésion cellulaire.....	76
2.2.3.1 Test MTT.....	76
2.2.3.2 Test de viabilité cellulaire par mesure de l'activité de la phosphatase acide.....	76
2.2.4 Immunomarquage.....	77
2.2.5 La réplication chez les eucaryotes.....	81
2.2.6 L'inhibition de Rac 1.....	82
2.2.7 La transcription chez les eucaryotes.....	83
2.2.8 Apoptose.....	84
2.2.9 La microscopie.....	85
2.2.10 Western Blot.....	86
2.2.11 Quantification.....	87

Chapitre 3: Rôle de l'élasticité du substrat sur la réplication et la transcription de cellules épithéliales PtK2

3.1 Introduction à l'article 1.....	93
3.2 Article 1.....	94
3.3 Résultats supplémentaires.....	106
3.4 Résumé article 1.....	112

Chapitre 4: Rôle de l'élasticité du substrat sur des cellules PtK2 en mitose

4.1 Introduction à l'article 2	114
4.1. 1 La mitose	114
4.1.2 Le rôle de l'élasticité du substrat sur des cellules épithéliales PtK2 en mitose	117
4.2 Article 2.....	118
4.3 Résumé des résultats de l'article 2	140

Conclusion générale	141
Références bibliographiques	145
Liste des publications et des communications.....	156

Abréviations & Symboles

Polyélectrolytes

HA : Acide hyaluronique

PDADMA : Poly(diallyldiméthylammonium)

PLL : Poly(L-lysine)

PAH : Poly(allylamine)

PGA: Poly(acide-L-glutamique)

PSS : Poly(4-styrène sulfonate de sodium)

PLL^{FITC}: Poly(L-lysine) greffée à l'isothiocyanate de fluorescéine

PSS^{Rho}: Poly(4-styrène sulfonate de sodium) greffé à la methacryloxyéthyl-thiocarbamoyl
rhodamine B

Les matrices

PA: Acide polyacrilamide

PDMS: Poly(diméthylsiloxane)

PEMs : Films multicouches de polyélectrolytes

Réactifs et solvants utilisés

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EDC : 1-Ethyl-3-(3-diméthylamino-propyl) carbodiimide

EDTA: Ethylène diamine tétraacétique

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

HCl : Acide chlorhydrique

NaCl : Chlorure de sodium

NHS: N-hydroxysulfo succinimide

NP-40 : Nonyl phenoxy polyéthoxyéthanol

PFA : Paraformaldéhyde

pNPP : p-nitrophényl phosphate

Rho : Rhodamine succinimidylester

SDS : Sodium dodecyl sulfate

TBS-T : Tris buffer saline tween

Tris : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane

TRITC : Tetramethyl rhodamine 5,6-isothiocyanate

Appareils et techniques utilisés

AFM : Microscopie à force atomique

CLSM : Microscopie confocale à balayage laser

QCM-D : Microbalance à cristal de quartz avec dissipation

Milieux de culture

FBS : foetal bovine serum

PBS : phosphate-buffered saline

RPMI 1640 : “ Roswell Parc Memorial Institute”

Molécules biologiques et protéines

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADN Pol : ADN polymérase

ARN: Acide ribonucléique

ARN Pol : ARN polymérase

ARC: Activator regulated co-factor

ARNnh: ARN nucléaires hétérogènes

Arp2/3: Actin related protein 2/3

ATP: Adénosine triphosphate

CRSP : Co-factor required for Sp1

CTP: Cytosine triphosphate

ERK: Extracellular signal regulated kinase

FAs: Foca adhesion (point d'ancrage) α -MSH : α -melanocyte-stimulating hormone

FAK : Focal adhesion kinase

FERM : ezrin radixin moesin

(Hormone mélanostimulante α)

ES: Early S phase

hnRNPs: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complexes

ILK: Integrin linked kinase

JNK: Jun N-terminal kinase

LD: motif riche en leucines

LIM : Lin 11, Isl 1, Mec-3

LS: Late S phase

MAPK: Mitogen activated protein kinase

MSCs: cellules souches mésenchymateuses

MEC: Matrice extracellulaire

MS: Medium S phase

MR: Mismatch repair

OR: Origine de réplication

ROCK: Rho associated kinase

PBAF: Poly-bromo-associated BAF

PCNA: Proliferating cell nuclear antigen

RGD: tripeptide Arginine-Glycine-Asparagine

RP-A: Replication protein-A

snRNP : Small nuclear ribonucleoprotein

Sp1 : Small protein 1

Src: Rous Sarcoma virus

SWI/SNF: SWITCH/Sucrose Non Fermentable

SSB: Single strand binding

TBP: TATA binding protein

TF: Transcription Factor

TIAM1: T-cell lymphoma invasion and metastasis 1

Liste des figures et des tableaux

Chapitre 1 : Généralités

Figure 1.1. Facteurs régulant la différenciation cellulaire. Adaptée d'Even-Ram et al., 2006.

Figure 1.2. Schéma de principe de la technique de nanoindentation.

Figure 1.3. Mouvements possibles de la céramique piézoélectrique.

Figure 1.4. Schéma simplifié de la construction de multicouches de polyélectrolytes par répétition successive des étapes d'adsorption et de rinçage (Decher G. et al. 1997).

Figure 1.5. Mode de croissance des films multicouches de polyélectrolytes.

Figure 1.6. Modèle de diffusion des films à croissance exponentielle.

Figure 1.7. Observation par microscopie confocale d'un film bi-domaines (PLL/HA)₂₃-PLL^{FITC} (PSS/PAH)₄-PSS^{tho}-PAH, barre 5 μ m.

Figure 1.8. Evolution du module de Young en fonction du nombre de dépôts n sur un film (PLL/HA)₂₄-(PSS/PAH)_n.

Figure 1.9. Schéma des différentes étapes de la « mécano-sensation » à la « mécano-réponse » de la cellule.

Figure 1.10. Integrin receptor family. Adaptée de Hynes R.O et al., 2002.

Figure 1.11. Architecture moléculaire (non exhaustive) d'un point d'adhérence.

Figure 1.12. Lien actine-intégrine

Figure 1.13. Organisation de l'Escherichia coli réplicase.

Figure 1.14. Le complexe d'initiation de la transcription chez les eucaryotes.

Figure 1.15. Représentation schématique du transport nucléocytoplasmique de la protéine hnRNP A1.

Figure 1.16. Différentes classes d'ARN transcrits dans le noyau par différentes ARN polymerase, tous exportés dans le cytoplasme à travers les pores nucléaires.

Figure 1.17. Cellules sur des modèles d'élasticité tissulaire. D'après Rehfeldt et al. 2007.

Tableau 1.1. Substrats synthétiques et naturels. Adaptée de Rehfeldtet al. 2007

Tableau 1.2. Nature des substrats utilisés pour la construction des films multicouches de polyélectrolytes.

Tableau 1.3 Module élastiques (modules d'Young) de différents films multicouches de polyélectrolytes.

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

Figure 2.1. Construction d'un film multicouche par trempage.

Figure 2.2. Diagramme de Jablonski.

Figure 2.3. Schéma de principe d'un microscope confocale à balayage laser

Figure 2.4. Principe de reconstitution d'images en 3D.

Figure 2.5. Coupe verticale (en z) d'un film multicouche (PLL/HA)₆₀/PLL^{FITC}.

Figure 2.6. Formule moléculaire de l'inhibiteur de Rac1 NSC23766 (C₂₄H₃₈Cl₃N₇)

Figure 2.7. Action de l'inhibiteur de Rac1.

Tableau 2.1. Polyélectrolytes dégradables.

Tableau 2.2. Polyélectrolytes synthétiques non dégradables.

Tableau 2.3. Polyélectrolytes fluorescents utilisés.

Tableau 2.4. Module élastique de Young apparent de (PLL/HA)₂₄-(PSS/PAH)_n avec n = 2, 5, 12.

Tableau 2.5. Anticorps primaires utilisés lors des immunomarquages.

Tableau 2.6 Anticorps secondaires utilisés lors des immunomarquages.

Tableau 2.7. Anticorps primaires.

Tableau 2.8. Anticorps secondaires couplés à l'HRP.

Conclusion générale

Figure I. Connectivité structurelle et distance de propagations des forces. D'après Wang et al., 2009.

Figure II. Evènements cellulaires observés lors de l'interphase et la mitose chez des cellules épithéliales (Ptk2) sur des substrats à élasticités variables.

Avant-propos

Les forces mécaniques ont une implication prépondérante dans la croissance et la morphologie de tous les tissus et organes de notre corps. Cependant, il y a à peine une décade, les mécanismes par lesquels chaque cellule perçoit ces signaux mécaniques et les traduit en signaux biochimiques étaient encore peu connus. La conceptualisation de nouveaux substrats biomimétiques alliés au développement de techniques de caractérisation de la réponse cellulaire à un *stimuli* physique permettent dorénavant des avancées considérables dans le domaine. Il s'agit notamment de déterminer l'influence des forces mécaniques sur les processus d'adhésion, de dynamique et de migration cellulaire...jusqu'à l'expression de gène. Des domaines très spécifiques tels que l'ingénierie tissulaire, la médecine régénérative, les biomatériaux implantables, la biologie du développement et également la cancérologie, peuvent bénéficier de l'avancée de ces prodigieuses connaissances tant sur le plan thérapeutique que fondamental.

Pourquoi nous sommes nous intéressés au rôle de l'élasticité du substrat sur les activités nucléaires de réplication, de transcription et de transport de la protéine hnRNP A1 ? Les efforts concernant le rôle des propriétés mécaniques du substrat sur le comportement cellulaire et la compréhension des phénomènes de mécanotransduction ont essentiellement porté sur les premières étapes de l'adhésion cellulaire avec comme conséquences « spectaculaires », par exemple, la découverte de l'influence de l'élasticité de la matrice sur la différenciation de cellules souches mésenchymateuses (Engler et al., 2006). Les aspects suivants ont été caractérisés à l'échelle moléculaire : 1) l'impact d'une force physique sur un acteur bien déterminé de l'adhésion cellulaire (protéine de la matrice extracellulaire, intégrines...); 2) la perception du signal physique par ce récepteur et sa transmission en cascade à d'autres facteurs cellulaires jusqu'aux voies de signalisation concernées. Bien que

beaucoup d'étapes intermédiaires soient encore peu connues, nous avons choisi de faire « un bond » au niveau du noyau pour étudier l'effet de l'élasticité du substrat sur le matériel génétique qu'il contient. L'objectif initial vise également à identifier les liens physiques susceptibles d'être impliqués entre des constituants majeurs de l'adhésion cellulaire et du cytosquelette avec le noyau. Nous avons ainsi choisi trois fonctions impliquées, à trois niveaux différents, dans les voies génétiques fondamentales par lesquelles l'information est exprimée : la réplication pour l'ADN, la transcription pour l'ARN et la localisation nucléaire de la protéine hnRNP A1 pour le transport intracellulaire. Le rôle de l'élasticité du substrat sur ces activités nucléaires a été étudié à partir de cellules épithéliales PtK2 de rein de kangourou synchronisées mécaniquement en mitose. C'est par ce même procédé qu'il a été possible d'étudier la contribution de l'élasticité du substrat sur les cellules en mitose, aspect de mécanotransduction encore peu abordé à cette phase du cycle cellulaire.

L'équipe II du laboratoire « biomatériaux et ingénierie tissulaire » de l'UMR 977, dans lequel j'ai effectué ma thèse, développe des matériaux biomimétiques à partir de matrices synthétiques ou naturelles auto-assemblées. Le substrat modèle que j'ai utilisé est un film multicouche de polycations et polyanions auto-assemblés couche par couche (Decher, 1997) aux propriétés contrôlées en terme d'épaisseur, de viscoélasticité et de rigidité. Les films sont composés de deux strates construites à partir de deux couples de polyélectrolytes différents : une strate épaisse et molle constituée d'acide poly-L-lysine et d'acide hyaluronique (PLL/HA) et une strate très mince et dure constituée de poly(styrène) sulfonate et de polyallylamine (PSS/PAH). La rigidité des films $(PLL/HA)_{24}-(PSS/PAH)_n$ augmente avec le nombre n de paires de couche déposées. Elle passe ainsi de quelques kPa pour $n = 0$, à 500 kPa pour $n = 12$, couvrant ainsi la gamme d'élasticité des tissus vivants. L'organisation, spatiale de la réplication et de la transcription a été précédemment très bien identifiée dans des cellules épithéliales (PtK2) (Ferreira et al., 1997) c'est pourquoi j'ai sélectionné ce modèle

cellulaire au cours de ma thèse. Le travail présenté dans ce mémoire s'articule autour de quatre chapitres. Le premier chapitre est consacré aux généralités abordant à la fois la problématique soulevée ainsi que les différents outils disponibles pour étudier la réponse cellulaire à un signal mécanique. Dans ce chapitre, j'aborde également la question de la mécanotransduction et les différents constituants cellulaires étudiés dans ce travail de thèse.

Le chapitre 2 décrit de manière détaillée les différents réactifs et protocoles expérimentaux utilisés pour répondre aux différentes questions posées.

Le troisième chapitre expose les résultats obtenus dans la première partie de ma thèse sur le rôle de l'élasticité du substrat sur la réplication et la transcription de cellules épithéliales PtK2.

Enfin, le chapitre quatre concerne la deuxième partie de mes travaux de thèse et traite du rôle de l'élasticité du substrat sur la mitose de cellules épithéliales PtK2.

Chapitre 1 Généralités

1.1 Problématique

1.2 Techniques d'évaluations de la réponse cellulaire à un signal physique extracellulaire

1.2.1 Forces générées par la cellule

1.2.2 Application d'une force externe pour sonder la réponse cellulaire

1.2.3 Rigidité du substrat

1.3 Module de Young et spectroscopie de force

1.4 Substrats synthétiques à élasticité variable

1.4.1 Les membranes de silicone PDMS

1.4.2 Les gels de polyacrylamide (PA)

1.4.3 Les films multicouches de polyélectrolytes

1.4.3.1 Principe du dépôt couche par couche

1.4.3.2 Différentes techniques de dépôt

1.4.3.3 Diversité du substrat

1.4.3.4 Modes de croissance

1.4.4 Propriétés mécaniques des films multicouches

1.4.5 Quelques considérations moléculaires des propriétés mécaniques

1.4.6 Le système $(PLL/HA)_{24}-(PSS/PAH)_n$

1.4.7 Elasticité du système $(PLL/HA)_{24}-(PSS/PAH)_n$

1.4.8 Quelques perspectives d'application des multicouches de polyélectrolytes

1.5 La mécanotransduction

1.5.1 Définition

1.5.2 Quelques considérations de la mécanotransduction

1.6 Principaux constituants cellulaires abordés dans ce travail de thèse

1.6.1 Les intégrines

1.6.2 Les points focaux d'adhésion

1.6.3 Les protéines de signalisation FAK

1.6.4 La voie des MAP-kinases

1.6.5 Le cytosquelette de la cellule : cas des filaments d'actine

1.7 Activités nucléaires

1.7.1 La réplication chez les eucaryotes

1.7.2 La transcription chez les eucaryotes

1.7.3 Relation fonctionnelle entre la réplication et la transcription

1.7.4 hnRNPA1

1.8 Comportements cellulaires dépendants de l'élasticité du substrat

1.8.1 Adhésion, migration, tractions

1.8.2 Différenciation cellulaire

1.8.3 Invasion tumorale

1.1 Problématique

L'élaboration de biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire est confrontée à la grande complexité de l'environnement extracellulaire naturel. La matrice extracellulaire naturelle est un réseau fibreux tridimensionnel très complexe où s'organisent des fibres et des espaces contenant de nombreux signaux biochimiques tels que des facteurs solubles sécrétés d'une grande diversité de composition chimique. Cet environnement comprend également une grande variabilité de propriétés physiques ; comme par exemple la topographie, l'élasticité et la compliance (figure 1.1).

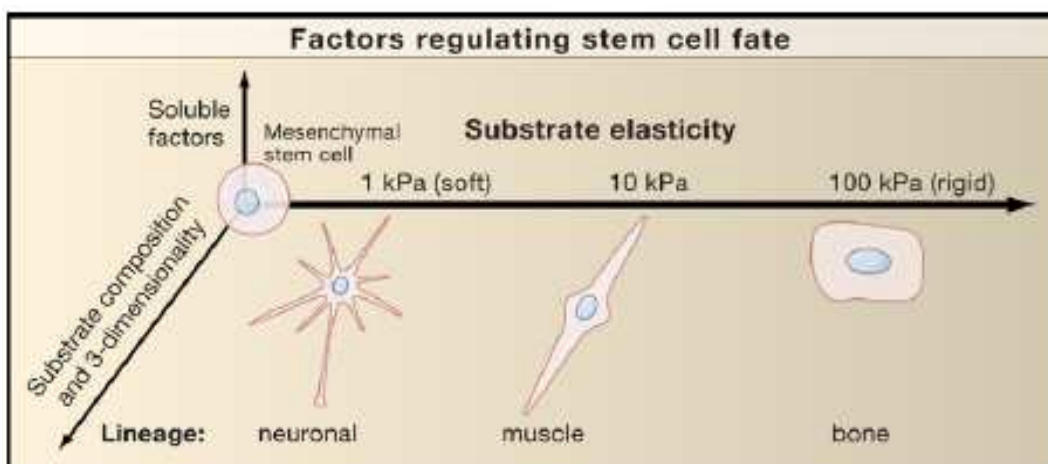


Figure 1.1. Facteurs régulant la différenciation cellulaire. Adaptée d'Even-Ram et al., 2006.

Localement, les cellules doivent faire face à de continus remaniements de ces ensembles de paramètres. Au cours de l'étalement ou de la migration cellulaire les cellules rencontrent en permanence de nouveaux ligands. Des cellules stabilisées dans un tissu pendant plusieurs jours perdent leur dynamique de migration tout en renouvelant régulièrement les contacts qu'elles ont établis entre la matrice extracellulaire et ses protéines du cytosquelette. Ces cellules non migratoires pourront subir, au cours du temps, des

changements du microenvironnement suite à une altération naturelle ou pathologiques de celui-ci (Davies, 1995 ; Sadoshima et Izumo, 1997 ; Lane Smith et al., 2000). De nouveaux contacts pourront se substituer aux contacts initiaux alors perdus.

D'autres cellules migratoires rencontreront des environnements chimiquement et mécaniquement différents. Par exemple, au cours de leur développement, des cellules de la crête neuronale traversent différents stroma extracellulaires. Pour coloniser des organes cibles, les lymphocytes circulants traversent différents tissus. Egalement, au cours de processus pathologiques tel que la dissémination métastatique, les cellules tumorales acquièrent la capacité de migrer dans le stroma. Jusqu'à maintenant, les interactions matrice extracellulaire - cellules, responsables de ces processus, sont généralement abordées *in vitro* par des approches biochimiques. Aussi, les substrats utilisés pour la culture cellulaire sont composés généralement de polystyrène ou de verre plat, c'est-à-dire que leurs surfaces sont extrêmement rigides comparées aux matrices des tissus vivants. Depuis cette dernière décennie, grâce à la fabrication de systèmes modèles intégrant certaines propriétés physiques de la matrice extracellulaire naturelle, des avancées importantes ont pu être réalisées notamment dans l'appréciation de la réponse cellulaire vis-à-vis de paramètres physiques. Ces connaissances permettront une meilleure conception de nouveaux biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire. Dans ce chapitre, les techniques d'évaluations des propriétés mécaniques du microenvironnement notamment l'élasticité du substrat seront évoquées. Quelques systèmes de substrats synthétiques à élasticités variables, dont les films multicouches de polyélectrolytes seront exposés. Je présenterai ensuite une notion très générale de la mécanotransduction ainsi que les principaux constituants cellulaires étudiés dans ce travail. Ces points me permettront d'aborder la première question de ma thèse : la détermination du rôle de l'élasticité du substrat sur les activités nucléaires de réplication et de transcription.

1.2 Techniques d'évaluations de la réponse cellulaire à un signal physique extracellulaire

Ce paragraphe donne un aperçu non exhaustif des techniques d'évaluations de la réponse cellulaire à un signal physique extracellulaire.

1.2.1 Forces générées par la cellule

La technique de « force / traction par microscopie » est basée sur la mesure des forces générées par la cellule pour déformer un substrat. Les mesures de déformation du substrat sont ainsi converties par modélisation en force de traction (Munevar et al., 2001). La technique de « microfabrication » de surface permet par exemple, de mesurer la force exercée par un seul contact focal, en visualisant son déplacement et celui qu'il exerce sur cette surface (Balaban et al., 2001). Par microscopie à force atomique (AFM), une sonde (cantilever) est mise en contact avec une cellule pour former des sites d'adhésions. Une déformation locale de la cellule produite par la sonde permet de mesurer les forces d'interactions entre la cellule et le cantilever et de caractériser certaines propriétés mécaniques de la cellule. C'est par cette approche que sera mesurée l'élasticité du substrat (paragraphe 1.3 Module Young et spectroscopie de force), (Saif al., 2003). La technique de pince optique (laser tweezers) permet également de mesurer la force exercée par une cellule pour se déplacer sur une surface d'élasticité variable. Des microsphères chargées, recouvertes de billes fluorescentes, vont subir l'influence du champ électrique d'un rayon laser. En se servant de cet effet, il est possible de déterminer la puissance de l'impulsion laser nécessaire pour déplacer une microsphère et ainsi quantifier des forces extracellulaire s'exerçant sur une cellule (Lo et al., 2000).

1.2.2 Application d'une force externe pour sonder la réponse cellulaire

La technique de micro-patrons adhésifs (« magnetic tweezers ») permet de quantifier la traction cellulaire. Les cellules sont déposées sur des îlots adhésifs de tailles et de formes micrométriques définies, déposés eux-mêmes sur un gel flexible contenant des microbilles fluorescentes. Des cellules adhérentes s'étalent en adoptant une forme et une taille sur les îlots. Les tractions cellulaires sont quantifiées en mesurant le champ de déplacement des microbilles fluorescentes à l'intérieur du gel (Wang et al., 2002). Ce gel élastique (avec ou sans micro-patrons adhésifs) peut être étiré (« stretchable substrates ») pour mesurer l'effet de la tension exercé par le substrat sur une réponse cellulaire donnée (Katsumi et al., 2002). Un autre paramètre mécanique intrinsèque à la cellule peut être étudié par la technique de micropipette. Il s'agit de la force d'adhésion cellulaire sur un substrat donnée. La pipette impose à la cellule une pression négative jusqu'à son détachement. Cette force de détachement permet alors de déduire la force d'adhésion cellulaire (Richert et al., 2002). Par la technique de flux (« flow »), une force mécanique d'un fluide externe, appliquée sur une cellule, permet d'étudier la réponse électrique, biochimique ou génétique à ce stimulus (Helmke et Davies, 2002).

1.2.3 Rigidité du substrat

Le paramètre « rigidité du substrat » est une propriété physique du microenvironnement très largement étudiée pour aborder la réponse cellulaire à ce signal. Les systèmes les plus couramment utilisés sont les gels d'acide polyacrilamide (PA), les matrices de polydiméthylsiloxane (PDMS) et multicouches de polyélectrolytes (PEMs). Les caractéristiques de ces substrats seront développées dans le paragraphe consacré aux substrats synthétiques à élasticités variables (paragraphe 1.4.), (Georges et Janmey, 2005). Avant de présenter ces substrats à élasticités variables, il est nécessaire de donner quelques notions sur

les propriétés mécaniques des substrats et sur la mesure par spectroscopie de force de ces paramètres.

1.3 Module de Young et spectroscopie de force

Un certain nombre d'approches expérimentales permettent de mesurer les propriétés mécaniques des matrices utilisées pour les études de culture cellulaire. L'élasticité de surface d'un échantillon, appelée module de Young E , représente sa propriété de déformation sous contraintes mécaniques (usuellement donnée en Pa). La spectroscopie de force (technique de nanoindentation par AFM) permet de mesurer l'élasticité du substrat (technique mise au point par Francius G et al. 2006, thèse 2006). Brièvement, la méthode d'indentation offre la possibilité de mesurer les propriétés mécaniques des matériaux. Cette méthode consiste à appliquer à la surface d'un matériau, des cycles de compression localisée et d'observer la réponse élastique du matériau. La transposition de cette technique à l'échelle nanométrique, la nanoindentation, permet la mesure à l'échelle locale du module de Young. Cette technique a été réalisée par un AFM configuré en mode force et nanoindentation. La sonde choisie pour la détermination des propriétés mécaniques des échantillons est une sphère colloïdale en borosilicate de plusieurs micromètres de diamètre. Des billes calibrées sont collées à l'extrémité des cantilevers (microleviers) de constante de raideur k_C . Les expériences de nanoindentations ont consisté à imposer à un échantillon une série de cycles de compression (approche-retrait). L'AFM fonctionne en mode non asservi. A l'aide de la sonde sphérique, l'échantillon est comprimé en imposant une force perpendiculaire à la surface (figure 1.2)

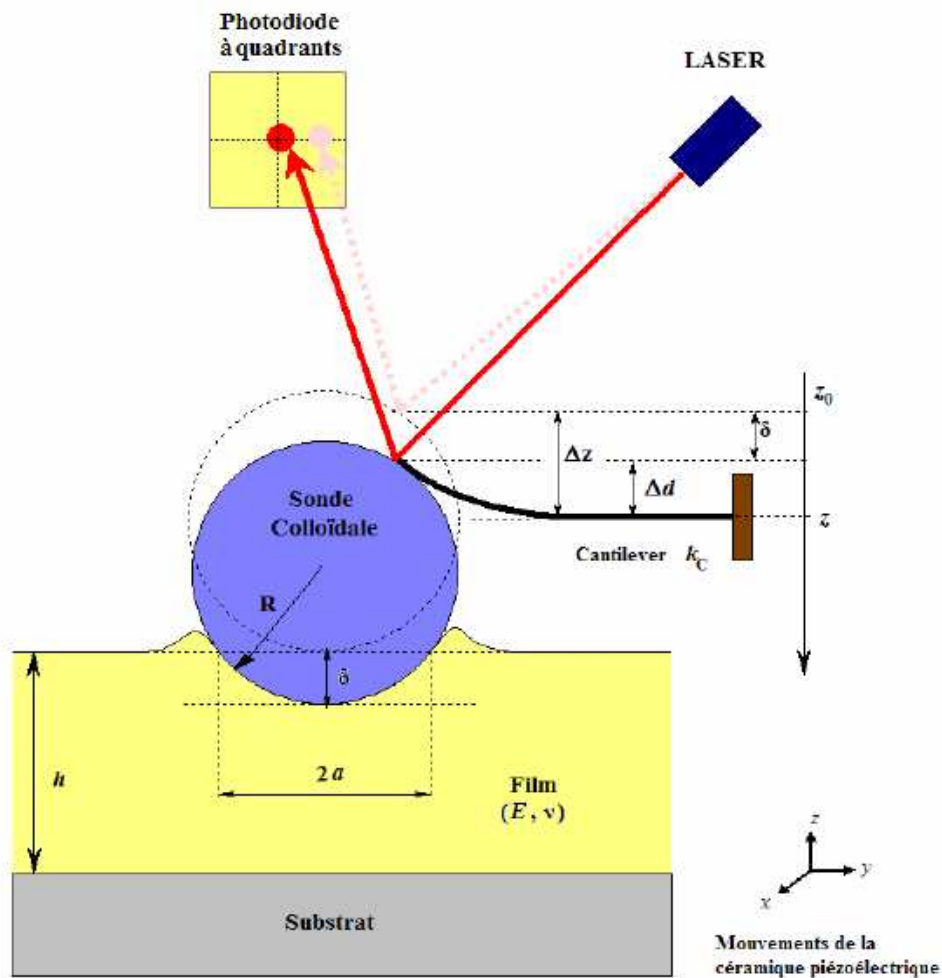


Figure 1.2. Schéma de principe de la technique de nanoindentation.

Sont enregistrés d'une part le déplacement de l'actuateur piézoélectrique et d'autre part les déplacements du cantilever. La céramique piézoélectrique est animée d'un mouvement en forme de dents de scie (figure 1.3).

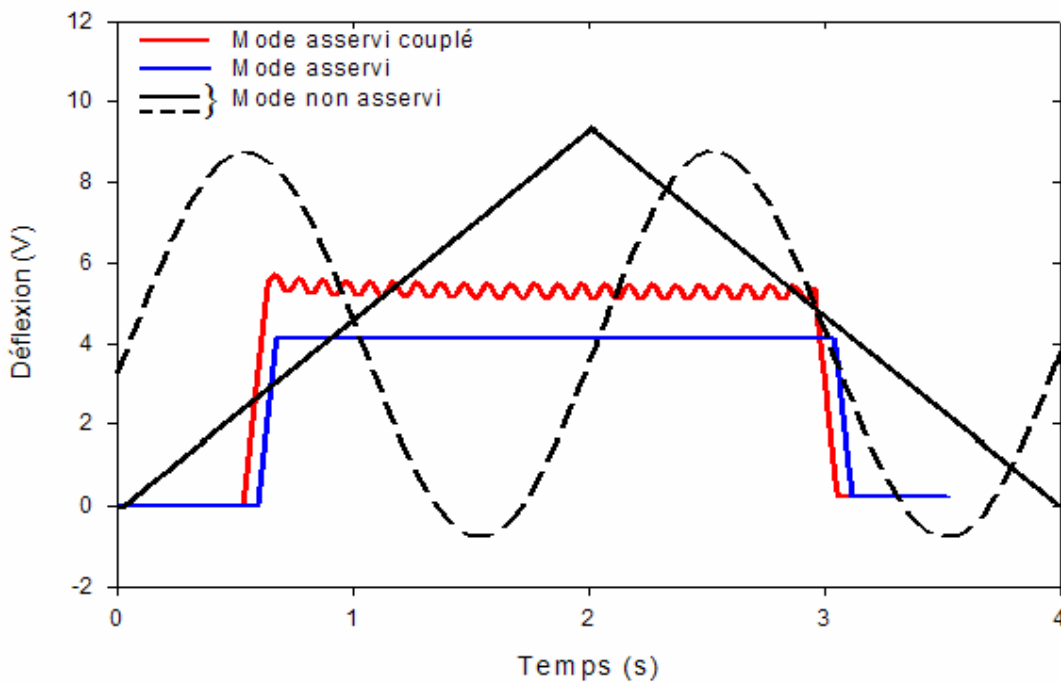


Figure 1.3. Mouvements possibles de la céramique piézoélectrique

La phase dite de « charge » correspond à la phase d'approche de la sonde. Sur l'oscillogramme, la charge correspond à la rampe montante du signal triangulaire. La décharge, quant à elle, correspond à la phase de rétraction de la sonde, et est matérialisée par la partie descendante du signal. Lorsque la course totale de la céramique piézoélectrique est fixe, toute variation de la fréquence du signal triangulaire entraîne une modification de la vitesse de la sonde. L'étude du contact élastique entre une sonde sphérique et une surface plane a été effectuée avec un AFM configuré en mode contact. La courbe de force résultante est l'expression directe du contact mécanique et de la déformation qui en résulte. Les données recueillies sont, après conversion, des tensions électriques en distances, la position du cantilever d , la position de l'échantillon porté par la céramique piézoélectrique z , en fonction du temps t . L'indentation entre la sonde et l'échantillon provoque une déviation Δd (ou déflexion) du cantilever mesurée par un faisceau laser réfléchi. L'indentation est définie par

la différence entre le déplacement de la céramique et le déplacement (déflexion) du cantilever :

$$\delta = \Delta z - \Delta d = (z - z_0) - (d - d_0)$$

La définition du point de contact et cette relation permettent d'affecter à z_0 (déplacement de la céramique) sa valeur. Enfin, la force F , qu'exerce la sonde sur le film se déduit de la déflexion, connaissant la constante de raideur k_C , du cantilever :

$$F = k_C \Delta d$$

Cette équation peut donc s'écrire :

$$F = k_C [(z - z_0) - \delta]$$

représentant ainsi la force en fonction de l'indentation. La force appliquée est elle-même fonction de l'élasticité du substrat E (ou module de Young) selon la relation :

$$E = (R\delta)/F$$

$$(R = \text{rayon de la sphère})$$

1.4 Substrats synthétiques à élasticités variables

Des substrats naturels ou synthétiques ont été conçus pour étudier *in vitro* diverses réponses cellulaires dans des contextes plus physiologiques. Par exemple des matrices extracellulaires fabriquées ou modifiées à partir de fibrine, de fibronectine, de fibrinogène, de collagène, ou un mélange connu sous le nom de Matrigel (composé de collagène, de laminine et facteur de croissances) peuvent fournir des conditions de culture proches de l'élasticité physiologique (Wells et al., 2008) (Tableau 1.1).

Les substrats synthétiques offrent quant à eux de plus grandes possibilités d'étudier la réponse cellulaire dans des conditions mécaniques mieux contrôlées. Notamment, l'élasticité du substrat est l'un des paramètres physiques très influent dans la réponse cellulaire, comme nous le verrons par la suite (chapitre 3 et 4).

1.4.1 Les membranes de silicone PDMS

Par traction, des cellules adhérentes sur des membranes minces de silicone peuvent former des rides facilement visualisables en surface (Harri et al., 1981). Des études récentes ont montré que l'élasticité de ces membranes peut être modulée en changeant le temps de chauffage au cours du processus de fabrication (Hinz et al., 2001). La force de traction des cellules, appliquée aux membranes de rigidité connue (tableau 1.1), est théoriquement mesurable d'après la longueur d'onde des rides, mais reste toutefois difficile à quantifier, du fait de la grande variabilité des forces mises en jeu et de leurs multiples directions de propagation.

1.4.2 Les gels de polyacrylamide (PA)

Les gels de PA s'avèrent être des outils de choix pour étudier une réponse cellulaire dépendante des propriétés mécaniques du substrat. Considérons l'absorption de protéines à la surface de matrices synthétiques. La géométrie, la rigidité et la chimie de surface du substrat sont déterminantes dans ces interactions. Or, les principales propriétés des gels PA sont les suivantes 1) les surfaces des gels PA sont inertes et donc très faiblement adhésives (pas d'adhésion directe en surface des gels, ni de récepteurs extracellulaires ni de protéines présentes dans le sérum), 2) les gels PA sont chimiquement stables dans des conditions de culture sur du long terme. 3) ils permettent une adhésion spécifique par greffage de façon covalente de molécules jouant le rôle de ligand pour les cellules et 4) la rigidité des gels peut être contrôlée de manière linéaire en faisant varier la fraction de bisacrylamide dimérique (agent réticulant des chaînes de PA) tout en maintenant constante la concentration en polymère (texture du gel, distribution des sites de ligand en surface inchangée et gel linéairement élastique). Les gels de PA présentent, ainsi l'avantage de séparer la contribution

« chimie de surface » perçue par les cellules, de la contribution correspondante aux signaux mécaniques (Engler et al., 2006).

Le tableau ci-dessous donne les élasticités de substrats naturels ou synthétiques :

Matériel	Origine	Élasticité E [kPa]
Polyacrylamide (PA)	Synthétiques	0.1-100
PDMS	Synthétiques	10-1000
Collagène	Naturelles	0.001-1
Fibronectine	Naturelles	0.001-1
Matrigel	Naturelles	<1
Alginate	Naturelles	0.1-150
L'acide hyaluronique (HA)	Naturelles	0.1-150

Tableau 1.1. Substrats synthétiques et naturels. Adapté de Rehfeldt et al. 2007

1.4.3 Les films multicouches de polyélectrolytes

Les films multicouches de polyélectrolytes sont d'autres systèmes de surface possédant, dans certaines conditions, les caractéristiques d'un gel dont on peut également moduler les propriétés viscoélastiques.

L'élaboration de multicouches constituées de particules colloïdales anioniques et cationiques interagissant *via* des forces électrostatiques avait déjà suscité l'intérêt de plusieurs équipes de recherches dès les années 1960 (Iler, 1966). Ce concept est cependant resté en sommeil, sans doute à cause de la compréhension encore très limitée des comportements et des

phénomènes physiques mis en jeu au sein des multicouches. Il faut également souligner les limites des techniques expérimentales des années 1960, nécessaires pour caractériser ces assemblages. L'interprétation de la construction des multicouches admettait que le dépôt de molécules de charges opposées s'arrêtait dès que les charges des espèces cationiques avaient exactement compensé celles des espèces anioniques. Il faut attendre les années 1990, avec les travaux de Decher (Decher et al. 1992), pour que la méthode d'assemblage couche par couche, appliquée en particulier à des polymères chargés, ou polyélectrolytes (Decher et al. 1992 ; Decher, 1997) soit véritablement mise en valeur. Notamment, les films multicouches de polyélectrolytes offrent une très grande diversité de constructions et de propriétés chimiques et physiques.

1.4.3.1 Principe du dépôt couche par couche

La méthode de dépôt couche par couche (LbL de l'anglais « layer by layer ») repose essentiellement sur les interactions électrostatiques entre des espèces anioniques et cationiques absorbées alternativement sur un support. Cette méthode est décrite schématiquement dans la figure (figure 1.4).

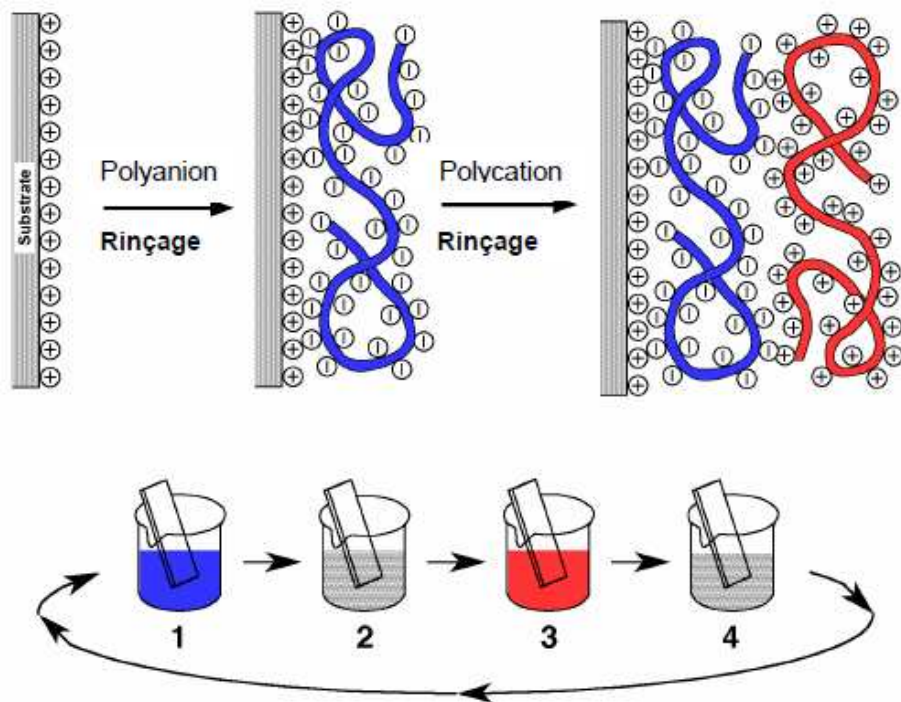


Figure 1.4. Schéma simplifié de la construction de multicouches de polyélectrolytes par répétition successive des étapes d'adsorption et de rinçage (Decher et al., 1997).

Un substrat, initialement chargé positivement, est mis au contact d'une solution de polyanions pendant un temps donné (environ 10 min). Les polyanions s'adsorbent sur la surface et les molécules non adsorbées sont éliminées à l'aide d'un rinçage. Après rinçage, la surface est chargée négativement en raison d'une surcompensation de charges négatives (Caruso et al., 1998 ; Ladam et al., 2000). Par conséquent, lorsque le substrat est mis au contact d'une solution de polycations, ceux-ci sont capables de s'adsorber sur la surface par interaction électrostatique. Cette adsorption est suivie d'une étape de rinçage à l'issue de laquelle la surface est chargée positivement en raison d'une surcompensation de charges positives. La surcompensation de charge après chaque dépôt a été mise en évidence par des mesures du potentiel zêta (Hoogeveen et al., 1996 ; Caruso et al., 1998 ; Ladam et al., 2000) et constitue la force motrice de la construction des films multicouches.

1.4.3.2 Différentes techniques de dépôt

Deux méthodes de dépôt permettent facilement de faire varier de nombreux paramètres de construction tels que 1) le nombre de couches dans l'assemblage, 2) la force ionique, ou encore 3) le pH des solutions. La méthode la plus répandue et la plus simple de dépôt est celle du procédé d'immersion en solution, appelée « dip-coating ». Elle consiste à tremper le substrat alternativement (environ 10 min) dans les solutions de polycations et de polyanions, chaque passage dans un bain de polyélectrolytes étant suivi d'un rinçage. C'est cette méthode qui a été utilisée dans ce travail de thèse. Une autre technique de dépôt a été étudiée en vue de former les films plus rapidement. Il s'agit d'un procédé par nébulisateur consistant à pulvériser les solutions de polycations et de polyanions alternativement et la solution de rinçage entre chaque couche. Des mesures par spectroscopie infrarouge, par AFM et par ellipsométrie ont montré que les films réalisés par nébulisation sont pratiquement identiques aux films construits par « dip-coating », comme pour les films poly(diallyldiméthylammonium)/poly(styrène sulfonate) (PDADMA/PSS) (Schlenoff et al., 2000). L'avantage de cette méthode par nébulisation est de réduire le temps de dépôt des solutions pour aboutir aux mêmes constructions.

1.4.3.3 Diversité de substrat

Les supports les plus couramment utilisés sont des surfaces planes ou des particules sphériques colloïdales, de nature minérale, métallique ou organique (tableau 1.2). Des surfaces élastomères comme le silicone ou poly(diméthylsiloxane) (PDMS) permettent aussi le dépôt de films multicouches. S'agissant de substrats organiques non chargés en surface, des interactions de type Van der Waals assurent probablement l'adsorption de la première couche de polyélectrolytes sur ce support.

Nature chimique	Surfaces planes	Particules sphériques
Minérale	Lame de verre (Decher 1997) Quartz (Lvov et al. 1997)	Carbonate de calcium (Sukhorukov et al. 2004)
Métallique	Titane fritté (Vautier et al. 2003) Silicium (Dubas and Schlenoff 2001)	Nanobilles d'or (Schneider and Decher 2004)
Organique	Polyéthylène (Green and Sadrameli 2004)	Microsphères de polyester (Muller et al. 2003)

Tableau 1.2. Nature des substrats utilisés pour la construction des films multicouches de polyélectrolytes.

1.4.3.4 Modes de croissance

Depuis plus d'une décade, des travaux ont montré qu'il existait deux modes de croissance très complémentaires : la croissance dite linéaire et la croissance dite exponentielle. La croissance d'un film correspond à la variation de l'épaisseur du film formé en fonction du nombre de couches déposées (figure 1.5).

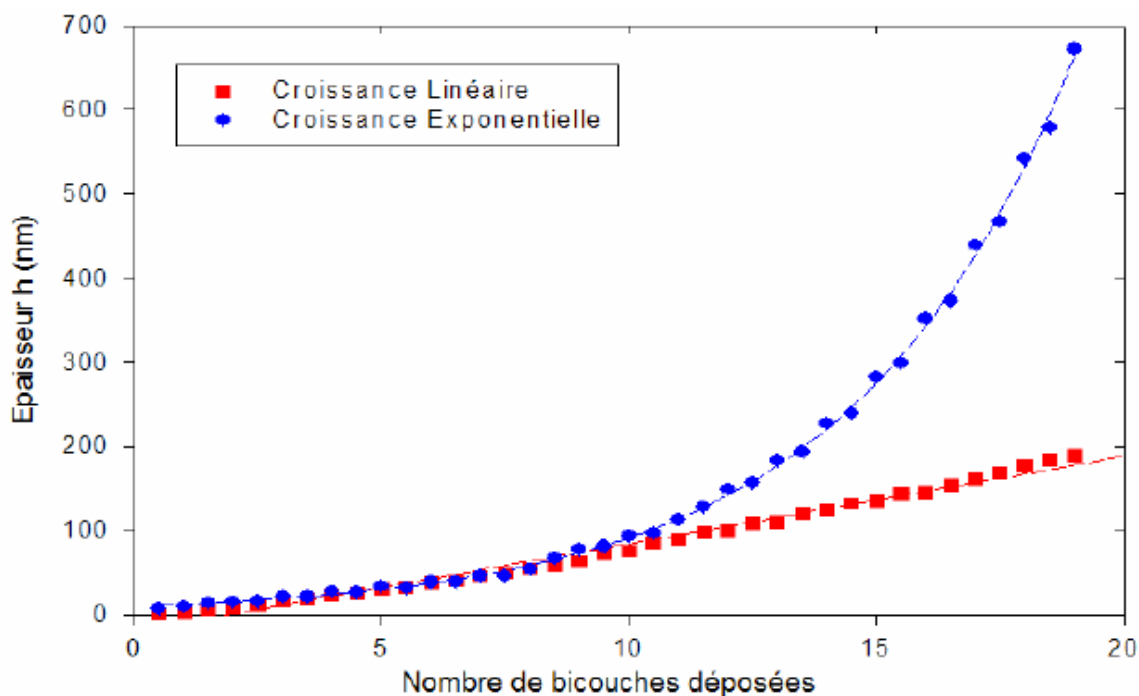


Figure 1.5. Mode de croissance des films multicouches de polyélectrolytes.

Croissance linéaire

Le film à croissance linéaire est caractérisé par une épaisseur qui augmente proportionnellement avec le nombre de couches déposé. Le système poly(allylamine)/poly(styrene sulfonate) (PAH/PSS) est l'exemple le plus largement déposé. Des analyses par réflectométrie des rayons X et réflectivité des neutrons, effectuées sur des films construits avec des polyélectrolytes deutérés, ont mis en évidence la présence d'une structure plutôt stratifiée (Decher, 1997 ; Lösche, 1997). Sur les films PAH/PSS, les couches de polyélectrolytes pénètrent uniquement les couches adjacentes constituant ainsi une structure pseudo-stratifiée avec un désordre local nommé « Fuzzy Layers » par Decher (Decher, 1997). D'autres couples de polyélectrolytes se caractérisent également par une croissance linéaire comme par exemple les films poly(allylamine)/poly(acide acrylique) (PAH/PAA) (Shiratori et Rubner, 2000) ou aussi poly(diallyldiméthylammonium) / poly(styrène sulfonate) (PDADMA/PSS) (Dubas et Schlenoff, 1999).

Croissance exponentielle

Parallèlement aux films à croissance linéaire, il existe des films dont la croissance est exponentielle avec le nombre de couches déposées. Les travaux de Picart C. et Lavalley P., portant sur les systèmes (poly(L-lysine)/poly(acide-L-glutamique)) (PLL/PGA) et (poly(L-lysine)/acide hyaluronique) (PLL/HA) (Picart et al., 2001 ; Lavalley et al., 2002 ; Picart et al., 2002) font partie des premiers travaux qui ont expliqué ce phénomène de croissance exponentielle des films multicouches. L'épaisseur de ces films peut atteindre un à plusieurs micromètres après le dépôt d'une vingtaine de paires de couches. Ces épaisseurs permettent d'utiliser la technique de microscopie confocale à balayage laser pour visualiser la section verticale des films après addition d'un polyélectrolyte fluorescent au cours de la construction du film. Ainsi, la croissance exponentielle a pu être démontrée par un phénomène de diffusion

d'au moins un des polyélectrolytes au sein de toute la section du film. Le mécanisme de construction associé à la diffusion est schématisé sur la figure 1.6 dans le cas du système PLL/HA.

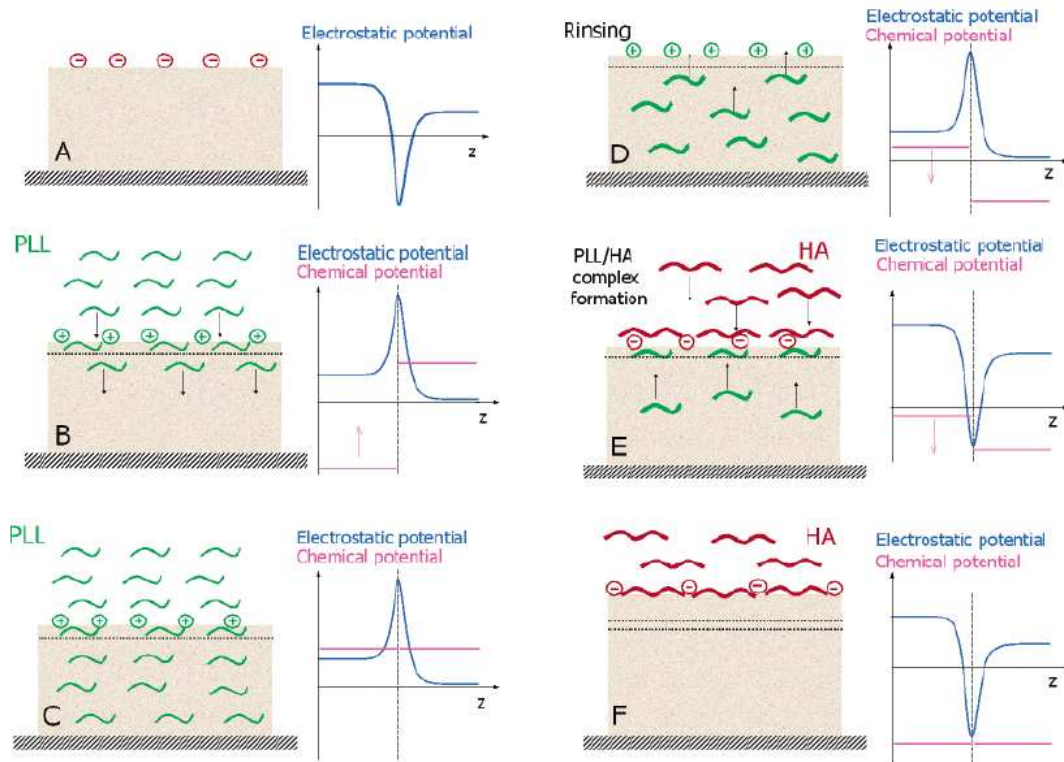


Figure 1.6. Modèle de diffusion des films à croissance exponentielle.

Le film multicouche PLL/HA, terminé par une couche de polyanions HA (A), est mis au contact de la solution de polycations PLL (B). Ces derniers vont 1) se complexer avec l'excès de charges négatives en surface, conduisant à la formation d'une nouvelle couche chargée positivement, mais également 2) diffuser à l'intérieur du film en formant un réservoir de polycations « libres » (C). Au cours de la phase de rinçage, la solution de polycations est remplacée par du tampon pur et seulement une fraction des polycations libres du film diffuse hors de la multicouche (D). La capacité du film à conserver une partie des chaînes de PLL s'explique par l'excès de charges positives à la surface du film, qui crée alors une barrière de

potentiel électrostatique empêchant la diffusion hors du film de la totalité des polycations. Quand ensuite, le film est mis au contact de la solution de polyanions, ceux-ci se complexent avec l'excès de charges positives en surface et inversent alors le signe de la barrière de potentiel qui devient négatif (E). Les polycations libres contenus auparavant dans le film diffusent vers l'extérieur sous l'effet de cette force motrice pour former de nouvelles couches. Au cours de cet unique dépôt, le phénomène se répète jusqu'à consommation du réservoir de polycations (F). La quantité des couches construites est proportionnelle à la quantité de polycations libres restant dans le film après la phase de rinçage. En première approximation, cette quantité est proportionnelle à l'épaisseur du film, ce qui amène à une croissance de type *exponentiel*.

1.4.4 Propriétés mécaniques des films multicouches

La caractérisation des propriétés mécaniques des films multicouches de polyélectrolytes est cruciale en vue du développement de surfaces adhérentes pour les cellules. Les films multicouches de polyélectrolytes subsistent à température ambiante dans divers états de la matière, ce qui leur donne des propriétés mécaniques très différentes. De nombreux films consistent en des gels viscoélastiques, c'est-à-dire des matériaux mous ayant à la fois un comportement de type fluide visqueux caractérisé par la viscosité η et un comportement de matériau solide élastique caractérisé par le module élastique E (ou module d'Young). Ainsi les films PLL/HA présentent les propriétés d'un liquide avec une forte viscosité égale à environ 0.1 poiseuille (Picart et al., 2001) et un faible module élastique de l'ordre de quelques kilopascals (Schneider et al., 2006). Les films PLL/PGA possèdent également les caractéristiques de gels viscoélastiques (Kulcsar et al., 2005). Il est possible de réaliser des films multicouches de polyélectrolytes avec une réponse purement élastique par réticulation chimique entre des chaînes de polyélectrolytes dans des films PLL/HA en

utilisant de l'éthyl-diméthylaminopropyl-carbodiimide (EDC) comme agent de réticulation en présence de N-hydroxysulfosuccinimide (NHS) jouant le rôle de catalyseur (Richert et al., 2004). D'autres films possèdent un état de la matière proche d'un état solide, tels que les films PSS/PAH (Kulcsar et al., 2005). La détermination des modules élastiques a pu être réalisée pour de nombreux films multicouches assemblés sur une surface plane ou sous la forme de capsules creuses. Ces résultats sont donnés dans le tableau suivant

Films multicouches	Module élastique (MPa)	Méthode et référence
PLL/HA Films plans	0.01	Courbes d'indentation AFM (Schneider et al. 2006)
PLL/HA réticulés avec EDC/NHS, Films Plans	0.1 - 0.5	Courbes d'indentation AFM (Schneider et al. 2006), Piezo-rhéométrie (Collin et al. 2004)
PDADMA/PSS Films Plans Capsules	10 - 100	Système d'analyse micromécanique (Jaber and Schlenoff 2006), Différence de pression osmotique sur des capsules (Gao et al. 2001)
PAH/PSS Capsules creuses	500	Déformation de capsules par AFM (Gao et al. 2001)

Tableau 1.3. Module élastiques (modules d'Young) de différents films multicouches de polyélectrolytes.

1.4.5 Quelques considérations moléculaires des propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques des films multicouches de polyélectrolytes sont directement reliées à la mobilité des chaînes de polyélectrolytes au sein du film. Les chaînes de polymères ne sont pas absolument figées par attraction électrostatique. Il existe un certain degré de mobilité dépendant de la nature de l'assemblage. De nombreux travaux se sont intéressés à la mesure des coefficients de diffusion des chaînes de polyélectrolytes pour des films multicouches à croissance linéaire ou exponentielle. Par exemple, le coefficient de

diffusion des chaînes de polymères PAH/PSS a été évalué à moins de 10^{-14} $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Kulcsar et al., 2005). Par conséquent, il a été démontré que les chaînes de polyélectrolytes ont une très faible mobilité dans les films rigides. Au contraire, pour le film à croissance exponentielle PLL/HA, le coefficient de diffusion est compris entre 10^{-8} et 10^{-10} $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Richert et al., 2004 ; Picart et al., 2005) révélant que ces films viscoélastiques ont une très forte mobilité des chaînes. Prenons à présent l'exemple du film bi-domaines qui nous concerne directement : le système $(\text{PLL}/\text{HA})_{24}-(\text{PSS}/\text{PAH})_n$.

1.4.6 Le système $(\text{PLL}/\text{HA})_{24}-(\text{PSS}/\text{PAH})_n$.

L'observation par microscopie confocale de l'architecture $(\text{PLL}/\text{HA})_{23}\text{-PLL}^{\text{FITC}}\text{-HA}-(\text{PSS}/\text{PAH})_4\text{-PSS}^{\text{rho}}\text{-PAH}$ montre que l'épaisseur du film est de l'ordre de $5 \mu\text{m}$ et révèle la présence de deux domaines au sein du film. La première strate est peu épaisse (marquage à la rhodamine en rouge) et représente une accumulation de PSS et de l'ensemble (PSS/PAH) , mais n'exclut pas la possibilité qu'une petite fraction de PSS puisse diffuser dans le film (Francius et al., 2006). La seconde strate est beaucoup plus épaisse (marquage au FITC en vert) et correspond à l'ensemble $(\text{PLL}/\text{HA})_{23}\text{-PLL}^{\text{FITC}}\text{-HA}$ (figure 1.7). Le film (PSS/PAH) déposé au-dessus du film (PLL/HA) forme une véritable barrière. Ce résultat a été précédemment démontré dans les travaux sur les réservoirs (Méndez Garca et al., 2004, Ai et al., 2003, Trau et al., 2003).

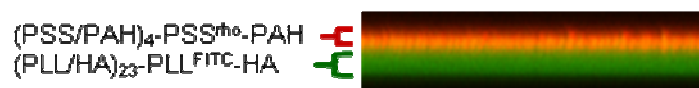


Figure 1.7. Observation par microscopie confocale d'un film bi-domaines $(\text{PLL}/\text{HA})_{23}\text{-PLL}^{\text{FITC}}(\text{PSS}/\text{PAH})_4\text{-PSS}^{\text{rho}}\text{-PAH}$, barre $5 \mu\text{m}$.

1.4.7 Elasticité du système (PLL/HA)₂₄-(PSS/PAH)_n

La détermination du module de Young des films bi-domaines (PLL/HA)₂₄-(PSS/PAH)_n-PSS a été précédemment déterminée par la technique de nanoindentation (cf. PPP, +ref gregory) pour $0 \leq n \leq 24$. Il a été mis en évidence que l'élasticité de ces films dépend du nombre de dépôts de (PSS/PAH). Le module de Young passe de quelques kPa pour $n = 0$ à quelques centaines pour $n = 24$. La rigidité des films (PLL/HA)₂₄-(PSS/PAH)_n augmente donc avec le nombre n de bicouches déposées. Elle passe ainsi de quelques kPa pour $n = 0$ à 500 kPa pour $n = 12$, couvrant ainsi la gamme d'élasticité des tissus vivants. Les architectures étudiées ainsi que leurs modules de Young correspondants sont données dans le tableau 2.4. du chapitre 2.

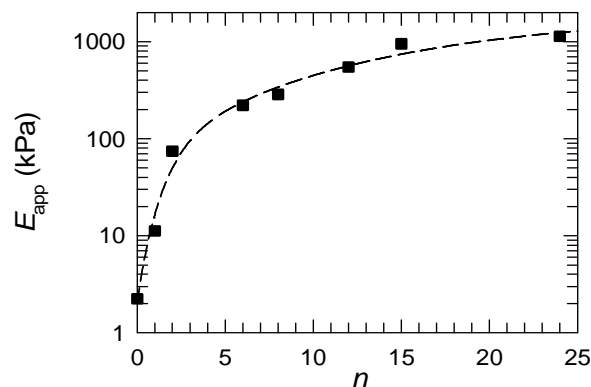


Figure 1.8. Evolution du module de Young en fonction du nombre de dépôts n sur un film (PLL/HA)₂₄-(PSS/PAH)_n.

1.4.8 Quelques perspectives d'application des multicouches de polyélectrolytes

Les multicouches de polyélectrolytes apportent un avantage conséquent lié à la modulation contrôlée de leurs propriétés physico-chimiques par ajustement de certains paramètres tels que la nature des polyélectrolytes, la force ionique, le pH. Les propriétés ainsi modulées sont l'épaisseur, la perméabilité, la rugosité, la charge de surface ou encore les

propriétés mécaniques dont le module de Young. La maîtrise de ces assemblages supramoléculaires ouvre la voie à de nombreuses applications dans le domaine biomédical.

Par exemple, des capsules à dégradation contrôlée permettent une libération progressive de médicaments. Hormis, l'aspect de libérer du médicament, les capsules à base de PGA peuvent également cibler très localement une zone spécifique. Cette double compétence des capsules biodégradables ouvre de nouvelles perspectives dans les stratégies thérapeutiques notamment dans le traitement des cancers (Ochs C. et al., 2010).

L'intérêt majeur des films multicouches de polyélectrolytes est de permettre la fonctionnalisation de supports par insertion de facteurs biologiques : protéines, peptides, ADN, médicaments... dans l'architecture au cours de la construction (Qiu et al., 2001 ; Pei et al., 2001 ; Lvov et Sukhorukov, 1997 ; Caruso et al., 1997, Jessel et al., 2003, Boudou et al., 2010). La fonctionnalisation des PEMs par certains peptides (type RGD) permet l'amélioration de l'adhésion cellulaire. Cette stratégie a été mise en pratique notamment dans le domaine de l'implantologie dentaire et plus particulièrement dans l'amélioration de l'adhésion cellulaire au niveau des tissus mous. L'adhésion des cellules épithéliales de l'épithélium gingival est améliorée grâce à un peptide d'adhésion spécifique dérivé de la laminine-5 (molécule cruciale pour l'attache des cellules épithéliales sur les substrats dentaires ou implantaires) greffé sur la surface en titane de l'implant par l'intermédiaire de films multicouches de polyélectrolytes (Werner et al., 2009). Un important projet en cours concerne un problème clinique bien précis : la conception d'une prothèse laryngée. Le support consiste en un assemblage de billes de titanes poreux non alliées en substitution du cartilage trachéal. Les PEMs sont dans cette approche un outil dans la lutte contre l'inflammation induite lors de la mise en place de l'implant trachéal. Ainsi, Il a été possible de conférer aux prothèses une propriété anti-inflammatoire par l'action d'un peptide anti-inflammatoire, l' α -

MSH (l' α -Melanocyte-Stimulating-Hormone) adsorbé en surface via des multicouches de polyélectrolyte (Schultz et al., 2005).

1.5 La mécanotransduction

1.5.1 Définition

La cellule utilise la matrice extracellulaire et les cellules voisines comme principaux signaux environnementaux pour établir et maintenir sa morphologie. Par conséquent, la cellule doit décrypter ou sentir les messages physiques contenus dans ces éléments pour répondre de manière appropriée aux fonctions cellulaires pour lesquelles elle est programmée. Cette étape de reconnaissance est nommée « mechanosensing, (étape mécanosensorielle) ». Ces signaux physiques sont généralement des forces ou des géométries de surfaces, variant de l'échelle nanométrique à micrométrique, perçues localement par les cellules. Ces forces physiques appliquées aux surfaces cellulaires, par exemple la compliance exercée par la matrice peut produire une déformation de la membrane cellulaire qui se dissipe rapidement dans le cytoplasme. La conversion de ces forces physiques extracellulaires en signaux cellulaires représente l'étape appelée mécanotransduction intervenant aux sites mêmes de déformations membranaires. Les intégrines et cadhérines, qui contrôlent respectivement l'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire et aux cellules voisines, ont un rôle majeur dans ces mécanismes de mécanotransduction (Wang et al., 2009). Ces signaux peuvent ensuite se propager sur de longues distances du cytosquelette d'actine (Vogel et Sheetz, 2006) aux protéines qui lui sont liées (taline, paxilline, vinculine...), puis activer diverses molécules effectrices (Wang et al., 1998) et voies de signalisations intracellulaires (FAKinase, ERK, Wozniak et al., 2003). Finalement, les cellules intègrent ces multiples signaux biochimiques provenant des phénomènes « mécanosensoriels » et de « mécanotransduction », par une réponse cellulaire adaptée. C'est l'étape de « mécanoréponse » qui permet la régulation de

nombreuses fonctions cellulaires telles que des changements morphologiques, la croissance, la différenciation et la mort cellulaire. Ces trois étapes constituent un cycle d'évènements cellulaires complexes dont les voies de signalisation sont continuellement en intersection dans le temps et dans l'espace.

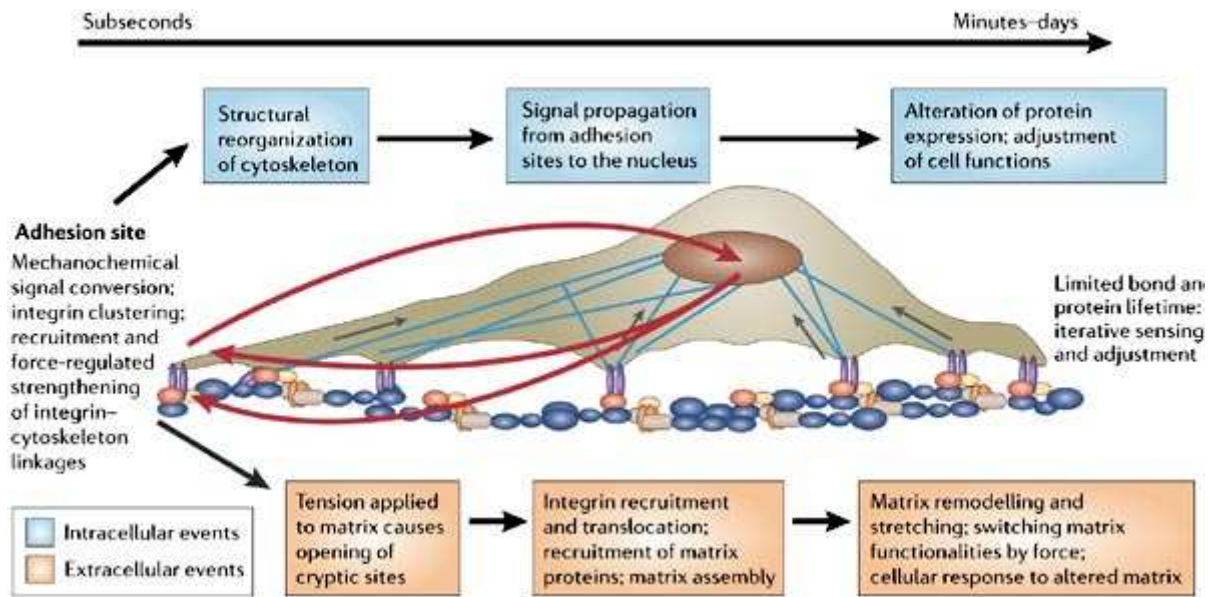


Figure 1.9. Schéma des différentes étapes de la « mécano-sensation » à la « mécano-réponse » de la cellule. Initialement, les cellules sondent les caractéristiques mécaniques de leur environnement. Une transmission rapide des signaux induit se met en place et a pour conséquence un changement morphologique de la cellule et une activation de réponses intracellulaires. Adapté de Vogel et Sheetz, 2006.

La réponse cellulaire dépend de l'intervalle de temps durant lequel se déroule le signal mécanique. Pour une réponse précoce, la cellule est sollicitée pendant un temps court de la seconde à la minute. Cette échelle de temps est suffisante pour la polymérisation-dépolymérisation du cytosquelette d'actine ou encore la libération de la vinculine de ses sites d'adhésion (Vallotton et al., 2004). Pour des temps longs, par exemple une culture cellulaire sur plusieurs jours, les cellules peuvent intégrer jusqu'à 100 à 1000 cycles de stimulus-réponse.

1.5.2. Quelques considérations sur la mécanotransduction

Perception de la géométrie

La perception de la géométrie, au niveau subcellulaire, est un paramètre qui ne fait pas directement intervenir des propriétés d'élasticité du substrat, mais plutôt des propriétés de forme du substrat. Ce paramètre s'avère crucial dans l'étape « mécanosensorielle ». Par exemple, la réponse cellulaire sera différente pour une même matrice protéique organisée soit en filament tridimensionnel, soit distribuée uniformément sur une surface bidimensionnelle (Cukierman et al., 2001). La géométrie de la matrice peut imposer à la cellule une morphologie particulière. Par exemple, la courbure d'une membrane pourra épouser localement la courbure d'une fibre. Des protéines cytoplasmiques d'adhésion se positionneront conformément à cette courbure impliquant alors de possibles réarrangements des complexes d'adhésions. Ainsi, des fibroblastes se déplacent sur des fibres de collagène grâce à un processus migratoire qui implique une isoforme de la myosine (Meshel et al., 2005). Parmi les molécules les plus souvent impliquées dans les phénomènes de « transduction géométrique » on peut nommer les « guanine nucleotide-exchange factors », les canaux ioniques Ca^{2+} , les récepteurs de tyrosine phosphatases, les kinases de la famille de Src et récepteurs membranaires (von Wichert et al., 2003). Dans certaines conditions, une courbure concave de la membrane induit une libération locale de la GTPase Rac1, pouvant ainsi interagir avec une kinase (integrin-linked kinase, ILK) et conduire à une augmentation localisée des forces de traction (Boulter et al., 2006)

Exposition de sites cryptiques

La caractérisation de propriétés mécaniques de certaines protéines a révélé que pour une molécule unique, existe une diversité de motifs structuraux. Pour une gamme de force donnée, ces motifs sont capables de changements de conformations leur conférant ainsi des propriétés mécanosensorielles. De tels mécanismes ont été décrits pour 1) l'exposition de peptide cryptique induit par une force mécanique (Vogel et Sheetz, 2006), 2) l'ouverture d'un canal ionique ou encore 3) le déclenchement, sous étirement, d'interactions récepteur-ligand. La fibronectine (protéine d'adhésion cellulaire abondante dans le sérum et dans beaucoup de matrices extracellulaires) établie un lien physique entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette, via sa séquence RGD reconnue des intégrines. La contractilité cellulaire permet le dépliage partiel de la fibronectine en matrice fibreuse, rendant alors accessible ses sites cryptiques normalement enfouis dans ses modules en conformation repliée (Vogel, 2006 ; Pankav et Yamada, 2002). Les protéines cytoplasmiques vinculine (Bakolitsa et al., 2004 ; Johnson et Craig, 1994) et Src (Harrison, 2003) sont activées de manière allostérique par leurs récepteurs (liaison ou démasquage de site) permettant l'ouverture de conformations auto-inhibées.

Transduction d'une force

Comment une force peut-elle induire une « mécanoréponse » ? Considérons la liaison d'un ligand externe avec une cellule. Cet événement peut être à l'origine de l'assemblage de deux complexes différents dans la cellule. Premier cas : Le ligand externe est en liaison directe avec le cytoplasme. La « mécanoréponse » va dépendre directement de la force s'exerçant sur le ligand. Le complexe peut subir un déplacement par la traction exercée par les filaments d'actine en mouvement. Dans ce cas, lorsque le cytosquelette tire sur le ligand, lui-même en contact avec l'extérieur (pendant une période de temps et avec des conditions

isométriques données), la rigidité du ligand déterminera 1) la distance d'élongation maximum que pourront atteindre le cytoplasme et les complexes protéiques qui lui sont associés, 2) si cette force est suffisante pour activer d'autres facteurs sensoriels, par exemple en exposant des peptides à séquences cryptiques. Deuxième cas : la force s'exerce sur un site extracellulaire non relié au cytoplasme. Le site extracellulaire restera stationnaire ou figé lorsque les filaments d'actine seront en mouvement. Pour ce ligand non lié à des constituants cytoplasmiques, si son substrat est trop mou, la distance qui le séparera d'éventuels facteurs sensoriels sera trop importante pour permettre une interaction avec eux.

1.6 Principaux constituants cellulaires abordés dans ce travail de thèse

L'adhésion cellulaire, « véritable sonde de l'environnement mécanique » est un processus essentiel pour la survie et la prolifération cellulaire. Elle se matérialise par des plaques d'ancrage constituées de nombreuses protéines dont le rôle est d'établir un lien physique entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine de la cellule. Les intégrines sont les protéines transmembranaires qui permettent la liaison physique avec la matrice extracellulaire.

1.6.1 Les intégrines

Les intégrines sont des protéines appelées récepteurs transmembranaires constituées de deux sous-unités α et β . La variabilité de ces deux sous-unités et leur combinaison induisent une spécificité de l'intégrine dans sa liaison avec son ligand. Jusqu'à présent, il a été identifié 18 sous-unités α et 8 sous-unités β (figure 1.10) dont la combinaison aboutit à 24 couples d'hétérodimères $\alpha\beta$ (Hynes, 2002).

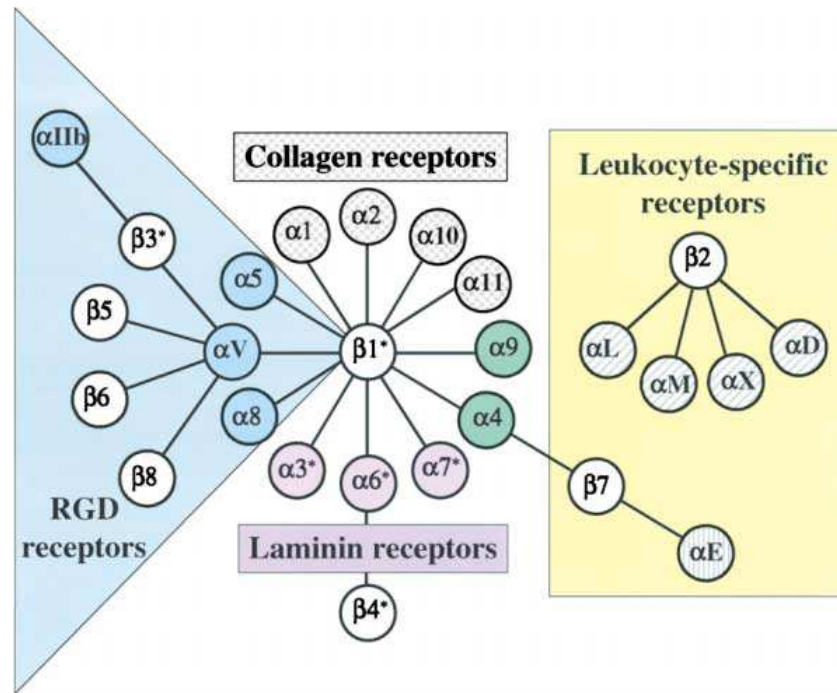


Figure 1.10. Integrin receptor family. Adaptée de Hynes., 2002.

L'intégrine comprend 3 domaines, un large domaine extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire. La partie externe de l'intégrine se lie avec des composants de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine, laminine...), l'autre extrémité interagit avec les constituants intracellulaires. Cette double interaction de l'intégrine lui confère un rôle très important dans la transmission des signaux externes *via* les composants des complexes d'adhésion focale, signaux qui sont relayés jusqu'au noyau de la cellule. Les intégrines ont un rôle dans l'intégrité et la stabilité de l'adhésion, la migration et la division cellulaire (Vicente-Manzanares et al., 2009 ; Delon et Brown, 2007 ; Mettouchi et al., 2001). Les intégrines sont les premières protéines impliquées dans la mécanotransduction du signal issu de l'environnement extérieur de la cellule. La liaison des ligands au niveau de la partie extracellulaire des intégrines entraînent une agglomération de ces dernières suite à un changement conformationnel et plus précisément par la modification des interactions entre les chaînes cytoplasmiques α et β . Les intégrines ne possédant pas d'activité catalytique intrinsèque, c'est l'interaction avec le ligand puis l'agglomération des intégrines qui sont à

l'origine des signaux intracellulaire tels que la liaison avec le cytosquelette d'actines (figure 1.11), la phosphorylation des protéines sur des tyrosines ou encore l'activation des GTPases... Les intégrines sont également les premiers constituants de la cellule à faire face aux différentes forces physiques extracellulaires. Elles ont par conséquent un rôle central dans le processus de mécanotransduction.

1.6.2 Points focaux d'adhésion

Les intégrines jouent un rôle essentiel dans la liaison de la matrice extracellulaire et le cytosquelette de la cellule. Elles ont, comme il a été dit précédemment, un rôle dans le maintien du cytosquelette et notamment dans la liaison avec le complexe protéique d'adhésion focale. Ce complexe est composé de nombreuses protéines telles que la paxiline, la taline, l' α -actinine ou encore la vinculine.

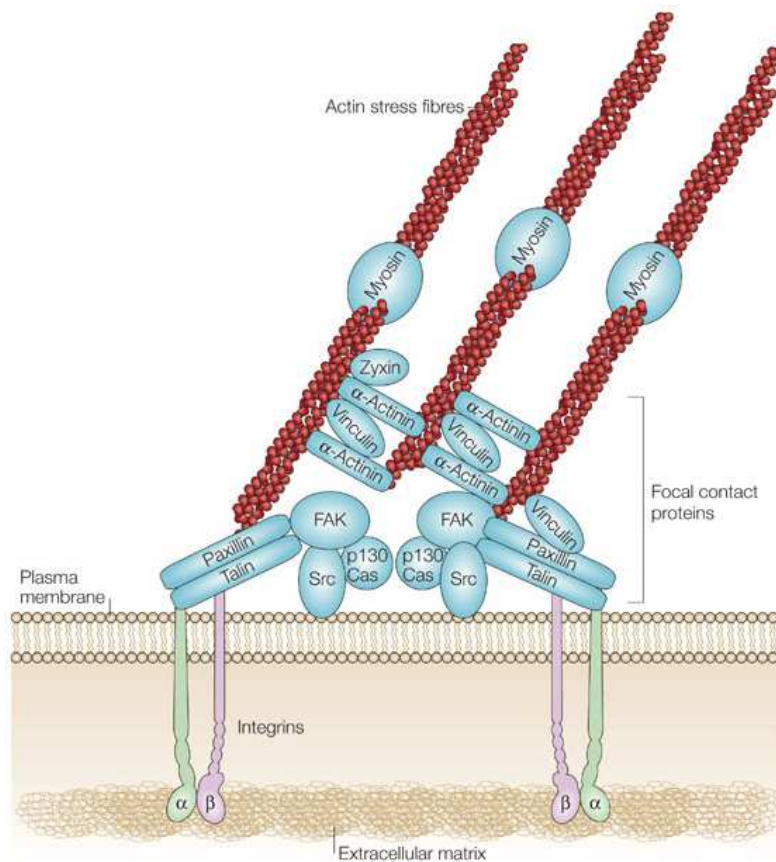


Figure 1.11. Architecture moléculaire (non exhaustive) d'un point d'adhésion. L'engagement des intégrines à la MEC active des protéines de structures et des protéines de signalisation. D'après Mitra et al 2006.

La paxilline

La paxilline est une protéine hautement phosphorylée de 68 kDa. Elle appartient à une superfamille de protéines adaptatrices. Elle a un rôle primordial dans l'adhésion focale car elle y tient à la fois le rôle de protéines de structures et de protéines adaptatrices. L'analyse de la structure primaire de la paxilline révèle la présence de 5 motifs LD en position amino-terminale de la protéine et de 4 domaines LIM en position carboxy-terminale. Notons également la présence de très nombreux résidus tyrosine phosphorylables (Brown et Turner, 2004). Les motifs LD, riches en leucine permettent le recrutement à la fois de protéines structurales telles que la taline ou la vinculine et de protéines de signalisation telles que la FAK ou Src. Les domaines LIM ont une structure en motifs en doigts de zinc organisés en tandem. Ces domaines contiennent notamment des résidus sérine et thréonine dont la phosphorylation régule la localisation de la paxilline au niveau des adhérences focales ayant ainsi un rôle d'adressage de la paxilline au niveau de ces sites d'adhésion.

La taline

La taline est une protéine à haut poids moléculaire de 270 kDa. Elle a une forme allongée d'environ 60 nm. Elle comprend une tête globulaire d'environ 47 kDa contenant un domaine FERM (Ezrine, Radixine, Moésine) divisé en trois parties (F1, F2, F3) au niveau de la partie N-terminale ainsi que d'un domaine nommé F0, le domaine F3 est impliqué dans la liaison avec les sous-unités β intégrines. La partie C-terminale représente la queue de la protéine, elle fait environ 220 kDa et contient de multiples sites de liaison notamment celle concernant l'actine et la vinculine (Roberts et Critchley, 2009). Cette partie peut également avoir des sites de liaison pour les intégrines. Le domaine FERM est masqué dans la taline intègre, et est libéré suite au clivage par les calpaïnes ubiquitaires ce qui permet la liaison avec les intégrines et la mise en place des FAs (Yan et al. 2001)

La vinculine

La vinculine est une protéine à la fois membranaire et cytosqueletique de 116 kDa ayant un rôle majeur dans les points de contacts focaux et leurs régulations. Elle comprend deux domaines globulaires reliés par une séquence courte et riche en prolines. L'interaction intramoléculaire de ces domaines entraîne un repliement de la vinculine qui masque les sites de liaison de la taline et de l' α -actinine. L'action du PIP2 (phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate) empêche ce repliement et libère ainsi les sites de liaisons de la taline et de l' α -actinine initiant ainsi la mise en place des points de contacts focaux (Saunders et al., 2006).

Les complexes d'adhésions focaux sont impliqués dans la liaison avec les intégrines et par conséquent sont également un passage obligé du relai du signal issu de l'environnement extérieur. L'adhésion focale constitue également une sonde de l'environnement mécanique. Sa mise en place ou son absence indique l'état favorable ou non de l'environnement cellulaire. Sa déstabilisation entraîne des conséquences au niveau des fonctions cellulaires, telles que le désassemblage des points focaux qui fragilise considérablement l'adhérence cellulaire et peut aboutir à des phénomènes de mort cellulaire. Le maintien du complexe d'adhésion focal assure également l'intégrité du cytosquelette de la cellule composé entre autre par des filaments d'actines.

1.6.3 Les protéines de signalisation FAK

Les contacts focaux comprennent des protéines de structures mais également des protéines de signalisation. Parmi elles, nous pouvons citer les tyrosines kinases telles que FAK (Focal Adhesion Kinase), Src (Rous sarcoma virus), les tyrosines phosphatase ou encore les sérines/thréonine kinases telles que ILKs (Integrin Linked Kinases) ainsi que les protéases telles que les calpaïnes. Les FAs sont les sites les plus importants de phosphorylation sur tyrosine de la cellule. L'ensemble de ces protéines intervient dans la mise en place et la

régulation des FAs ainsi que dans la signalisation intégrine dépendante. Parmi elles, FAK, protéine majeure du cytoplasme, tient à la fois un rôle catalytique et un rôle adaptateur au niveau notamment de l'interaction d'une part avec la taline et le complexe de nucléation de l'actine Arp2/3 d'autre part (Vicente-Manzanares et al., 2009). FAK est au carrefour des voies de signalisation impliquant la survie, la prolifération et la migration cellulaire. Elle contient plusieurs domaines fonctionnels avec un domaine kinase central flanqué d'un large domaine N-terminal et C-terminal. Le domaine N-terminal contient des sites riches en prolines impliqués dans la liaison avec les domaines SH3 de la famille Src.

Le domaine kinase porte l'activité catalytique. La Tyr 397 de la FAK tient un rôle capital dans l'initiation de l'activité de la FAK, la phosphorylation de ce site indique l'augmentation de l'activité de FAK. Suite à l'agrégation des intégrines le site d'auto-phosphorylation Tyr 397 est activé et entraîne la phosphorylation et le recrutement d'autres protéines associées telles que Src. La phosphorylation de Tyr 397 semble essentielle dans le turnover des FAs car sa délétion perturbe ce turnover ainsi que la migration cellulaire (Hamadi et al., 2005). FAK est également impliquée dans l'activation des voies de signalisation Ras / MAP-kinases.

1.6.4 La voie des MAP-kinases

Les MAP kinases ont un rôle très important dans les processus physiologiques. Ces enzymes sont activées par une cascade de phosphorylations. Les MAP kinases sont composées de trois sous familles, les ERK (Extracellular Signal-Regulated Kinases), les JNK (c-Jun NH₂-terminal Kinases) et les p38 kinases. ERK 1 et ERK 2 sont largement exprimés et connus pour leurs implications dans de nombreuses régulations cellulaires telles que la migration cellulaire. (Johnson et Lapadat, 2002).

1.6.5 Le cytosquelette de la cellule : cas des filaments d'actines

Les filaments d'actines sont composés d'homopolymères d'actines de 42 kDa. Ils représentent les éléments dynamiques du cytosquelette de la cellule qui comprend également les filaments intermédiaires et les microtubules. Les filaments d'actine confèrent par leur structure une dynamique à la cellule. A travers les points de contacts focaux, ils sont reliés physiquement aux intégrines ce qui permet la traction des cellules lors de la migration (Vicente-Manzanares et al. 2009). La régulation des interactions des filaments d'actine avec les points de contacts focaux ont un rôle majeur dans la migration cellulaire. L'organisation de l'actine est essentielle pour la régulation de la machinerie adhésive de la cellule. Les cellules qui ont un réseau de filaments d'actines peu dense telles que les leucocytes ont généralement à la fois peu de points d'adhérence et ces points d'ancrage restent peu robustes. Le lien physique entre le cytosquelette d'actine et la matrice extracellulaire est primordial pour l'intégrité et la stabilité de l'adhésion.

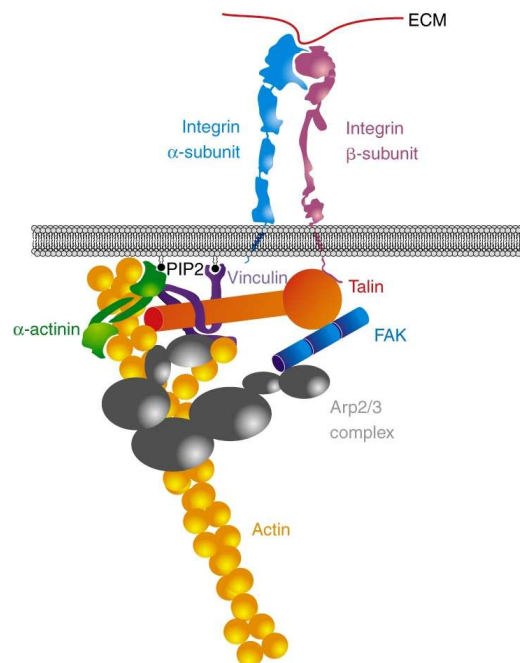


Figure 1.12. Lien actine-intégrine L'intégrine peut se lier directement au domaine de la tête globulaire de la de taline. La queue de la taline peut interagir directement avec l'actine, tout comme avec d'autres composants du point d'adhérence, comme la vinculine. La vinculine est capable également de se lier avec l'actine à travers l' α -actinine. L'activité de la vinculine et de l' α -actinine est modulée par PIP2 à la condition de leurs ancrages à la membrane. Finalement, la vinculine et la FAK lient également le nucléateur de l'actine, Arp2/3 et influence directement la formation du cytosquelette d'actine. D'après Vicente-Manzanares M et al., 2009.

1.7 Activités nucléaires

1.7.1 La Réplication chez les eucaryotes

La réplication du matériel génétique est un processus hautement contrôlé car elle assure le maintien de l'intégrité du génome. L'ADN survient au cours de la phase S du cycle cellulaire. La vitesse de réplication chez les eucaryotes est de 50 nucléotides par seconde dans les deux directions. On divise la réplication en trois étapes, l'initiation, l'élongation et la terminaison. L'initiation de la réplication se passe par l'activation des origines de réplication (ORs). Les eucaryotes contiennent de multiples ORs (chez l'homme il existe environ 20 000 ORs réparties le long de la molécule d'ADN). Les ORs sont activées en début, en cours et en fin de phase S. Cette étape aboutit à la dissociation de la double hélice d'ADN suite à la rupture des liaisons hydrogènes, catalysée par des hélicases. Les segments monocaténares sont ensuite stabilisés par des RP-A (Replication Protein-A) ou SSB (Single Strand Binding) chez les procaryotes, afin d'éviter la reformation de la double hélice d'ADN.

La fourche de réplication formée, l'élongation ou la synthèse de l'ADN peut débuter. Le réplisome se forme lors de cette phase. Il s'agit d'un complexe protéique composé de cinq types de protéines différentes, l'hélicase, deux ADN polymérases répliquatives, chacune sur un brin en cours de synthèse, une primase synthétisant les amorces ARN des fragments d'Okazaki, deux anneaux protéiques glissant (clamp ou PCNA, Proliferating cell nuclear antigen) augmentant la processivité des ADN et un chargeur de clamp. L'élongation des deux brins d'ADN se fait simultanément. Toutefois l'allongement de la chaîne polynucléotidique se fait uniquement dans le sens 5'-3'. Le brin de polarité 3'-5' est par conséquent répliqué par une chaîne continue (brin direct ou brin précoce) tandis que le brin 5'-3' sera répliqué de manière discontinue (brin indirect ou retardé), par de petits fragments (100 à 200 nucléotides) nommés fragments d'Okazaki. De nombreuses protéines s'associent au réplisome telles que

les RP-A les nucléases chargées de dégrader les amorces d'ARN des fragments d'Okazaki ou bien l'ADN ligase qui relie ces derniers (figure 1.13).

La terminaison de la réplication a lieu au moment où la fourche de réplication rencontre un signal de terminaison ou une autre fourche de réplication.

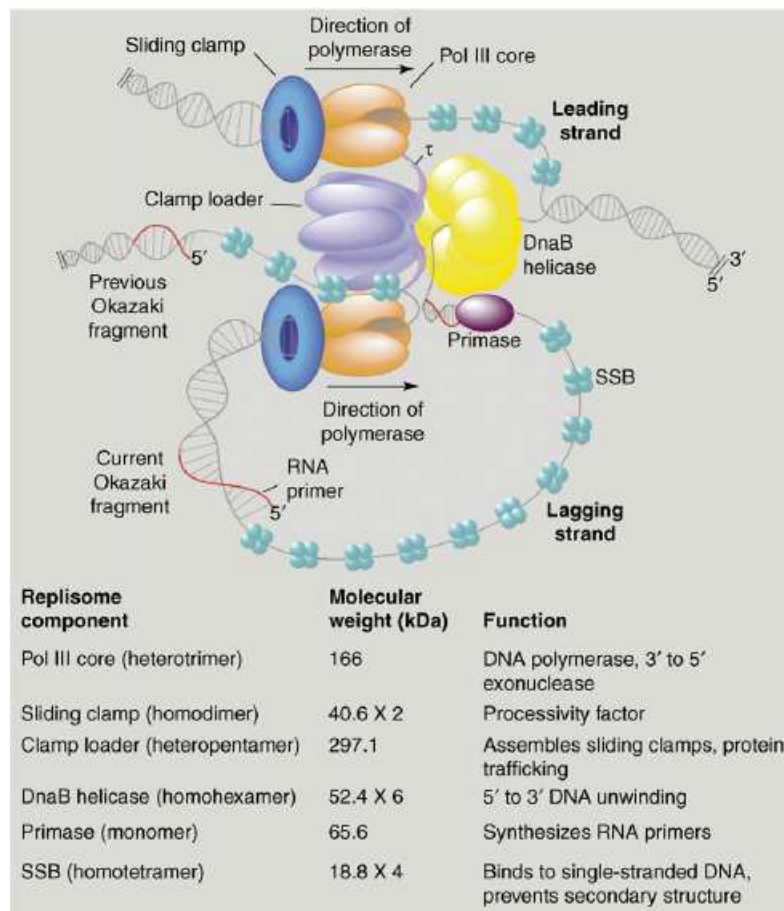


Figure 1.13. Organisation de l'Escherichia coli réplisome. Le réplisome d'E. coli utilise deux principales enzymes Pol III pour copier le brin précoce et le brin retardé. Les anneaux glissants confèrent la processivité au cœur de la Pol III en attachant la polymérase à l'ADN. Le chargeur d'attache des anneaux fournit l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour lier les anneaux glissants sur l'ADN aux sites prêts. Le chargeur d'attache se lie aux deux polymérases ainsi qu'à l'hélicase. L'hélicase déroule l'ADN double brins en amont de la fourche de replication et stimule l'activité primase. La Primase synthétise des petits fragments élémentaires d'A.R.N. Les protéines SSBs empêchent la reformation de la double hélice d'ADN. D'après Pomerantz R. et O'Donnell M. 2007.

La fidélité de la réplication est haute, de nombreux points de contrôle sont érigés afin de maintenir l'intégrité du génome. L'ADN polymérase possède une activité exonucléasique

3'-5' mise à contribution lors des erreurs de copies. Les erreurs de réplication persistantes sont corrigées majoritairement par le système de mésappariements (MR pour mismatch repair). La fidélité de réplication est ainsi de $1/10^9$.

1.7.2 La transcription chez les eucaryotes

La transcription est un processus biologique ubiquitaire qui se déroule dans le noyau. Au cours de cette étape les régions dites codantes de l'ADN sont copiées en molécules d'ARN. Après modifications post-transcriptionnelles, les molécules d'ARN messagers seront transportées dans le cytoplasme puis reconnues par les acteurs de la traduction et seront ainsi exprimées en séquences protéiques. La transcription est scindée en trois étapes, l'initiation, l'élongation et la maturation (l'épissage).

L'initiation de la transcription a lieu au niveau de séquences promotrices du gène plus connus sous le nom de TATA box, la boîte GC ou encore la boîte CCAAT. Ces sites d'initiations recrutent, *via* des composants intermédiaires (TBP, TATA box binding protein) des facteurs de transcription tels que TFII (Transcription Factor pour l'ARN polymérase II) qui s'associeront à l'ARN polymérase II, formant ainsi le complexe d'initiation. L'ARN Pol II ouvre cette région de l'ADN. L'ADN monobrin sert alors de matrice pour l'appariement des ribonucléotides. De nombreux autres facteurs de transcription viennent s'associer à ce complexe qui sans l'intervention de facteurs de transcription, initie la transcription à un taux faible. Parmi les facteurs de transcription, nous pouvons citer les cis-activateurs (les enhancers (en amont de la TATA box) et les trans-activateurs qui vont se fixer sur les autres types de boîtes d'initiation, par exemple Sp1 (Small protein 1) active la boîte GC, (figure 1.14). L'initiation est également sous l'influence de co-facteurs de la transcription, ayant un rôle régulateur, aussi bien dans l'activation de l'initiation (CRSP, co-factor required for Sp1 activation) ou dans la répression (ARC, activator regulated co-factor). L'initiation de la

transcription implique également un remodelage de la chromatine faisant intervenir une série de molécules (SWI/SNF, PBAF...) permettant l'accès à l'ADN des différents acteurs de la machinerie transcriptionnelle.

L'élongation de la transcription nécessite la phosphorylation du domaine CTD (Carboxy Terminal Domain) de l'ARN Pol II ce qui a pour conséquence le déplacement de l'ARN Pol II. L'élongation se déroule dans le sens 3'-5' du brin matrice, le transcrit primaire se fait dans le sens 5'-3'. Les ARNs synthétisés sont très hétérogènes, il s'agit des ARN nucléaires hétérogènes (ARNnh). Au cours de leur synthèse les précurseurs des ARN messagers subissent des modifications au niveau de leurs extrémités 5' et 3'. L'extrémité 5' du transcrit en cours de synthèse est coiffée par l'addition d'un nucléotide guanine méthylé. Ce processus a lieu très tôt et protège le transcrit en cours de synthèse d'une dégradation par les nucléases. L'extrémité 3' de la majorité des transcrits de l'ARN Pol II, est définie non pas par la fin de la transcription, mais par une seconde modification qui coupe le transcrit en croissance au niveau d'un site spécifique et une autre polymérase ajoute une séquence poly-A à l'extrémité 3' coupée. La queue poly-A joue de nombreux rôles : protection de l'extrémité 3' du transcrit et transport nucléo-cytoplasmique de l'ARNm.

La maturation ou l'épissage est l'étape essentielle pour les ARN messagers précurseurs. Il s'agit de la modification post-transcriptionnelle en charge d'éliminer les séquences transcrites correspondant aux parties non codantes de l'ADN, les introns. Le spliceosome composé de divers petites protéines ribonucléoprotéiques nucléaires, snRNP (small nuclear ribonucleoprotein), est l'acteur principal de l'épissage, il reconnaît spécifiquement les introns avant de les éliminer. Ce processus permet la maturation des précurseurs des ARN messagers, indispensable pour l'étape d'export nucléaire puis de traduction effectuée dans le cytoplasme.

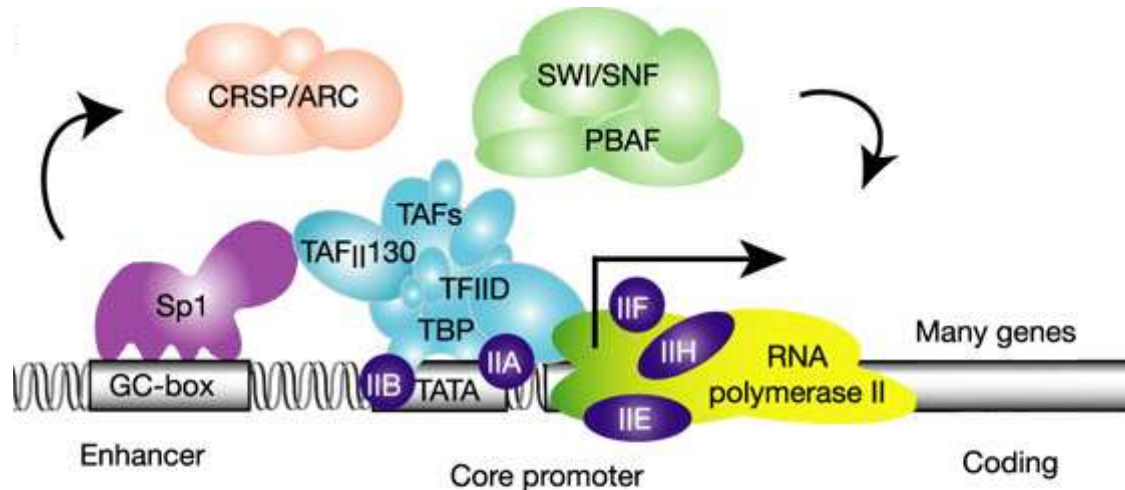


Figure 1.14. Le complexe d'initiation de la transcription chez les eucaryotes. La machinerie transcriptionnelle peut être subdivisée en trois groupes, celui qui inclut l'ARN polymérase II et les facteurs de transcription associés (TFIIA, -B, -D, -E, -F et -H), le groupe des co-facteurs (CRSP, ARC...) et les acteurs des modifications de la chromatine (SWI/SNF, PBAF...). D'après Levine et Tjian, 2003.

1.7.3 Relation fonctionnelle entre la réplication et la transcription

Les deux paragraphes précédents décrivent de manière très synthétique la réplication et la transcription. Dans ce paragraphe suivant, nous allons brièvement exposer les relations fonctionnelles qui existent entre ces deux activités nucléaires fondamentales. Le cycle de la réplication se déroule de la manière suivante. L'initiation de la réplication commence en fin de phase G1 et début de phase S (G1/S et ES pour « early S phase »). Les sites de réplication, environ 150 sites, sont localisés uniformément dans tout le noyau. En milieu (MS) et fin de phase S (LS, pour « late S phase ») les sites de réplication se concentrent autour du nucléole et à la périphérie nucléaire. Cette étape correspond à la réplication tardive. Les sites de réplication sont alors plus larges et moins nombreux avant de disparaître en phase G2. Le cycle de la transcription commence lui dès la phase G1 du cycle cellulaire. Environ 300 sites de transcription se distribuent de manière diffuse dans tout le noyau (figure 1.15). Lors de l'entrée en phase S, environ 150 sites de transcription extranucléolaire s'agrègent dans tout le noyau, puis se redispersent après la phase S (phase MS, LS et G2) pour redonner l'aspect initial observé en phase G1.

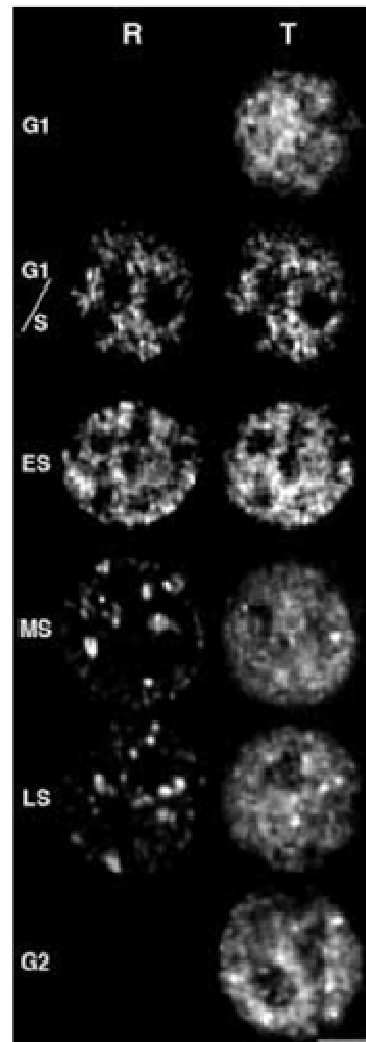


Figure 1.15. Sites de réplication (R) et de transcription (T) pour des cellules synchronisées en phase G1, phase S précoce (ES) milieu (MS) et tardive (LS) et phase G2. D'après Hassan et al., 1994).

Une colocalisation des sites de réplication et des sites de transcription est observée en phase G1/S et ES. C'est l'ARN Pol II qui est responsable de la synthèse de la majorité des ARN (mRNAs) colocalisés dans ces sites (80% de la synthèse d'ARN est sensible à α -amanitine (250 μ g/mL), inhibiteur de l'ARN polymérase II). Le reste des ARN est inhibé par une plus forte concentration en α -amanitine (1000 μ g/mL) et correspond aux rRNAs synthétisés par l'ARN Pol I au niveau du nucléole. Les facteurs de réplication s'assemblent

sur environ 20 origines de réplication sur lesquels, initialement, des facteurs de transcriptions participent à la transcription. Ces facteurs de transcription sont à l'origine d'une réorganisation structurale de l'ADN permettant ainsi l'ouverture de la chromatine. La synthèse d'ADN est alors initiée dans ces sites de transcription. Les facteurs de transcription sont ensuite « traînés » passivement sur le brin matriciel en mouvement en cours de réplication. La synthèse d'ADN se poursuit en présence d' α -amanitine (inhibiteur de l'ARN polymérase II). L'ARN polymérase II n'est donc pas impliquée dans l'étape d'élongation de la réplication. En conclusion, la colocalisation étroite des sites de réplication avec les sites de transcription en phase G1/S et ES signifie que la transcription joue un rôle d'initiation de la réplication.

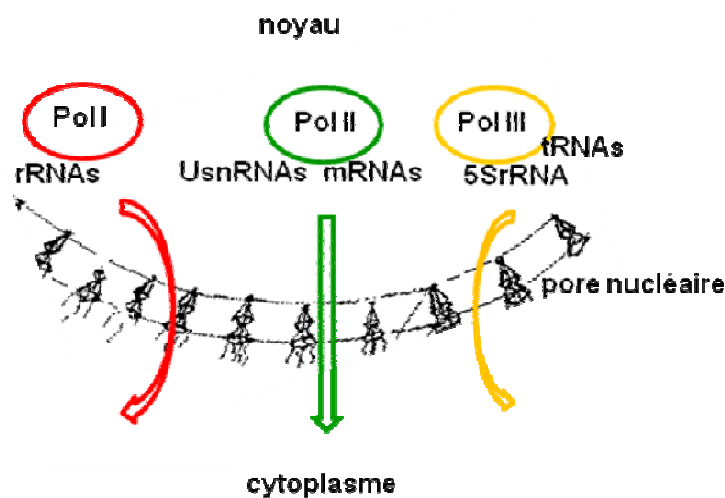


Figure 1.16. Différentes classes d'ARN transcrits dans le noyau par différentes ARN polymérase, tous exportés dans le cytoplasme à travers les pores nucléaires.

1.7.4 hnRNP A1

Historiquement, les premiers produits de la transcription des gènes furent découverts dans des eucaryotes supérieures et furent appelés « ARN nucléaire hétérogène » (hnRNAs : heterogeneous nuclear RNAs). Les hnRNAs peuvent être distingués des autres ARNs d'après

leur taille, leur compartimentation subcellulaire et par l'ARN polymérase capable de les transcrire. Les termes hnRNA et ARN pré-messager se confondent, bien qu'il soit possible qu'une unique subpopulation de hnRNAs soit réellement précurseur d'ARN messagers. Dans les cellules, les hnRNAs ne se présentent pas en polynucléotides dénudés, mais sont trouvés en complexes ribonucléoprotéiques nucléaires hétérogènes (hnRNPs : heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complexes) intimement associés à des protéines spécifiques : les protéines hnRNPs. L'association des hnRNA avec les protéines hnRNPs commence dès que les hnRNAs sont nouvellement transcrits et persistent jusqu'à ce qu'ils résident dans le noyau (Dreyfuss et al., 1988). La distribution intracellulaire des hnRNPs est hautement dynamique et pour certaines hnRNPs (hnRNP A1) dépend de l'activité transcriptionnelle.

Les hnRNPs constituent une famille de plus de 20 protéines désignées de A à U, qui se lient avec des molécules d'ARN pré-messagers nouvellement transcrits (Dreyfuss et al., 1988). Les protéines hnRNPs participent aux réactions de «processing» nécessaires à la génération d'un ARN messager mature et jouent un rôle important dans l'export du noyau des ARN messagers (Michael et al., 1995 ; Izaurralde et al., 1997). Ce sont les hnRNP A1 (protéine A1) et hnRNP C1 (protéine C1) qui sont les mieux caractérisés. Par marquage immunofluorescent, ces deux protéines apparaissent localisées dans le noyau. Cependant, la protéine A1 fait continuellement la navette entre le noyau et le cytoplasme tandis que la protéine C1 reste maintenue dans le noyau (figure 1.15). Sous l'effet d'inhibiteur de la transcription (ARN Pol II), l'import nucléaire de la protéine A1 est bloqué (Piñol-Roma et Dreyfuss, 1991, 1992, 1993).

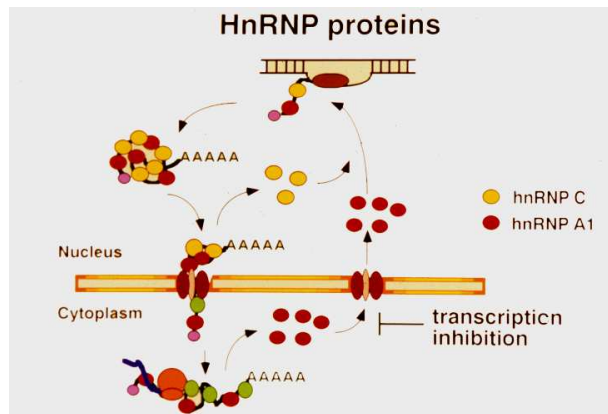


Figure 1.15. Représentation schématique du transport nucléocytoplasmique de la protéine hnRNP A1

Après avoir identifié les principaux constituants cellulaires et activités nucléaires sur lesquels l'élasticité du substrat est susceptible d'exercer une influence mécanique directe ou indirecte, reprenons quelques exemples de comportements cellulaires affectés par ce paramètre environnemental.

1.8 Comportements cellulaires dépendants de l'élasticité du substrat

1.8.1 Adhésion, migration, tractions

Les cellules peuvent percevoir les forces exercées sur elles ainsi que la rigidité du substrat qu'elles rencontrent naturellement, certains tissus cellulaires étant plus ou moins rigides tels que le cerveau, les tissus musculaires ou le tissu osseux pré-calcifié (figure 1.17). Face à ces différents environnements, la cellule adopte en réponse un comportement caractéristique. Afin de comprendre les réponses cellulaires face à ces environnements d'élasticité différents, des études de comportements cellulaires sur des matériaux synthétiques ou naturels aux propriétés physiques et élastiques contrôlés ont été menées.

Le comportement cellulaire largement étudié est la réponse de la machinerie adhésive considérée comme sonde de l'environnement mécanique. Les points de contacts focaux,

signes de l'ancrage cellulaire induisent des signaux impliqués dans le maintien, la migration et la division cellulaire c'est pourquoi ils restent généralement les premiers éléments étudiés.

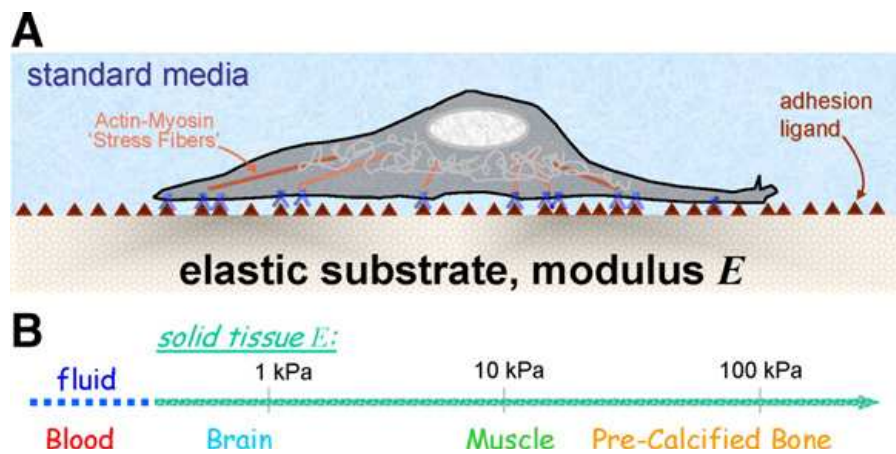


Figure 1.17. Cellules sur des modèles d'élasticité tissulaire.

A) Modèle in vitro d'une cellule sur un substrat d'élasticité E , couvert de ligands spécifiquement reconnus par des récepteurs d'adhérence cellulaire. La rigidité du substrat est perçue par la cellule et la transduction est obtenue par médiation à travers ces points d'ancrage. Des stimulus biochimiques peuvent aussi être médiés par les facteurs environnants. B) Élasticité de divers tissus « rigides » ainsi que le sang considéré comme tissu « fluide ». D'après Rehfeldt et al. 2007.

Les substrats à base de collagène I (supports en verre recouverts par du collagène I) considérés comme des substrats rigides avec des modules d'élasticités (modules de Young) variant de 20 kPa à 1 GPa, génèrent un étalement cellulaire optimal, des points d'ancrages riches ainsi qu'un cytosquelette dense en fibres de stress d'actines. Contrairement aux substrats rigides, les substrats mous induisent une morphologie cellulaire plus ronde et par conséquent un étalement cellulaire moins important traduit par une exhibition peu nombreuse des points d'ancrages et un cytosquelette peu dense de la cellule.

Ces modèles d'études ont révélé l'importance primordiale des interactions physiques des cellules avec leur microenvironnement. L'élasticité des tissus influe incontestablement sur la structure cellulaire tout autant que les facteurs chimiques solubles présents dans cet environnement.

D'autres comportements cellulaires largement étudiés concernent la migration cellulaire ainsi que les tractions exercées par la cellule affectée par le gradient de rigidité du

substrat. La migration cellulaire directionnelle est un processus critique dans beaucoup d'évènements physiologiques tel que la cicatrisation. Il est bien établi que les gradients de signaux chimiques jouent un rôle essentiel dans la motilité cellulaire. Des études basées sur l'utilisation de substrats avec une rigidité variable ont démontré que ce mouvement cellulaire peut aussi être guidé par des interactions physiques cellules / substrats. Par exemple, il a été démontré que les fibroblastes cultivés sur une surface ayant un gradient de rigidité, migrent plus facilement de la région molle vers la région rigide. Cette région leur permet de s'étaler ainsi que d'augmenter leurs forces de traction (Lo C-M et al., 2000).

1.8.2 Différenciation cellulaire

Le principal intérêt des substrats synthétiques ou naturels est leur capacité à mimer l'environnement cellulaire naturel dans le but de mieux caractériser le comportement cellulaire sur ces surfaces. Pour cela l'élasticité d'un certains nombres de tissus a été déterminée ce qui a permis l'élaboration de substrats ayant des élasticités proches des tissus humains tels que le cerveau (0,5 kPa), le muscle (10 kPa) ou l'os (100 kPa) (soft matter). Des investigations orientées sur le destin des cellules souches ont démontré que lorsque l'élasticité du substrat à un ordre proche de celui de certains tissus entraîne une différenciation cellulaire spécifique au tissu. Ainsi, la culture de cellules souches mésenchymateuses (MSCs) sur un substrat élastique (gels polyacrylamide d'épaisseur variable et avec une couche de collagène 1 en surface) qui mime l'élasticité des tissus du cerveau, du muscle et du cartilage a pour conséquence une différenciation cellulaire spécifique au tissu mimé. Ainsi, les MSCs se différencient en cellules neuronales, en myoblastes ou encore en ostéoblastes selon qu'elles se trouvent en contact avec les substrats avec des élasticités comparables à leurs tissus naturels. (Engler AJ et al. 2006, Matrix elasticity directs stem lineage specification).

1.8.3 Invasion tumorale

La transduction des signaux issue du microenvironnement de la cellule fait intervenir les intégrines. Ces récepteurs appelés « mécanosenseurs » influencent ainsi de nombreux évènements tels que les voies de signalisation Rho, Erk et de nombreuses protéines de signalisation telles que les FAK kinases ou encore les Src kinases (Tamada et al., 2004.) Les tumeurs caractérisées par l'augmentation du volume du tissu acquièrent généralement une rigidité plus importante. Des études concernant la l'invasion tumorale ont mis en évidence l'influence de la rigidité de la matrice et de la force exercée sur le cytosquelette de la cellule sur la formation des complexes d'adhésions focaux, sur les protéines de signalisation. L'ensemble de ces évènements met en péril l'homéostasie cellulaire conduisant dans les cas les plus extrêmes à des phénotypes tumoraux. La surexpression de la voie de signalisation Rho au niveau des zones tumorales rigides (Fritz et al, 1999) ainsi que l'activation de ROCK intervenant dans la dissémination des tumeurs sont clairement établis (Croft et al. 2004). Il a été également démontré que des variations de la rigidité de la matrice de l'ordre d'une centaine à mille Pa suffisent largement à perturber l'architecture tissulaire caractérisée par l'augmentation de la masse tissulaire suite à la surexpression de Rho puis de Erk. Cette surexpression conduit à l'ancrage de plus en plus consolidé par la machinerie adhésive de la cellule ce qui entraîne l'augmentation de la rigidité du tissu (Paszek et al., 2005 Tensional homeostasis and the malignant phenotype).

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

2.1 Matériels

2.1.1 Les polyélectrolytes

2.1.2 Construction des films

2.1.3 Méthodes de caractérisation et d'analyse

2.1.3.1 Microscopie confocale à balayage laser

2.1.3.2 Microscopie à épi-fluorescence

2.2 Méthodes

2.2.1 Les modèles cellulaires étudiés

2.2.2 La synchronisation mécanique

2.2.3.1 Test MTT

2.2.3.2 Test de viabilité cellulaire par mesure de l'activité

de la phosphatase acide

2.2.4 Immunomarquage

2.2.5 La réplication chez les eucaryotes

2.2.6 L'inhibition de Rac1

2.2.7 La transcription chez les eucaryotes

2.2.8 Apoptose

2.2.9 La microscopie

2.2.10 Western Blot

2.2.11 Quantification

2.1 Matériels

2.1.1 Les polyélectrolytes

Polyélectrolytes non fluorescents :

Les polyélectrolytes sont des polymères constitués de plusieurs chaînes de monomères possédant au moins une charge. Les polyélectrolytes sont dissous dans une solution tampon (eau ultrapure, Milli-Q de résistivité $\rho = 18,2 \text{ M}\Omega$) de 150 mM NaCl et de 20 mM Tris ajustée à un pH 7,4 afin d'obtenir une concentration finale de polyélectrolytes à 1mg/mL. Plusieurs types de polyélectrolytes ont été utilisés au cours de nos travaux, leurs caractéristiques sont consignées dans les tableaux ci-dessous.

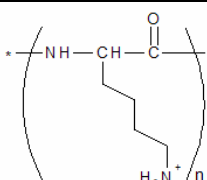
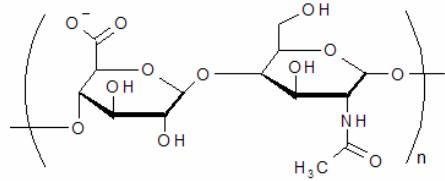
Nature du polyélectrolyte	Notation (charge)	Structure moléculaire	Masse molaire (g/mol)	pKa	Fournisseur
Poly(L-lysine)	PLL (+)		27000	10,5	Sigma-Aldrich
Acide Hyaluronique	HA (-)		412000	2,9	Bioiberica Lifecore Biomedical

Tableau 2.1. Polyélectrolytes dégradables

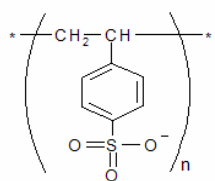
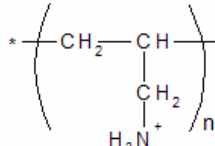
Nature du polyélectrolyte	Notation (charge)	Structure moléculaire	Masse molaire (g/mol)	pKa	Fournisseur
Poly(sodium 4-styrene sulfonate)	PSS (-)		70 000	/	Sigma-Aldrich
Poly hydrochlorure d'allylamine	PAH (+)		70 000	/	Sigma-Aldrich

Tableau 2.2. Polyélectrolytes synthétiques non dégradables.

Polyélectrolytes fluorescents :

Nature du polyélectrolyte fluorescent	Notation	Masse molaire (g/mol)	pKa	Fournisseur ou méthode de couplage
Poly(L-lysine) marquée à la fluorescéine isothiocyanate	PLL ^{FITC}	70 000	10.5	Sigma-Aldrich Taux de substitution : de 0.3 à 1 % FITC par lysine
Poly(styrene-sulfonate) marqué à la Rhodamine	PSS ^{Rho}	Non renseigné	/	Réaction de polymérisation Purification par dialyse Caractérisation par spectroscopie UV/Vis Fournit par le laboratoire

Tableau 2.3. Polyélectrolytes fluorescents utilisés.

2.1.2 Construction des films

Lors de nos travaux, nous avons utilisé deux types de supports selon les expériences et la technique de caractérisation employée. Pour les expériences d'immunofluorescences et de western blots, nous avons utilisé des lames de verres de 12 millimètres de diamètre, pour la microbalance à cristal de quartz les supports utilisés étaient en silice, conçus spécialement pour la QCMD.

Dans tous les cas, ces supports ont été soigneusement nettoyés avant leur emploi pour la construction des films multicouches. Deux protocoles différents de nettoyage sont suivis selon la nature des supports utilisés. Ainsi, les cristaux de QCM sont lavés pendant 15 minutes dans une solution de hellmanex à 2% chauffée à 70°C, puis rincés à l'eau milli-Q et encore lavés pendant 15 minutes avec une solution de HCl à 100 mM portée à 70°C et enfin rincés à l'eau ultrapure et séchés sous jet d'azote. Les lamelles de verres sont nettoyées pendant 15 minutes dans une solution chauffée à 70°C de SDS à 10 mM, ensuite rincées à l'eau milli-Q, puis de nouveau nettoyées pendant 15 minutes dans une solution de HCl à 100 mM chauffée à 70°C, et enfin rincées à l'eau ultrapure et séchées puis autoclavées.

Les films multicouches ont été construits par trempage (« dipping »). Pour la réalisation de films contenant un nombre élevé de couches, l'opération de dépôt sur les supports est programmée à l'aide d'un bras automatisé (Dipping Robot, Riegler et Kirstein, GmbH, Berlin, Allemagne) (figure 2.1). Les supports maintenus sur ce bras robot sont séquentiellement plongés dans les solutions de polyélectrolytes et de rinçage. Ils sont tout d'abord immergés dans la solution de polycations (10 min.) puis rincées (10 min.) avec une solution de rinçage identique à la solution de dissolution des polyélectrolytes. Ils sont ensuite plongés dans la solution de polyanions et rincés en suivant le même protocole que pour le dépôt des polycations. Ce cycle est répété autant de fois que nécessaire pour obtenir le nombre de paires de couche désiré.



Figure 2.1. Construction d'un film multicouche par trempage.

Les films construits sont répertoriés dans le tableau suivant ainsi que les modules de Young apparents correspondants:

Architecture	E (kPa ^a)	Notation
(PLL/HA) ₂₄	~ 0	E0
(PLL/HA) ₂₄ -(PSS/PAH) ₂	~ 50	E50
(PLL/HA) ₂₄ -(PSS/PAH) ₅	~ 200	E200
(PLL/HA) ₂₄ -(PSS/PAH) ₁₂	~ 500	E500
(PSS/PAH) ₂	ND	0/2
(PSS/PAH) ₅	ND	0/5
(PSS/PAH) ₁₂	ND	0/12

Tableau 2.4. Module élastique de Young apparent de (PLL/HA)₂₄-(PSS/PAH)_n avec n = 2, 5, 12.

Pour les films notés 0/2, 0/5, 0/12, le module de Young apparent n'a pas été mesuré, mais ces films sont considérés comme des films durs ayant un module de Young de l'ordre du GPa c'est-à-dire proche de celui du verre (Dubreuil et al., 2003).

2.1.3 Méthodes de caractérisation et d'analyse

2.1.3.1 Microscopie confocale à balayage laser

Phénomène de Fluorescence

La fluorescence est la propriété d'une molécule à absorber un photon, puis à le réémettre à une longueur d'onde plus élevée (figure 2.2). Soumise à une excitation lumineuse de longueur d'onde donnée, la molécule fluorescente est portée dans un état électronique excité (S_1'). A température ambiante, la conversion interne entraîne une perte partielle de l'énergie absorbée par relaxation vibrationnelle et la molécule se retrouve à un état excité moins élevé en énergie (S_1). Le retour de la molécule à son état électronique fondamental (S_0) est associé à une libération d'énergie lumineuse plus faible que l'énergie associée à l'excitation lumineuse ce qui se traduit par une longueur d'onde d'émission supérieure à la longueur d'onde d'absorption (Déplacement de Stokes).

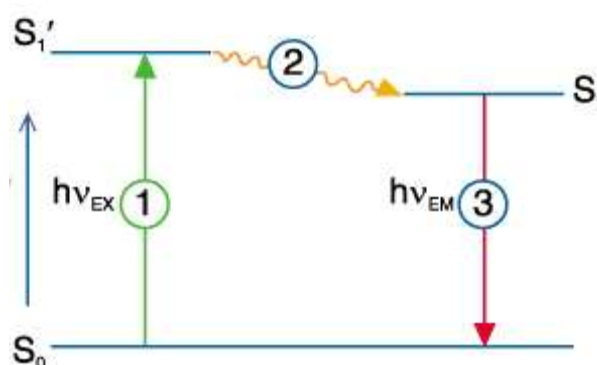


Figure 2.2. Diagramme de Jablonski. La molécule fluorescente initialement à l'état fondamental S_0 absorbe de l'énergie lumineuse (1) et se retrouve à l'état excité S_1' . Lors de la désexcitation, la molécule perd d'abord de l'énergie par conversion interne (2) (vibrations, chocs moléculaires) et se retrouve à l'état excité d'énergie inférieure S_1 puis subit une transition électronique de l'état S_1 à son état stable S_0 (3). Cette transition libère de l'énergie sous forme lumineuse à une longueur d'onde plus élevée que la longueur d'onde d'excitation (car l'énergie d'émission est plus faible que celle d'excitation).

Sondes fluorescentes

Les sondes fluorescentes sont des molécules relativement petites pouvant être couplées de façon covalente à différents polyélectrolytes ou macromolécules biologiques. En raison de leur large rendement quantique de fluorescence, les sondes fluorescentes peuvent fournir une

très grande sensibilité de détection et permettent l'imagerie d'espèces moléculaires présentes dans les films multicouches de polyélectrolytes par des techniques de microscopie de fluorescence telle que la microscopie confocale à balayage laser.

Principe de la microscopie confocale à balayage laser

Le principe général de la microscopie confocale a été proposé par Minsky (1957). Il s'agit de diriger un faisceau laser sur un point précis (point focal) de l'échantillon à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence. Cependant, le trajet du faisceau laser dans l'échantillon génère de la fluorescence en dehors du plan focal. Pour éliminer cette fluorescence parasite, un trou de filtrage appelé pinhole (« trou d'aiguille ») est placé en amont du détecteur et ne laisse passer que la lumière en provenance du point focal (figure 2.3). L'image ainsi obtenue présente un bon rapport signal/bruit.

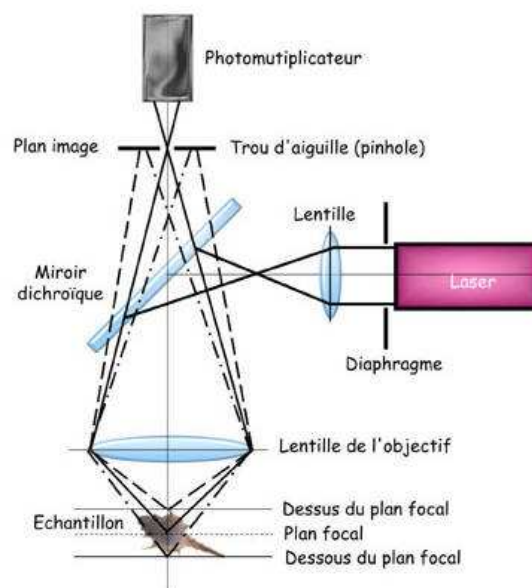


Figure 2.3. Schéma de principe d'un microscope confocale à balayage laser. La source laser est condensée par l'intermédiaire d'une première lentille, d'un miroir dichroïque et de l'objectif en un point focal. La fluorescence émise par l'échantillon est ensuite recueillie par un photomultiplicateur. Pour éliminer la fluorescence parasite (ligne en pointillé), le trou de filtrage (pinhole) est disposé au niveau du plan image de l'objectif.

Le balayage de l'échantillon par le laser, en tout point (x,y) de la surface fournit une image du plan focal. Ce balayage dans le plan horizontal est obtenu à l'aide de miroirs motorisés disposés sur le trajet optique du laser. Pour le balayage vertical (en z), l'objectif est monté sur un moteur piézo-électrique. Il est ainsi possible d'obtenir des images en provenance de différents plans focaux de l'échantillon et ainsi de reconstituer une structure en trois dimensions avec une résolution latérale et normale respectivement de 0.15 μm et 0.5 μm pour un objectif ayant une ouverture numérique de 1.4 et l'utilisation d'une longueur d'onde de 500 nm. Cette caractéristique est particulièrement intéressante pour étudier la structure normale des films multicouches épais (micrométriques) en milieu aqueux. La configuration la plus courante est le mode réflexion que nous avons utilisé pour l'observation des films multicouches. Dans ce mode, la même lentille sert à focaliser la source et à faire l'image sur le détecteur.

Reconstitution d'images

Le faisceau laser se déplace par lignes pour imager un plan (x,y). La platine porte objet, support de l'échantillon (lame de verre ou feuille de silicone fixée dans le dispositif d'étirement), est également déplacée en z d'un pas fini constant (Δz). Une image numérique des plans (x,y) du film est prise successivement pour chaque pas Δz et l'utilisation du pinhole (« trou d'aiguille ») permet d'imager un plan donné en éliminant les contributions des zones situées en-dessus et en-dessous de ce plan. L'image tridimensionnelle peut alors être reconstituée et l'objet peut être visualisé par tranches, sous différentes vues à l'aide du logiciel Zeiss LSM Image Browser (figure 2.4). Les lasers les plus couramment utilisés sont:

- Laser Argon contenant trois raies : 459 nm, 488 nm (bleu) et 514 nm (bleu-vert),
- Laser Hélium Néon I : 543 nm (vert),
- Laser Hélium Néon II: 633 nm (rouge).

Procédure

Au cours des expériences de microscopie confocale, nous avons utilisé les raies d'excitation à 488 nm fournie par le laser Argon et celle à 543 nm fournie par le laser Hélium Néon I. Le microscope confocale utilisé (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, CNRS, Strasbourg) est de type LSM 510 (Zeiss), monté sur un microscope AxioVert 100M (Zeiss) associé aux lasers Hélium/Néon et Argon. Pour visualiser les films multicouches de polyélectrolytes, les polyélectrolytes sont couplés avec des sondes fluorescentes, généralement la fluorescéine isothiocyanate (FITC excitation 488 nm/émission 520 nm) ou bien la rhodamine (Rho excitation 570 nm/émission 595 nm).

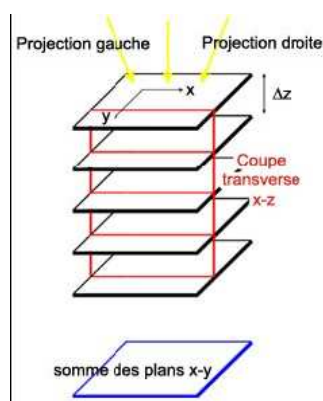


Figure 2.4. Principe de reconstitution d'images en 3D. Une image numérique (x,y) est réalisée à différentes hauteurs en z avec un pas de déplacement constant Δz et l'image en 3 D est reconstituée par la somme de ces plans. On peut alors accéder aux coupes transversales suivant les plans verticaux (xz) et (yz). La résolution verticale du microscope confocale dépend de la longueur d'onde utilisée et se situe aux alentours de 500 nm.

Sur les films multicouches dont l'un au moins des polyélectrolytes diffuse à travers l'ensemble de la construction, le dépôt d'un polyélectrolyte marqué permet de visualiser l'intégralité du film (figure 2.5). Ainsi, pour obtenir un marquage complet du film, le polyélectrolyte est déposé en couche terminale pendant une dizaine de minutes. Le microscope confocal utilisé disposant de plusieurs lasers, il est possible de co-marquer les films multicouches à l'aide de deux sondes fluorescentes différentes.

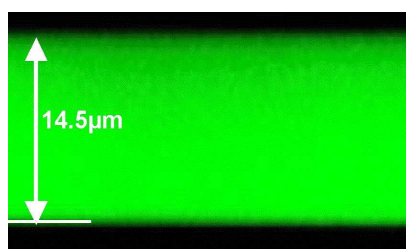


Figure 2.5. Coupe verticale (en z) d'un film multicouche (PLL/HA)₆₀/PLL^{FITC}. Film construit sur une lamelle de verre et observé par microscopie confocale avec un objectif X 40. La bande verte correspond à la diffusion de la PLL^{FITC} à travers tout le film et permet de mesurer l'épaisseur du film, ici environ 14.5 µm.

2.1.3.2 Microscopie à épi-fluorescence

En microscopie à épi-fluorescence, la lumière est tout d'abord filtrée (filtre d'excitation) puis dirigée par un miroir dichroïque vers l'objectif qui sert d'abord de condensateur au faisceau d'excitation. L'objectif est ensuite utilisé pour collecter la fluorescence émise par l'échantillon. L'utilisation d'un tel dispositif (TE200 ; Nikon) associé à l'emploi d'un miroir dichroïque et d'un film d'émission limite l'incidence de la lumière excitatrice sur le signal collecté aux oculaires et fournit des images avec un bon signal/bruit.

2.2 Méthodes

2.2.1 Les modèles cellulaires étudiés

Les cellules épithéliales de rein de kangourou, PtK2 (ATCC CCL56) sont cultivées dans le milieu de culture « Roswell Park Memorial Institute » RPMI-1640 complété en glutamax, à 10% sérum de veau fœtal (FBS, Gibco), à 5% de pénicilline streptomycine (100 µg/mL, Invitrogen) dans une étuve thermostatée à 37°C sous une atmosphère de 5% de CO₂. Lors des repiquages, les cellules sont détachées par trypsinisation (Tryple Express, Invitrogen) pendant 4 min à 37°C. Les cellules sont stockées par congélation dans un milieu de congélation (Gibco).

Les cellules épithéliales humaines SW480, issues d'une lignée d'adénocarcinome colorectal sont cultivées dans le milieu de culture RPMI-1640 complété en glutamax, à 10% de sérum de veau foetal (FBS, Gibco), à 5% de pénicilline streptomycine, en insuline (0,025 U/ml), en hydrocortisone (50 mg/mL), en antibiotique G418 (1,25 mg/mL). Les compléments cités ci-dessus sont des produits Invitrogen.

2.2.2 La Synchronisation mécanique

Pour les études de prolifération cellulaire, les cellules sont déposées à une concentration de 2×10^4 /mL. Pour les expériences de synchronisation mécanique, les cellules sontensemencées trois jours avant l'expérience à une concentration de $1,2 \times 10^4$ /cm². Afin de récupérer un maximum de cellules en mitose, nous disposons de nombreuses flasques de cultures de 125 cm². Une fois ces flasques rincées au PBS 1×, chacune d'elle subit une série de frappes sèches afin de détacher les cellules en mitose. Ces dernières sont récupérées et centrifugées à 700 tours/minute pendant 7 minutes puis le surnageant est retiré et le culot suspendu dans un volume minimum donné constitué de milieu de culture dépourvu de sérum. Ce milieu est ensuite distribué à hauteur de 0,5 ml par puits d'une plaque de 24 puits contenant la lamelle de verre ou les différents substrats investis. Quinze minutes après le début du dépôt des cellules en mitoses, qui ont eu le temps d'adhérer au substrat, nous remplaçons le milieu dépourvu de sérum par un milieu complet. Cet instant donne le temps 0' de notre expérience. Nous arrêterons la progression des cellules sur le substrat aux différents temps indiqués par fixation et perméabilisation par une solution de PFA à 3,7% / 0,5 % Triton X-100 pendant 15 minutes. Les lamelles ainsi fixées sont conservées dans du PBS 1× jusqu'à l'immuno-marquage.

2.2.3 Adhésion cellulaire

2.2.3.1 Test MTT

Ce test informe sur la viabilité cellulaire en mesurant l'activité mitochondriale des cellules. Le test MTT est réalisé selon la méthode décrite par Mosmann (1983). Le principe du test MTT consiste à mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale uniquement présente chez les cellules vivantes. Cette enzyme, par coupure du cycle tétrazolium, transforme le MTT, ou Bromure de 3 (4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium) de couleur jaune, en cristaux de formazan bleus. Le MTT est déposé à raison de 1 mg/mL de RPMI-1640 sans sérum. Après incubation (3h, à 37 °C), les cristaux de formazan sont solubilisés dans une solution de n-propanol (1/6 v/v) et 5 N de HCl (15 min à 37°C sous agitation). La quantité de formazan est ensuite évaluée par une lecture spectrophotométrique à 550 nm (par rapport à une référence à 650 nm), la densité optique étant directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

2.2.3.2 Test de viabilité cellulaire par mesure de l'activité de la phosphatase acide

La viabilité des cellules a été également détectée et quantifiée par mesure colorimétrique de la phosphatase acide. Le substrat utilisé est le pNPP, il s'agit du substrat des phosphatases modifié en un composé jaune le p-nitrophénol. Le pNpp, substrat chromogène des phosphatases et notamment de la phosphatase acide qui hydrolyse ce dernier en un composé terminal le p-nitrophénol.

L'enzyme phosphatase acide ne fonctionne qu'en présence d'ATP, soit dans des cellules vivantes voire non quiescentes. Son activité augmente proportionnellement au nombre de cellules viables. Elle est dosée en milieu tampon acétate 0,10 M à pH 5,0 (pour inhiber les phosphatase alcalines), 0,1 % de Triton X-100 (pour perméabiliser les membranes)

et 2,7 mM de para-nitrophényl phosphate (comme substrat) directement placés dans les puits de culture.

Préalablement le tapis cellulaire aura été lavé avec du PBS (phosphate-buffered saline) pour éliminer les cellules mortes et non adhérentes. La réaction est laissée à incuber pendant 2,5 heures à 37 °C et bloquée par addition de 60 µl de NaOH 1 M. Une coloration jaune apparaît alors fortement, causée par le para-nitrophénol qui est jaune à pH alcalin. La coloration est mesurable par une mesure de l'absorbance à 405 nm avec le lecteur de plaque Elisa Multiskan EX (Thermo electro corporation©).

2.2.4 Immunomarquage

Les techniques d'immunomarquage ont recours à des anticorps qui reconnaissent spécifiquement une molécule.

Les anticorps

Les anticorps sont des molécules complexes, appartenant à la famille des immunoglobines d'où la notation Ig. Ils constituent l'immunoglobuline principale du sang. Les anticorps sont sécrétés par des cellules différenciées à partir des lymphocytes B : les plasmocytes. Ils interviennent dans les réponses immunitaires lors de détection de molécules étrangères que l'on nomme antigènes. Ils ont pour fonction de reconnaître et de se fixer spécifiquement à l'antigène.

Structure générale

Les anticorps sont des glycoprotéines de la superfamille des immunoglobulines formées de 4 chaînes polypeptidiques dont deux sont dites lourdes et les deux autres légères.

Ces chaînes sont reliées entre elles par de nombreux ponts disulfures qui assurent une flexibilité à la molécule. Ces chaînes forment une structure en Y.

Rôle des anticorps

Les anticorps interviennent lors de la réponse immunitaire et ont trois fonctions principales : reconnaître et se lier à l'antigène puis activer le système immunitaire.

Les anticorps ont la capacité de reconnaître et de se fixer de manière spécifique sur un antigène. Cette spécificité est assurée par la présence de domaines hautement variables aux extrémités des anticorps. La fixation de l'antigène par l'anticorps constitue un signal de reconnaissance pour les cellules immunitaires chargées de les détruire. Il faut préciser qu'un anticorps donné reconnaît spécifiquement une zone précise de l'antigène, zone dénommée épitope. Cependant, un antigène comprend plusieurs épitopes et peut être reconnu par différents anticorps.

Il existe deux types d'anticorps, les anticorps monoclonaux et les anticorps polyclonaux. Les anticorps monoclonaux sont des anticorps qui reconnaissent qu'un seul type d'épitope sur un antigène. Ils sont par définition tous identiques et produits par un seul clone de plasmocyte. Les anticorps polyclonaux sont un pool d'anticorps reconnaissant différents épitopes sur un antigène donné. Chaque idiotype (zone qui reconnaît un épitope particulier) de l'anticorps est sécrété par un clone de plasmocyte différent.

Principe de l'immunomarquage

Le principe de l'immunomarquage repose sur la détection d'une protéine d'intérêt par un anticorps dirigé contre celle-ci, il s'agit de l'anticorps primaire. Ce dernier est lui-même

reconnu par un second anticorps couplé à un fluorophore. Ainsi la protéine d'intérêt est observée par la méthode d'immunofluorescence indirecte.

Déroulement de l'expérience :

Les cellules qu'elles soient en interphase (1×10^5 cellules) ou synchronisées ($1,2 \times 10^4$ par cm^2) sont déposées sur les différents substrats étudiés (les films multicouches de polyelectrolytes construits sur des lamelles de verre, ou le verre seul). Ces lamelles de verres comportant les films ou non, sont elles-mêmes déposées dans des puits des plaques de 24 puits. Les cellules sont ainsi cultivées le temps nécessaire avant l'étape de fixation. Les cellules sont ensuite fixées avec de la PFA à 3,7 % dans du PBS pendant 15 minutes. Elles sont ensuite perméabilisées par une solution de 3,7% PFA / 0,1% Triton X-100 pendant 10 minutes. Après rinçage par du PBS 1×, les cellules sont bloquées par une solution de FBS 10% dans du PBS 1× préalablement décomplémentée pendant la nuit à 4°C. L'ensemble des solutions contenant des anticorps est dilué dans du PBS 1×. Chaque étape d'incubation est précédée par un délai de rinçage au PBS 1 ×. Nous incubons ensuite la lamelle avec les cellules fixées par le premier anticorps primaire dilué au $1/100^{\text{ème}}$ pendant 1heure à température ambiante généralement. L'ensemble des anticorps primaires utilisés est indiqué dans le tableau 2.5. Après rinçage au PBS 1×, les lamelles sont incubées par l'anticorps secondaire couplé à un fluorophore, dilué au préalable. Le marquage de l'ADN est réalisé à l'aide d'une solution de Hoechst 33258 (Sigma) à 20 $\mu\text{g/ml}$ pendant 5 minutes. Les lamelles sont ensuite montées sur une lame de verre en présence de milieu de montage Vectashied (Vector Laboratories) avant observation au microscope à épifluorescence.

Anticorps primaires	Fournisseur
Integrin α V, Mouse	Santa Cruz Biotechnologies
Vinculin, Mouse	Sigma
Brdu, Mouse	GE Healthcare
Rac1, Mouse	Millipore
hnRNPA1, Mouse	Abcam
Acetyl-Histone-H3, Rabbit	Millipore
Caspase-3, Rabbit	Cell Signaling,
α -Tubulin, Rabbit	Santa Cruz

Tableau 2.5. Anticorps primaires utilisés lors des immunomarquages.

Les anticorps secondaires sont choisis selon la nature de l'anticorps primaire (Mouse ou Rabbit) et le fluorophore adapté (FITC ou TRITC). L'ensemble des anticorps secondaire utilisé est répertorié dans le tableau ci-dessous :

Anticorps secondaires	Conditions d'utilisation	Fournisseur
Goat Anti-Mouse, Hilyte Fluor TM 488-labeled	Dilution: 1/500 ^{ème} Temps d'incubation: 30 minutes	ANASPEC
FITC-conjugated Donkey Anti-Mouse	Dilution: 1/1000 ^{ème} Temps d'incubation: 15 minutes	Jackson Immunoresearch
Goat Anti-Mouse IgG-TRITC	Dilution: 1/200 ^{ème} Temps d'incubation: 30 minutes	Santa Cruz Biotechnologies
Goat Anti-Rabbit IgG-TRITC	Dilution: 1/200 ^{ème} Temps d'incubation: 30 minutes	Santa Cruz Biotechnologies

Tableau 2.6 Anticorps secondaires utilisés lors des immunomarquages.

Pour les marquages ciblant l'actine, nous procédons à un marquage par la phalloïdine couplée au TRITC (1 μ g/ml pendant 15 minutes, Sigma). La phalloïdine est une toxine qui possède la propriété de fixer spécifiquement les filaments d'actine.

2.2.5 La réplication chez les eucaryotes

La réplication est une étape primordiale précédant la division cellulaire. Lors de cette étape la cellule duplique son ADN. Il s'agit du procédé qui à partir d'une molécule d'ADN permet l'obtention de deux molécules d'ADN. L'ADN est une macromolécule formée d'un assemblage successif d'unité structurale nommée nucléotide. Un nucléotide comprend trois éléments, un groupement phosphate lié à une molécule de désoxyribose et une base azotée. Il existe quatre types de bases azotées, l'adénine (A), la thymine (T), la guanine (G) et la cytosine (C), ces bases azotées sont complémentaires. Cette complémentarité ne se fait pas au hasard, l'adénine s'associe avec la thymine et la cytosine avec la guanine. L'ADN est constitué de deux séquences de nucléotides formant deux brins complémentaires conférant la structure en double hélice.

Lors de la réplication de l'ADN, les deux brins se séparent et chacun sert de modèle pour la synthèse d'un nouveau brin complémentaire.

L'ADN polymérase joue un rôle primordial lors dans ce processus, il est chargé de rajouter à l'extrémité 3' en cours de formation des désoxiribonucléotides complémentaires. La réplication *in situ* permet de marquer spécifiquement les cellules en cours de réplication par l'ajout de l'uracile (présente dans le milieu de culture). L'uracile est une base azotée se liant à l'adénine lors de la traduction de l'ADN en ARN et marquée au bromodésoxyuridine (BrdU) ce qui permet l'immunomarquage spécifique d'une cellule en cours de réplication.

Déroulement de l'expérience

Après avoirensemencé les cellules épithéliales Ptk2 à une concentration de $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$ dans le cas de cellules non synchronisées et $1.2 \times 10^4 / \text{cm}^2$ dans le cas de cellules synchronisées, et laisser adhérer le temps souhaité nous changeons le milieu de culture par un milieu de culture contenant du BrdU dilué au 1/500^{ème} (RPN 201, GE Healthcare Europe), la

durée de cette incubation est de 15 minutes, et elle précède l'étape de fixation. La fixation et la perméabilisation se font en une étape à l'aide d'une solution de PFA à 3,7% / 0,05% Triton X-100 pendant 15 minutes. Il en suit l'étape de blocage par du serum décomplémenté à 10% pendant la nuit à 4°C. Après rinçage au PBS 1×, les cellules sont incubées par une solution contenant de DNase et l'anticorps anti-BrdU dilué au 1/100^{ème} (kit RPN 202, GE Healthcare Europe) à 37°C pendant 1 heure. Après rinçage au PBS 1×, les cellules sont incubées par une solution contenant l'anticorps secondaire, goat anti-mouse IgG Hilyte FluorTM 488 dilué au 1/500^{ème} dans du PBS 1× pendant 30 minutes.

2.2.6 L'inhibition de Rac 1

La protéine Rac1 est une GTPase, elle intervient dans de nombreuses voies de signalisation intracellulaires. Les GTPases Rac appartiennent à la famille des petites protéines G Rho, branche de la superfamille Ras. Rac1 est une protéine ubiquitaire ayant un rôle notamment dans la régulation du cytosquelette d'actine et de la croissance cellulaire. La protéine Rac1 est sous la forme Rac1-GTP ou Rac1-GDP. Le passage d'une forme à l'autre se fait via l'effecteur TIAM1 qui vient se fixer sur la forme RAC1-GTP, permettant ainsi le passage vers la forme Rac1-GDP. L'inhibiteur de Rac1, NSC23766 (figure 2.6) (Merck Calbiochem) est en compétition avec le site de fixation de TIAM1, et il bloque ainsi Rac1 sous la forme GTP (Gao Y. et al., 2004) (figure 2.7).

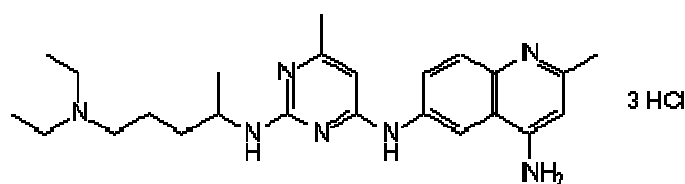


Figure 2.6. Formule moléculaire de l'inhibiteur de Rac1 NSC23766 (C₂₄H₃₈Cl₃N₇).

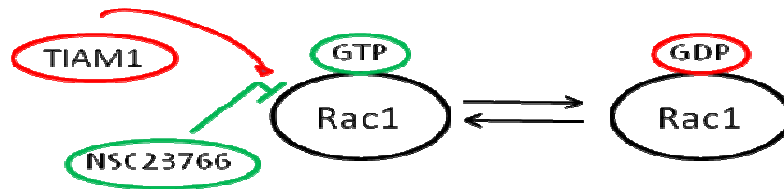


Figure 2.7. Action de l'inhibiteur de Rac1.

Déroulement de l'expérience

Les cellules sontensemencées sur le substrat étudié à une concentration de $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$ dans le cas des cellules non synchronisées et $1.2 \times 10^4 / \text{cm}^2$ dans le cas de cellules synchronisées, et laisser adhérer le temps souhaité en présence de l'inhibiteur de Rac1, NSC33766 à une concentration finale de $100 \mu\text{m}$. L'inhibiteur est présent tout au long de l'expérience et le milieu de culture le contenant est renouvelé toutes les deux heures. Les cellules sont ensuite fixer et marquées selon la méthode d'immunomarquage décrite auparavant.

2.2.7 La transcription chez les eucaryotes

La transcription est l'étape pendant laquelle les régions codantes de l'ADN sont transcrites en ARN. Elle se passe dans le noyau, l'ARN polymérase II y joue un grand rôle ; elle copie un brin d'ADN en ARN et lors de ce processus l'adénine est copiée en uracile, et la guanine en cytosine, la thymine en adénine et la cytodine en guanine, c'est lors de l'incorporation de l'uracile que nous faisons intervenir le BrdU qui sera incorporé à la place de l'uracile et marquera ainsi spécifiquement les cellules en cours de transcription et sera détecté par immunomarquage.

Déroulement de l'expérience

Les cellules sontensemencées sur le substrat étudié à une concentration de $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$ dans le cas de cellules non synchronisées et $1.2 \times 10^4 / \text{cm}^2$ dans le cas de cellules

synchronisées, et laisser adhérer le temps souhaité. Trente minutes avant la fixation des cellules, celles-ci sont rincées par un tampon physiologique, le tampon phosphate (100 mM CH₃COOK, 30 mM KCl, 1mM MgCl₂, 10 mM Na₂HPO₄, 1mM DTT, 1 mM ATP) à pH 7,4 pendant deux minutes sur un lit de glace (4°C). Puis, les cellules sont incubées par le milieu de transcription mixte (0,1 mM CTP, 0,1 mM UTP, 0,1 mM GTP dilué dans le tampon phosphate) contenant 0,1 mM BrU (Sigma) pendant 20 minutes à 33 °C. Ensuite, les cellules sont rincées par le tampon phosphate, puis perméabilisé par 0,2 % de Triton X-100 dilué dans le tampon de phosphate pendant 3 minutes. Les cellules sont alors fixées par 3,7 % de PFA contenu dans le tampon de phosphate pendant 15 minutes. Après l'étape de blocage habituel, nous procédons à l'immunomarquage en détectant le BrU avec un anticorps primaire anti-BrdU dilué au 1/100^{ème} (monoclonal anti-BrdU, clone BY-33, Sigma). Les cellules sont ensuite incubées par l'anticorps secondaire, goat anti-mouse IgG Hilyte FluorTM 488 dilué au 1/500^{ème} (AnaSpec) dans du PBS 1× pendant 30 minutes.

2.2.8 Apoptose

L'apoptose est un phénomène biologique où la cellule programme sa mort. Il s'agit d'un processus par lequel les cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. Les cellules en cours de destruction subissent habituellement une modification morphologique caractéristique où la cellule et le noyau rétrécissent, se condensent et se fragmentent fréquemment. Les cellules qui meurent par apoptose disparaissent de manière plus efficace que celles qui meurent par nécrose (inflammation induite suite au versement du contenu cytosolique dans l'espace extracellulaire). Les cellules apoptotiques sont phagocytées rapidement par des macrophages ce qui évite en général l'inflammation. Pour activer la phagocytose (mécanisme d'élimination), les cellules apoptotiques modifient la chimie de leurs surfaces permettant ainsi la reconnaissance par les macrophages. Plus précisément, les

cellules exposent au niveau de leurs feuillettes externes de leurs membranes plasmiques de la phosphatidylsérine qui est un phospholipide constitutif du feuillet interne. Puis, la phosphatidylsérine induit le signal de reconnaissance pour les cellules phagocytaires.

Les annexines qui forment une famille de protéines ont la particularité de se lier à des phospholipides. L'annexine V se lie notamment à la phosphatidylsérine. Afin de marquer les cellules en cours d'apoptose nous procédons à un marquage via l'annexine V couplée à un fluorophore.

Déroulement de l'expérience

Après avoirensemencé les cellules épithéliales Ptk2 à une concentration de $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$ dans le cas des cellules non synchronisées et $1.2 \times 10^4 / \text{cm}^2$ dans le cas de cellules synchronisées, et laisser adhérer le temps souhaité nous avons procédé au marquage de l'annexine V selon les instructions du kit Vybrant Apoptosis Assay Kit (Molecular Probes). Les cellules sont ensuite analysées par microscopie à épifluorescence.

2.2.9 La microscopie

Les échantillons sont montés à l'aide du milieu de montage VectaShield (Vector Laboratories). Les cellules marquées par les divers fluorophores sont visualisées par le microscope à épifluorescence Nikon Elipse TE200. Les images sont acquises à l'aide de la caméra Nikon Digital (DXM 1200 ou DS-Q11MC respectivement avec les logiciels ATC-1 ou NIS-Elements). Les images sont traitées et analysées avec le logiciel Image J (<http://rbs.info.nih.gov/ij/>).

2.2.10 Western Blot

La technique de western blot consiste à détecter une protéine spécifique dans un échantillon contenant des protéines totales extraites généralement à partir de cellules ou de tissus.

Déroulement de l'expérience

Les cellules sontensemencées sur les substrats étudiées déposés au préalable dans des plaques 24 puits (Nunc) à une densité de 2×10^5 cellules/cm² et incubées dans le milieu de culture complet pendant 4 heures à 37°C. Passé ce délai, les cellules sont traitées par une solution à 1% de sodium orthovanadate à 0,2 M (Sigma) pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite lysées par un tampon de lyse (20 mM Tris-base à pH 8, 0,15 M NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 10 % glycérol, 1 mM sodium orthovanadate contenant 1% de cocktail d'inhibiteur protéasique (Sigma). L'extraction protéique se fait par rotation des échantillons à 4°C pendant 1 heure et centrifugation à 7000 g pendant 5 minutes à 4°C. Les concentrations protéiques des échantillons sont évaluées à l'aide du kit DC protein assay (BioRad). Les extraits protéiques sont déposés à concentration identique de protéine totale sur un gel SDS-PAGE (NuPAGE, Invitrogen) et après migration des échantillons, ils sont transférés sur membrane nitrocellulose (Ibnot Transfer Stack, Invitrogen) puis bloqués par une solution de T-TBS (0,1% Tween 20, 50 mM Tris-base à pH 7,6, 0,15 M NaCl) contenant 1 % de BSA (Euromedex) et incubés à 4°C en présence de l'anticorps primaire (tableau 2.7) pendant la nuit. Les blots sont ensuite incubés par l'anticorps secondaire couplé à l'HRP (tableau 2.8). Les bandes protéiques sont alors détectées par chimiluminescence par l'utilisation de solution de réaction avec le kit ECL Plus Western Blotting (RPN 2132, GE Healthcare).

Anticorps primaire	Conditions d'utilisation	Fournisseur
FAK-Y397-P, Mouse IgG1	Dilution : 1/1000 ^{ème} Temps d'incubation : la nuit	BD Transduction Laboratories
FAK, Mouse IgG1	Dilution : 1/1000 ^{ème} Temps d'incubation : la nuit	Santa Cruz Biotechnologies
p44/p42 MAPK, Goat	Dilution : 1/2000 ^{ème} Temps d'incubation : la nuit	Cell Signaling
LIBS-Integrin β 1, Mouse	Dilution : 1/2000 ^{ème} Temps d'incubation : la nuit	Millipore

Tableau 2.7. Anticorps primaires.

Anticorps secondaire	Conditions d'utilisation	Fournisseur
HRP-conjugated anti-mouse	Dilution : 1/5000 ^{ème} Temps d'incubation : 2 heures	GE Healthcare
HRP-conjugated anti-rabbit	Dilution : 1/5000 ^{ème} Temps d'incubation : 2 heures	GE Healthcare

Tableau 2.8. Anticorps secondaires couplés à l'HRP.

Les anticorps secondaires sont choisis selon qu'ils sont dirigés contre un anticorps « mouse » ou « rabbit ».

2.2.11 Quantification

La fluorescence est visualisée avec le microscope Nikon Elipse TE200. L'objectif utilisé est le 63x1,4. Les images sont acquises avec la caméra digitale Nikon DXM 1200 ou la caméra DS-Q11MC avec respectivement les logiciels ATC-1 et « NIS-Elements ». Les images enregistrées sont ensuite traitées par le logiciel Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Quantification des fibres d'actine (en μm)

La quantification des fibres d'actine est réalisée avec le logiciel imageJ, en mesurant la longueur en μm de 20 fibres de stress d'actine par cellule. La mesure est effectuée sur 20 cellules par condition (E500, E200, E50 et E0). Les résultats représentent la s.e.m de 3 expériences indépendantes. La quantification est réalisée sur 20 cellules pour la condition E50 pour le temps t4h post-synchronisation. Ce résultat représente la s.e.m de 2 expériences indépendantes.

Quantification de l'aire cellulaire (en μm^2)

L'aire cellulaire est mesurée à partir des images obtenues après immunomarquage des cellules par l'anticorps anti-vinculine en utilisant le logiciel ImageJ. Ce marquage permet d'identifier le contour cellulaire. C'est le plan focal correspondant au maximum d'étalement cellulaire qui est retenue pour la mesure de l'aire cellulaire en μm^2 . 200 à 300 cellules sont ainsi mesurées pour chacune des conditions (E50, E200, E500 et le verre) pour 7 temps différents (1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h et 7h). Les résultats représentent la s.e.m de 3 expériences indépendantes. (astérisque : non statistiquement différent, $P < 0,01$, « ANOVA per rank »)

Quantification des spots de vinculine (en μm)

La quantification des spots de vinculine est réalisée avec le logiciel imageJ, en mesurant la longueur en μm de 20 contacts de vinculine par cellule. La mesure est effectuée sur 20 cellules par condition (verre, E500, E200 et E50) pour 7 temps différents (1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h et 7h). Les résultats représentent la s.e.m de 3 expériences indépendantes. (astérisque : non statistiquement différent, $P < 0,05$, « Dunn's method »).

Quantification du signal nucléaire fluorescent correspondant au BrdU (en unité arbitraire)

La quantification de l'intensité de fluorescence correspondant au signal BrdU est réalisée avec le logiciel imageJ (en pourcentage d'unité arbitraire). La quantification est réalisée sur 50 cellules par condition (verre, E500, E200 et E50) et pour 7 temps différents (1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h et 7h). Les résultats représentent la s.e.m de 3 expériences indépendantes.

Quantification du signal fluorescent correspondant à Rac1 (en unité arbitraire)

La quantification de l'intensité de fluorescence correspondant au signal Rac1 cytoplasmique est réalisée avec le logiciel imageJ (en pourcentage d'unité arbitraire). La quantification est réalisée sur 200 cellules par condition (verre, E500, E200 et E50, verre avec l'inhibiteur NSC23766) et pour 3 temps différents (3h, 4h et 7h).

Quantification du signal nucléaire fluorescent correspondant au BrU (en unité arbitraire)

La quantification de l'intensité de fluorescence correspondant au signal BrU est réalisée avec le logiciel imageJ (en pourcentage d'unité arbitraire). La quantification est réalisée sur 300 cellules par condition (verre, E500, E200, E50 et E0) pour cellule non synchronisée et pour le temps t4h après adhésion. La quantification est réalisée sur 50 cellules pour la condition E50 pour le temps t4h post-synchronisation. Les résultats représentent la s.e.m de 2 expériences indépendantes.

Quantification du signal nucléaire fluorescent correspondant au marquage hnRNP A1 (en unité arbitraire).

La quantification de l'intensité de fluorescence correspondant au signal hnRNP A1 est réalisée avec le logiciel imageJ (en pourcentage d'unité arbitraire). La quantification est

réalisée sur 300 cellules par condition (verre, E500, E200, E50 et E0) pour cellule non synchronisée et pour le temps t4h après adhésion. Les résultats représentent la s.e.m de 3 expériences indépendantes.

Quantification de l'aire nucléaire (en μm^2)

L'aire nucléaire est mesurée à partir des images obtenues pour les expériences de compétences transcriptionnelles (marquages des cellules au BrU et hnRNP A1) après marquage de cellule non synchronisé, 4h après adhésion, au Hoechst 33258 (marqueur de l'AN), en utilisant le logiciel ImageJ. Le noyau est considéré comme un objet sphérique (particulièrement pour la condition E0). L'aire (en 2D) est mesurée au niveau du plan focal correspondant au milieu du noyau. 400 noyaux sont ainsi mesurés pour chacune des conditions (E50, E200, E500 et E0). Les résultats représentent la s.e.m de 3 expériences indépendantes. (astérisque : non statistiquement différent, $P < 0,05$, « ANOVA »)

Quantification du signal fluorescent correspondant au marquage phosphatidylserine (en unité arbitraire).

La quantification de l'intensité de fluorescence correspondant au signal phosphatidylserine membranaire (annexineV) est réalisée avec le logiciel imageJ (en pourcentage d'unité arbitraire). La quantification est réalisée sur 300 cellules par condition (verre, E500, E200, E50 et E0) sur cellules non synchronisées et pour le temps t4h après adhésion.

Quantification du signal nucléaire fluorescent correspondant au marquage histone H3 acétylé (en unité arbitraire).

La quantification de l'intensité de fluorescence correspondant au signal nucléaire fluorescent histone H3 acétylé est réalisée avec le logiciel imageJ (en pourcentage d'unité arbitraire). La quantification est réalisée sur 300 cellules par condition (verre, E500, E200, E50 et E0) sur cellules non synchronisées et pour le temps t4h après adhésion

Chapitre 3

Rôle de l'élasticité du substrat sur la réplication et la transcription de cellules épithéliales PtK2

3.1 Introduction à l'article 1

3.2 Article 1

Kocgozlu L, Lavalle P, Koenig G, Senger B, Haikel Y, Schaaf P, Voegel JC, Tenenbaum H, Vautier D

« Selective and uncoupled role of substrate elasticity in the regulation of replication and transcription in epithelial cells », Journal of Cell Science 2010, 1;123(Pt 1):29-39

3.3 Résultats complémentaires

3.4 Résumé

3.1 Introduction à l'article 1

Les réponses cellulaires induites par la variation de l'élasticité sont largement étudiées. L'impact au niveau de l'adhésion cellulaire notamment la mise en place des contacts focaux, la dynamique du cytosquelette d'actine, ou encore les premières molécules des voies de signalisation telles que les FAK, MAP kinases sont des sujets d'investigation majeurs (Rehfeldt et al. 2007, Wei et al., 2008). Ces travaux ont mis en évidence les intégrines comme principaux mécanorécepteurs des cellules. Ces avancées ont également ouvert d'autres questions telles que la traduction d'un signal mécanique en un signal chimique ou encore l'impact des forces exercées sur les sites cryptiques des cellules ainsi que la conséquence au niveau moléculaire de telles forces.

La différenciation cellulaire contrôlée par l'élasticité représente un autre axe d'étude fort intéressant et promoteur notamment dans les nouvelles avancées thérapeutiques concernant les cellules souches (Engler et al., 2006).

L'émergence de ces nouveaux substrats synthétiques ou naturels et leurs caractérisations physico-chimiques permettant de mimer le microenvironnement de la cellule ont également contribué dans la compréhension de la réponse cellulaire vis-à-vis du substrat. Ces études ont démontré que les cellules pouvaient induire l'augmentation de la rigidité de leurs microenvironnements en renforçant par exemple leurs sites d'ancrages, influant ainsi le recrutement des intégrines. La cascade de ces événements peut conduire à la dérégulation des voies de signalisation Erk puis Rho favorisant l'acquisition du caractère tumoral des cellules devenues plus contractiles (Paszek et al., 2005)

Les événements cellulaires fondamentaux tels que la réplication, la synthèse et maturation de l'ARN messager ainsi que la biogénèse des sous-unités ribosomales ont lieu dans le noyau. Une question fondamentale encore non abordée est de déterminer si la

réplication et la transcription peuvent être influencées par des paramètres mécaniques extracellulaires, plus précisément par l'élasticité du substrat et quelles pourraient être les voies de signalisations impliquées. Ces questions constituent le sujet central de ma 1^{ère} partie de mon travail et font l'objet de ce chapitre.

3.2 Article 1

Selective and uncoupled role of substrate elasticity in the regulation of replication and transcription in epithelial cells

Leyla Kocgozlu^{1,2,3}, Philippe Laval^{1,2,4}, Géraldine Koenig^{1,2}, Bernard Senger^{1,2}, Youssef Haikel^{1,2,3}, Pierre Schaaf⁵, Jean-Claude Voegel^{1,2,3}, Henri Tenenbaum^{1,2,3} and Dominique Vautier^{1,2,3,*}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM Unité 977, 67085 Strasbourg Cedex, France

²Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

³Equipe de Recherche Technologique 10-61 interne à l'unité 977, 67085 Strasbourg Cedex, France

⁴Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

⁵Centre National de la Recherche Scientifique, UPR22, Institut Charles Sadron, BP 84047, 67034 Strasbourg Cedex, France

*Author for correspondence (Dominique.Vautier@medecine.u-strasbg.fr)

Accepted 2 October 2009

Journal of Cell Science 123, 29-39 Published by The Company of Biologists 2010

doi:10.1242/jcs.053520

Summary

Actin cytoskeleton forms a physical connection between the extracellular matrix, adhesion complexes and nuclear architecture. Because tissue stiffness plays key roles in adhesion and cytoskeletal organization, an important open question concerns the influence of substrate elasticity on replication and transcription. To answer this major question, polyelectrolyte multilayer films were used as substrate models with apparent elastic moduli ranging from 0 to 500 kPa. The sequential relationship between Rac1, vinculin adhesion assembly, and replication becomes efficient at above 200 kPa because activation of Rac1 leads to vinculin assembly, actin fiber formation and, subsequently, to initiation of replication. An optimal window of elasticity (200 kPa) is required for activation of focal adhesion kinase through auto-phosphorylation of tyrosine 397. Transcription, including nuclear recruitment of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1), occurred above 50 kPa. Actin fiber and focal adhesion signaling are not required for transcription. Above 50 kPa, transcription was correlated with α v-integrin engagement together with histone H3 hyperacetylation and chromatin decondensation, allowing little cell spreading. By contrast, soft substrate (below 50 kPa) promoted morphological changes characteristic of apoptosis, including cell rounding, nucleus condensation, loss of focal adhesions and exposure of phosphatidylserine at the outer cell surface. On the basis of our data, we propose a selective and uncoupled contribution from the substrate elasticity to the regulation of replication and transcription activities for an epithelial cell model.

Key words: Substrate elasticity, Integrin, Actin, Vinculin, Rac1, Replication, Transcription

Introduction

Cell activity *in vivo* is largely dependent on the properties of the surrounding tissue, where numerous biochemical and mechanical cues originate. For instance, during their development, neuronal crest cells cross different extracellular stroma. To colonize targeting organs, circulating lymphocytes cross several tissues. Also, in pathological processes such as metastatic disseminations, tumor cells acquire the ability to migrate into the stroma. Up to now, extracellular matrix (ECM)-cell interactions driving these various processes have generally been investigated using biochemical approaches. These *in vitro* studies are often performed on plastic or glass dishes, which constitute stiffer surfaces than the stiffest living tissues. Moreover, various substrates (e.g. isoform laminin, collagen I/IV etc.) interact with different types of receptors to activate various signaling pathways, ultimately resulting in different cell responses (Gross et al., 2008). However, little is known about the consequences on cell behavior of varying physical parameters of the cell microenvironment. Major cellular events take place within the nucleus, including replication, messenger RNA synthesis and processing, and ribosome subunit biogenesis. How mechanical matrix information transmitted through the cytoskeleton can affect both structure and function within the nucleus is a matter of great debate (Gieni and Hendzel, 2008). 'Tensegrity' models postulated how mechanical forces, generated through cell-ECM interactions

via focal adhesions (FAs) could impact cytoskeletal and nuclear morphology and ultimately induce changes in the pattern of gene expression (Wang et al., 2009). Conversion of mechanical information into a cellular signal is mediated by the actin cytoskeleton through interactions between integrins and actin-binding proteins (talin, paxillin, vinculin). Matrix compliance influences cytoskeletal tensions, Rho activity and ERK-dependent growth (Wang et al., 1998; Wozniak et al., 2003), with cytoskeletal tension promoting growth (Roovers and Assoian, 2003) and FA assembly (Burrige and Wennerberg, 2004). Investigation of the mechanoregulatory circuit, via ERK and Rho activities, linking matrix stiffness to cytoskeletal tension through integrins (to regulate tissue phenotype), has become an emerging research domain (Paszek et al., 2005). Close to the nuclear sites of transcription, different hypothetical models can account for transmission of mechanical signals directly to the nuclear sites of transcription: First, chromatin is connected to the nuclear lamina through a putative karyoskeleton; and second, chromatin interacts directly with the nuclear lamina and slicing factor compartment (Maxwell and Hendzel, 2001). This second hypothesis has been verified (Shimi et al., 2008). Nucleoplasmic lamin A, localized at the nuclear envelope blebs, is associated with gene-rich euchromatin, together with RNA polymerase II and histone, creating conditions for active transcription (Shimi et al., 2008). Yet, the fundamental question

that remains unanswered is whether replication and transcription at the nucleospatial organizational level are influenced by the substrate elasticity. This constitutes the central issue of this paper.

The Young modulus, E (deformation properties under stress are usually reported in pascals), of living tissues exhibits a wide range of values (Levental et al., 2007). Brain, for example, has a Young modulus of several hundred pascals, whereas that of muscle lies above 10 kPa. Tissue from kidney has a value around 100 kPa and that of tendon and cartilage is in the range of megapascals (Levental et al., 2007; Georges et al., 2006; Snedeker et al., 2005; Engler et al., 2004; Discher et al., 2005). Only recently have proposals been made for more compliant materials that have tunable elasticity values that are comparable to living tissue. For instance, gels of polyacrylamide (PA) (Pelham and Wang, 1997; Lo et al., 2000; Engler et al., 2004; Yeung et al., 2005), matrices of polydimethylsiloxane (Wong et al., 2003), polyethylene glycol (Rizzi et al., 2006) and polyelectrolyte multilayers (PEMs) (Decher, 1997) all offer the opportunity to study cellular behavior under well-defined mechanical conditions (Richert et al., 2004; Ren et al., 2008). Pelham and Wang, using PA gels of variable stiffness as substrates, observed that epithelial cells and fibroblasts exhibit differences in motility and FA organization (Pelham and Wang, 1997). Mesenchymal stem cells could express key markers of neurogenic, myogenic and osteogenic lineages once they were cultured on PA gels with stiffness values that corresponded to the tissue elasticities of brain (1 kPa), muscle (10 kPa) and nascent bone (100 kPa) (Engler et al., 2006).

The goal of the present work was to investigate the influence of the rheological substrate properties on adhesion signaling pathways as well as on DNA replication and transcription. We also examined whether correlations exist between adhesion pathways, replication and transcription. We used PEMs, namely hyaluronic acid/poly-L-lysine (HA/PLL) capped with poly(styrene) sulfonate/polyallylamine hydrochloride (PSS/PAH) multilayers as the substrate models (Garza et al., 2004). The alternate deposition of positively and negatively charged polyelectrolytes onto solid substrates leads to the formation of nanostructured films known as PEMs (Decher, 1997). HA/PLL is known to be non-adhesive to cells (Mendelsohn et al., 2003), whereas PSS/PAH presents remarkable properties with respect to cell adhesion and cellular proliferation (Boura et al., 2005). The origin of these remarkable properties is still unknown but is expected to be related to the mechanical properties of PSS/PAH. The HA/PLL films capped with PSS/PAH allow modulation of these mechanical properties. These films, in contrast to reticulated gels, are not only elastic but also viscoelastic. The viscoelasticity of these films was explored by Francius and colleagues (Francius et al., 2007) using atomic force microscopy (AFM). This technique, however, only allows exploration of a time scale from 10 to 10^{-3} seconds. Longer times might be involved in cellular adhesion or other physiological cellular processes (Engler et al., 2008) but cannot be explored experimentally by this technique. What is firmly established is that the higher the number of PSS/PAH layers, the stiffer the film becomes. We characterized the films by their apparent elastic modulus (E_{ap}), which would correspond to the real elastic modulus of the layer if it behaved strictly elastically. The E_{ap} value should, therefore, not be taken in a strict sense when comparing it to other published systems, but as a semi-quantitative estimation of the stiffness. The response of the cells depends on the changes in the stiffness of the polyelectrolyte multilayers, showing the biological relevance of this mechanical parameter that characterizes the films.

On the basis of previous work, marsupial kidney epithelial (PtK2) cells were chosen as a model for following the spatial configuration of replication and transcriptional (Ferreira et al., 1997).

Results

Progressive stiffening of the PEM films increases cell adhesion

PEM films were used to investigate how the mechanical properties of the substrate might play a role in replication and transcription activities at the nucleo-spatial organizational level. The films were composed of a (PLL/HA)₂₄ stratum capped by a second (PSS/PAH)_n stratum ($n=0, 2, 5$ and 12). A typical example of confocal z-section observation of a film composed of PLL/HA stratum and PSS/PAH capping is displayed in Fig. 1Aa. Note that for $n=0$, the film corresponds to a PLL/HA film that is essentially a viscous liquid (Picart et al., 2007) and unfavorable for cell adhesion (Mendelsohn et al., 2003). By contrast, the values of the elastic moduli for the set of (PSS/PAH)_n strata lie in the gigapascal range (Dubreuil et al., 2003). However, as the number of capping layers increases, the film becomes stiffer, as we previously showed by AFM indentation experiments (Francius et al., 2007). Although the PLL/HA stratum is capped, the whole film behaves like a viscoelastic medium. Each of the films was modeled as a spring (elastic modulus E_1) in series with a Kelvin unit, which is itself a spring (elastic modulus E_2), in parallel with a dashpot. We will refer to this model as the SK model (where S stands for spring and K for Kelvin). Fig. 1Ab shows the effect of depositing PSS and PAH on top of the PLL/HA stratum, and represents the evolution of the apparent elastic modulus in the SK model ($1/E_{ap}=1/E_1+1/E_2$) at a given expansion velocity (about 1 $\mu\text{m}/\text{second}$) for the AFM piezodrive. It follows from Fig. 1Ab that the apparent moduli are roughly 50, 200 and 500 kPa for the architectures (PLL/HA)₂₄-(PSS/PAH)_n with $n=2, 5, 12$, respectively. It is known from earlier investigations (Francius et al., 2006) that the elastic modulus of the native (PLL/HA)₂₄ architecture is under 1 kPa and is considered here as our zero. Henceforth, we shall use the short-hand notations E0, E50, E200 and E500 for the (PLL/HA)₂₄, (PLL/HA)₂₄-(PSS/PAH)_n films with $n=2, 5, 12$, respectively, and 0/2, 0/5 and 0/12 for (PSS/PAH)₂, (PSS/PAH)₅ and (PSS/PAH)₁₂ films, respectively (see Table 1). Also, the amount of ligands adsorbed from the serum was quantified using a quartz crystal microbalance. Supplementary material Table S1 summarizes these results. The amount of ligands deposited from 10% fetal bovine serum (FBS) does not depend on the number of polyelectrolyte layers deposited on the surface.

The adhesion of PtK2 cells was first investigated 4 hours (a sufficient time for onset of nuclear activities) after seeding on the different film architectures using the MTT test (see Materials and Methods). As seen in Fig. 1B, adhesion of cells cultured on 0/2, 0/5 and 0/12 films was almost the same as that observed for bare glass surface. This observation is expected because the values of elastic moduli for all these surfaces lie within the gigapascal range (Dubreuil et al., 2003). Progressive decrease in cell adhesion was observed when cells were seeded onto substrates for which stiffness progressively decreased (Fig. 1B; E50 and E0 films compared to glass). A similar cell-film adhesion response was obtained using the acid phosphatase test (supplementary material Fig. S1).

Organization of actin fibers and vinculin assembly require substrate elasticity of above 200 kPa

To determine whether αv -integrins, organization of actin fibers and vinculin FA assembly were affected by the film stiffness,

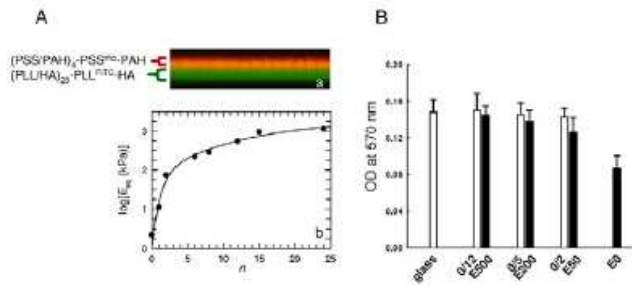


Fig. 1. PEM films and cell adhesion. (Aa) Vertical section image of a $(PLL/HA)_{24}-PLL^{FITC}-HA-(PSS/PAH)_4-PSS^{Rho}-PAH$ multilayered film observed by CLSM. (Ab) Decimal logarithm of E_{ap} of $(PLL/HA)_{24}-(PSS/PAH)_n$ and -PSS films investigated previously (Francius et al., 2007) as a function of the number (n) of (PSS or PAH) layers. (B) Results of Mtt test after 4 hours of adhesion on glass surface (glass) or on E0, E50, E200, E500, 0/2, 0/5 and 0/12 films. Error bars represent s.d. derived from two independent experiments (triplicate well determinations, four measurements per well).

immunofluorescence experiments using antibodies specific for integrin, and phalloidin staining for F-actin and vinculin, were performed on cells cultured for 4 hours on the stiffened substrates. Cells cultured on E500 and E200 films all displayed peripheral αv -integrin spots (Fig. 2Aa,d) and localized at the tip of actin microfilaments (Fig. 2Ab,e) and vinculin sites (Fig. 2Ac,f), similarly to the well-known pattern described in cells grown on glass and on 0/2, 0/5 and 0/12 films (supplementary material Fig. S2Aa,c,e,g for F-actin and supplementary material Fig. S2Ab,d,f,h for vinculin). By contrast, neither αv -integrin spots, F-actin stress fibers nor vinculin adhesion spots were detected in cells cultured on E0 (Fig. 2Aj-l) or E50 films (Fig. 2Ah,B for F-actin and Fig. 2Ai for

vinculin). However, on E50 films, αv -integrin spots were visualized (Fig. 2Ag). These results clearly indicate that actin-fiber organization and vinculin FA assembly require a substrate whose E_{ap} exceeds 50 kPa.

Activation of FAK-Y397 takes place at an optimal elastic modulus

The adhesion process is a complex cascade of reactions, and focal adhesion kinase (FAK) is one of the major kinases implicated in FA-contact signaling. FAK is activated and localized at FA contacts after cell adhesion to the extracellular matrix (Schaller et al., 1999). Integrin engagement initiates auto-phosphorylation of tyrosine 397 (FAK-Y397) (Kornberg et al., 1991). Accordingly, we have investigated whether film stiffness also affects FAK-Y397 auto-phosphorylation. Using specifically directed antibodies, we used western blot to analyze phosphorylated FAK-Y397 (FAK-Y397-P) expressed by cells cultured for 4 hours on substrates of increasing stiffness. Western blots are given in Fig. 2C. Cells cultured on E0

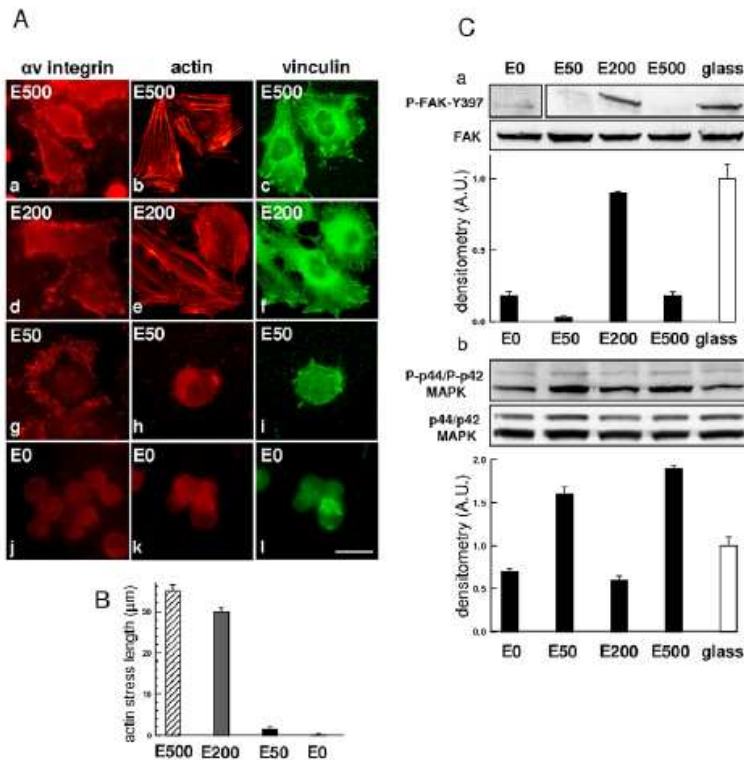


Fig. 2. αv -integrin, actin fiber, vinculin and activation of FAK-Y397 at different substrate elasticities. (A) Images of cells after 4 hours of culture on E500 (a-c), E200 (d-f), E50 (g-i) and E0 (j-l) with anti- αv -integrin (a,d,g,j), labeled with phalloidin (b,e,h,k) or anti-vinculin (c,f,i,l). Scale bar: 20 μm . (B) Quantification of actin stress (in μm) using ImageJ, based on Ab,e,h,k and obtained by measuring the length of 20 actin stress fibers per cell for 20 cells. Results are presented as s.e.m. for three independent experiments. (Ca) Western blots of FAK and phosphorylated FAK-Y397 (P-FAK-Y397) in cells seeded 4 hours on E0, E50, E200, E500 films and glass. Histogram shows the corresponding scans for phosphorylated FAK-Y397. (Cb) Western blots of p44/p42 MAPK and phosphorylated p44/p42 MAPK (P-p44/p42 MAPK) in cells seeded 4 hours on E0, E50, E200, E500 films and glass. Histogram shows the corresponding scans for phosphorylated p44/p42 MAPK. Representative results from at least three independent experiments.

and on E50 films failed to induce activation of FAK-Y397, whereas the protein was activated on E200 films (Fig. 2Ca and supplementary material Fig. S2Ba). Surprisingly, cells cultured on E500 films (an even stiffer substrate) also failed to induce activation of FAK-Y397 (Fig. 2Ca and supplementary material Fig. S2Bb), whereas, on harder strata 0/2, 0/5 and 0/12 (supplementary material Fig. S2C) and on a glass surface (Fig. 2Ca) FAK-Y397-P was activated. These observations suggest that activation of FAK-Y397-P takes place in a finite range at an optimal elastic modulus (around 200 kPa) and also for stiff material. Following FAK activation, a kinase signaling cascade leads to stimulation of p42/p44 MAPK (also called ERK1 and ERK2), which is required for cell migration, survival and gene expression (Huang et al., 2004). Thus, the activation of p42/p44 MAPK in response to substrate elasticity was investigated. Fig. 2Cb shows that cell incubation on E0, E50, E200 and E500 films allowed activation of phosphorylated p44/p42 MAPK. This result suggests that substrate elasticity ranging from 1 to 500 kPa is not an environmental parameter able to inhibit activation of phosphorylated p44/p42 MAPK.

Inhibition of replication is strongly correlated with inhibition of vinculin assembly

Focal adhesion morphology is thought to be dependent on the cell-cycle phase. FA sites are small and numerous in non-S-phase periods, yet mature and less numerous in S phase (Meredith et al., 2004). In S phase, nucleosides are incorporated into the DNA of the cell and a duplicate set of chromosomes is synthesized (Pardee, 1989).

A major question is then whether or not DNA replication can be affected by the stiffness of the substrate in correlation with assembly of vinculin FAs. To address this question, we synchronized a collection of cells using the mitotic shake-off method to chronologically follow the initial steps of vinculin FA-site organization in relation to the onset of DNA replication. These time-dependent events were first analyzed on a control surface (glass substrate). Then, we investigated on E50 films whether altering one event had any consequences on another with respect to cell progression through the ongoing cell cycle. The influence of substrate elasticity on these time-dependent events was also checked for E200 and E500 films. On glass substrate, cells re-attached as early as 30 minutes after release. Within 1-2 hours after synchronization, cells had progressively spread over the surface (Fig. 3A,Ba shows round-shaped morphologies at 1 hour; Fig. 3Bb, show spread morphologies at 2 hours). At 2 hours after synchronization, neither punctuate vinculin staining (Fig. 3Bb) nor replication activities were detected in cells (Fig. 3Bi). Vinculin FA assembly was first visible 3 hours after mitosis. These vinculin spots were uniformly distributed at the periphery of cells (Fig. 3Bc), reaching a length of $1.6 \pm 0.03 \mu\text{m}$ (Fig. 3E). These spots were assigned to focal complexes and originated as dot-like structures (Biggs et al., 2007). During this time period, DNA replication was still inactive (Fig. 3Bj). BrdU incorporation sites were first detected 4 hours after synchronization (Fig. 3Bk,F) while the vinculin spots increased in length ($3 \mu\text{m}$) (Fig. 3Be,E). Within 5-7 hours post-mitosis, cells reached a maximum area of about $1300 \mu\text{m}^2$ (Fig. 3A) and displayed vinculin spots of increased length ($4 \mu\text{m}$) (Fig. 3E), preferentially localized at the cell protrusive extremities (Fig. 3Be-g). These spots were assigned to mature FAs. Mature FAs are typically dash-shaped with areas of $2\text{-}5 \mu\text{m}^2$. Mature FAs were identified as structures containing vinculin, paxillin, and talin (Biggs et al., 2007). At this time, cells still remained in S phase (Fig. 3Bl-n and Fig. 3F; total S phase duration was about 10 hours) (Mitchison, 1971). Release of cells onto E50 films did not affect reattachment

but did reduce cell spreading (Fig. 3A,C) and inhibit the formation of vinculin structures (Fig. 3Ca-g). In addition, DNA replication was completely obstructed throughout the time period normally required to observe this activity (Fig. 3Ck-n,F). Taken together, these results seem to indicate that inhibition of replication is strongly correlated with the inhibition of vinculin assembly. For E200 and E500 films, at 1-7 hours post-synchronization, the cell area remained smaller than area values on glass surface (Fig. 3A; 5-7 hours post-synchronization $1000 \mu\text{m}^2$ for E200, $950 \mu\text{m}^2$ for E500 and $1300 \mu\text{m}^2$ for glass). Vinculin structures were detected 3 hours after mitosis on the E200 and E500 films (Fig. 3Dc,E and supplementary material Fig. S3Bc). On E200 and on E500 films, after 5-7 hours post-synchronization, vinculin spots were smaller at the cell protrusive extremity (Fig. 3De-g,E, $2.8 \mu\text{m}$ for E200 films; Fig. 3E, $2.6 \mu\text{m}$ for E500 films; supplementary material Fig. S3Be-g) than those visualized on glass surface (Fig. 3Be-g,E, approximately $4 \mu\text{m}$). However, even for these two architectures, vinculin spots (length greater than $2 \mu\text{m}$) could still be assigned to 'dash' structures. For E200 and E500 films, replication took place 4 hours after mitotic synchronization (Fig. 3Dk-n for E200 films; supplementary material Fig. S3Bk-n for E500 films; and Fig. 3F for quantification). These results demonstrate that vinculin assembly depends on the elastic modulus of the surface (200 kPa) and precedes cell progression into S phase. Interestingly, on control surface (glass surface), the kinetics of vinculin FA assembly (3 hours post-mitosis) and onset of replication (4 hours post-mitosis) were identical to those observed when a substrate reached an elastic modulus value above the 200 kPa necessary and sufficient for vinculin assembly and replication.

Rac1 activity requires substrate elasticity above 200 kPa to regulate vinculin assembly, actin stress and replication

Rac1 is member of the ras-related superfamily of small GTPases that regulate both polymerization of actin to produce lamellipodia and vinculin FA assembly at the plasma membrane (Nobes and Hall, 1995). To try to establish direct relationships and whether inhibition of replication can be attributed to inhibition of vinculin assembly, we tested the influence of substrate elasticity on Rac1 activity with or without the anti-Rac1 inhibitor NSC23766. In cells synchronized by mitotic shake-off, Rac1 was cytoplasmic after 3 hours on glass (supplementary material Fig. S4a), E500 (supplementary material Fig. S4d) and E200 (Fig. 4Aa) substrates; 4 hours on glass (supplementary material Fig. S4b), E500 (supplementary material Fig. S4e) and E200 substrates (Fig. 4Ab); and 7 hours after synchronization on glass (supplementary material Fig. S4c), E500 (supplementary material Fig. S4f) and E200 substrates (Fig. 4Ac). By contrast, Rac1 was not detected on E0 (data not shown) nor E50 film at 3, 4 and 7 hours after synchronization (Fig. 4Ad-f and Fig. 4B). In the presence of the inhibitor NSC23766, Rac1 was not detected at 3, 4 and 7 hours after synchronization (Fig. 4Ag-i and Fig. 4B). Interestingly, at 3, 4 and 7 hours after synchronization, the inhibition of Rac1 by the drug concomitantly obstructed vinculin (Fig. 4Aj-l and Fig. 4C), actin (Fig. 4Am-o and Fig. 4C) and replication on E200 film (Fig. 4Ap-r and Fig. 4D) or glass substrate (data not shown). These results strongly suggest that Rac1 could be a signaling pathway sequentially linking vinculin, formation of actin stress fibers and replication.

Uncoupled contribution from the substrate elasticity to the regulation of replication and transcription

In recent studies it was postulated that mechanical signals from the extracellular environment could be transduced to the nucleus via

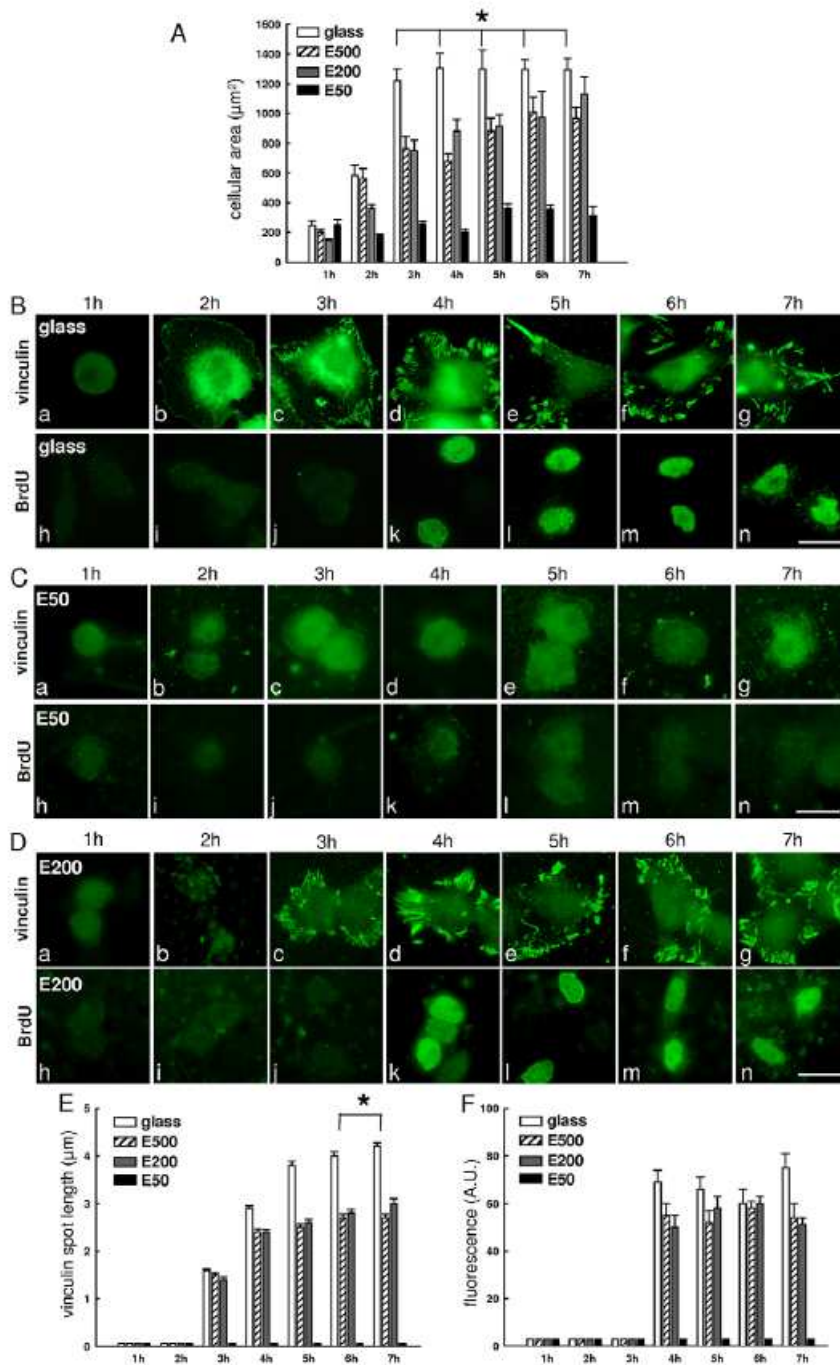


Fig. 3. Vinculin assembly and replication for different substrates with respect to mitotic synchronization. (A) Quantitative data of cell areas (in μm^2), based on Ba-g, Ca-g, Da-g and supplementary material Fig. S3Ba-g, were determined using ImageJ. 200-300 cells were used for each condition (E50, E200, E500 films and glass surface) for seven time periods. Results are presented as s.e.m. for three independent experiments; *statistically no significant difference ($P < 0.01$, ANOVA on rank). (B-D) Cells seeded on glass surface (B), E50 (C) and E200 (D) were fixed 1-7 hours after synchronization. Images show cells with anti-vinculin (a-g) and BrdU visualized by indirect immunofluorescence (h-n). Scale bar: 20 μm . (E) Quantification of vinculin spots (in μm), based on Ba-g, Ca-g, Da-g and supplementary material Fig. S3Ba-g, were obtained by measuring 20 contacts per cell for 20 post-mitotic cells (for seven time periods). Results are presented as s.e.m. for three independent experiments; *statistically not significant difference ($P < 0.05$, Dunn's method). (F) Fluorescence intensity for nuclear BrdU signal (arbitrary units, A.U. in %) using ImageJ, based on Bh-n, 3Ch-n, 3Dh-n and supplementary material Fig. S3Bh-n. Results were determined on 50 cells (for seven time periods) and are presented as s.e.m. for three independent experiments.

morphological changes. These changes can open or close areas of DNA near the transcription site (Dalby et al., 2007; Geni and Hendzel, 2008). With this in mind, it seemed appropriate to determine whether the stiffness of the substrate influences the transcriptional activity in the nucleus. Transcription sites were detected by labeling nascent transcripts with bromouridine (BrU). For somatic cells in culture, because transcription starts within minutes of completing mitosis and assembling daughter nuclei (Ferreira et al., 1994), the nascent RNA labeling method was applied to unsynchronized cells. Cells cultured for 4 hours on an E0 film

showed a total absence of transcription sites (Fig. 5Aa,B). On these substrates, the nuclei in these PTK2 cells were transcriptionally silent. By contrast, cells cultured on E50 films displayed sites of transcription uniformly distributed in the nucleus (Fig. 5Ac,B). The same observation holds for E200 and E500 substrates (Fig. 5Ae,g and Fig. 5B) and also for 0/2, 0/5 and 0/12 films and a glass surface (supplementary material Fig. S5Aa-d). To confirm the influence of substrate elasticity on the transcriptional competence observed in unsynchronized cells cultured on the E50, we also investigated actin-fiber organization and transcription for 4 hours post-synchronization

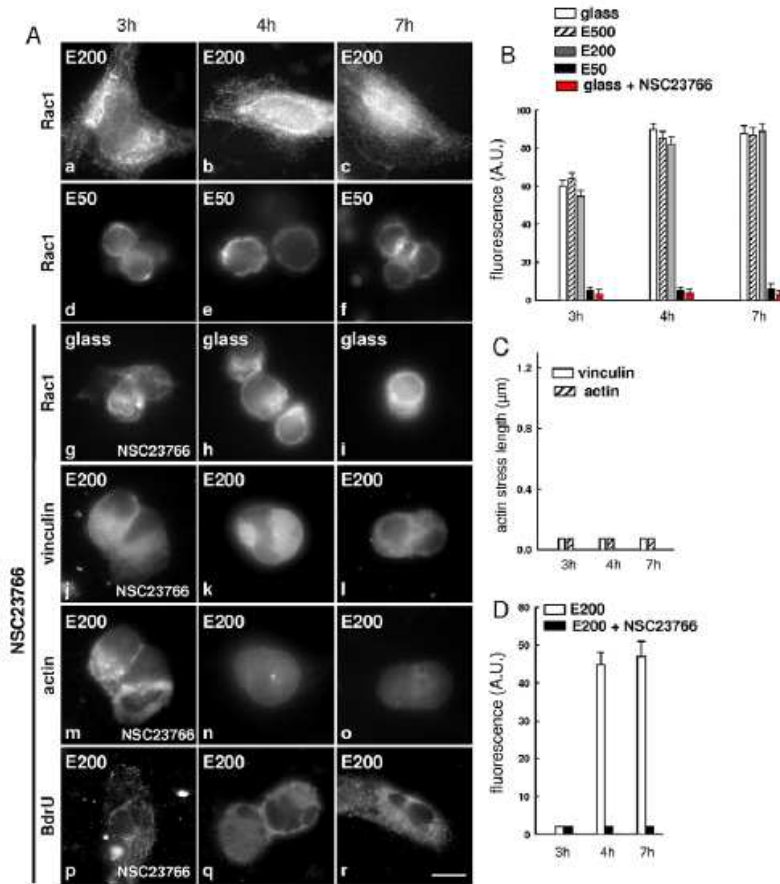


Fig. 4. Rac 1 activity with respect to elastic modulus. (A) Cells were seeded on E200, E50 and glass. Images show cells with anti-Rac1 (a-i), anti-vinculin (j-l), labeled with phalloidin (m-o), and BrdU visualized by indirect immunofluorescence (p-r). Cells were fixed 3, 4 and 7 hours after synchronization. For Rac1 inhibitor treatment, cells were cultured with 100 μM NSC 23766 (g-r) until their fixation. Scale bar: 20 μm. (B) Fluorescence intensity for Rac1 signal (arbitrary units, A.U. in %) using ImageJ, based on Aa-i. 200 cells per condition were analyzed. Results are presented as s.e.m. for two independent experiments. (C) Quantification of vinculin spots and actin stress (in μm), based on Aj-l and Am-o, respectively, obtained by measuring the length of 20 contacts per cell for 20 post-mitotic cells (for three time periods). Results are presented as s.e.m. for two independent experiments. (D) Fluorescence intensity for nuclear BrdU signal (arbitrary units, A.U. in %) using ImageJ, based on Ap-r; determined on 50 cells (for three time periods).

on the E50 substrate. Under these conditions, although formation of actin fibers was inhibited (Fig. 5Ca,D), cells displayed transcription sites uniformly distributed in the nucleus (Fig. 5Cb,D). Very importantly, this result shows that transcriptional activity does

not require the actin fiber cytoskeleton because it is absent on the E50 substrates. Furthermore, it does not require vinculin assembly and activation of FAK-Y397.

Nuclear transcriptional competence was also assessed following the nucleocytoplasmic distribution of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1). Indeed, hnRNP A1 involved in RNA processing (reviewed in Dreyfuss et al., 1993) is an indirect transcriptional marker because its nuclear accumulation is inhibited by the presence of RNA polymerase II transcription inhibitors, implying a link between transport and transcriptional activity (Piñol-Roma and Dreyfuss, 1991; Vautier et al., 2001). Cells cultured on E0 films showed that hnRNP A1 protein accumulated in cytoplasm

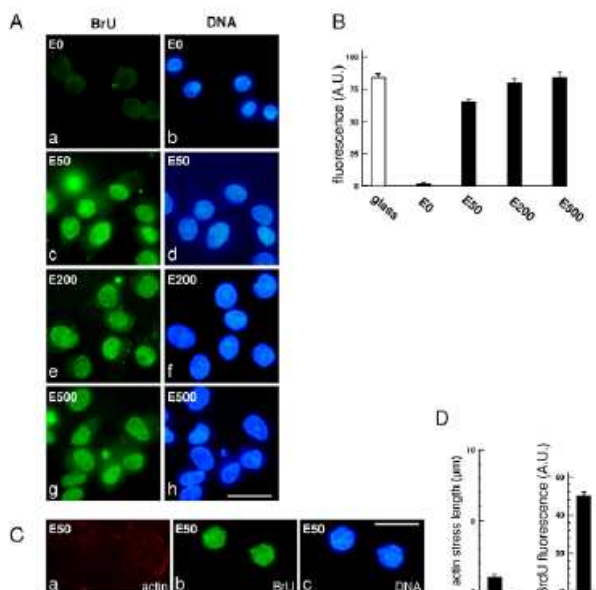


Fig. 5. Transcription with respect to substrate elasticity. (A) Cells cultured for 4 hours on E0, E50, E200 and E500 films with anti-BrU (a,c,e,g) and counterstained with Hoechst 33258 (b,c,f,h). Scale bar: 20 μm. (B) Fluorescence intensity for nuclear BrU signal (arbitrary units, A.U. in %) using ImageJ, based on Aa,c,e,g; 300 cells per condition were analyzed. Results are presented as s.e.m. for three independent experiments. (C) On E50 films, cells were fixed 4 hours after synchronization and labeled with phalloidin (a), immunolabeled with anti-BrU (b), and counterstained with Hoechst 33258 (c). Scale bar: 20 μm. (D) Quantification of actin stress (in μm) using ImageJ, based on image Ca, by measuring the length of 20 actin stress fibers per cell for 20 cells. Fluorescence intensity for nuclear BrdU signal (arbitrary units, A.U. in %) using ImageJ, based on Cb, determined on 50 cells. Representative results as s.e.m. from at least two independent experiments.

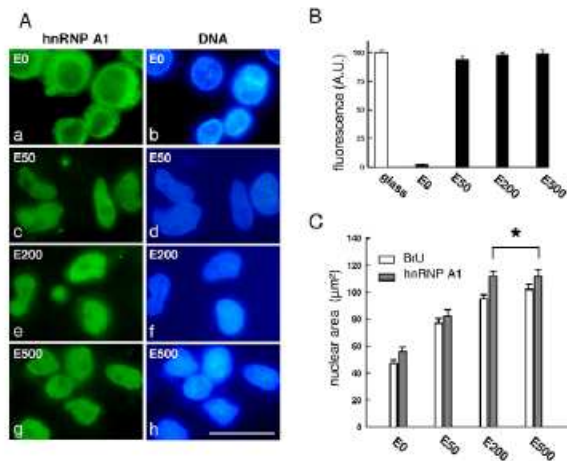


Fig. 6. hnRNP A1 nuclear concentration with respect to substrate elasticity. (A) Cells after 4 hours of culture on E0, E50, E200 and E500 cells with anti-hnRNP A1 (a,c,e,g) and counterstained with Hoechst 33258 (b,d,f,h). Scale bar: 20 µm. (B) Fluorescence intensity for nuclear hnRNP A1 signal (arbitrary units, A.U. in %) using ImageJ, based on Aa,c,e,g; 300 cells were analyzed per condition. Results are presented as s.e.m. for three independent experiments. (C) Quantitative data of nuclear area (in µm²) determined using ImageJ, based on images given in Fig. 5Ab,d,f,h and here in Ab,d,f,h. 400 cells were measured in each condition. Results are presented as s.e.m. for three independent experiments; *statistically no significant difference ($P < 0.05$, ANOVA).

of cells, yet it was not detected in the nucleus of interphase cells (Fig. 6Aa,B). By contrast, for cells cultured on E50, E200 and E500 films, the hnRNP A1 protein was concentrated within the nuclei (Fig. 6Ac,e,g and Fig. 6B). Similarly, cells cultured on 0/2, 0/5 and 0/12 films and on a glass surface showed that the hnRNP A1 protein was concentrated in the nucleus (data not shown). Because hnRNP A1 concentration in the nucleus is correlated with the observed transcription activation, the presence of hnRNP A1 in the nucleus might be substrate-stiffness-dependent. Transcription activation on the E50 films corresponded to that observed for replication inhibition, suggesting an uncoupled contribution from substrate elasticity to the regulation of replication and transcription activities.

Histone H3-K14 acetylation correlates with nuclei decondensation and transcription

It is also important to emphasize that the nucleus of cells adhering to E0 film remains very small (Fig. 6Ab,C, Fig. 7Ac) with highly condensed chromatin. In addition, fluorescent phosphatidylserine assays to directly count apoptotic cells showed a high intensity of phosphatidylserine and caspase-3 signal on the soft substrate E0 (Fig. 7Aa,B, supplementary material Fig. S5Ba, supplementary material Fig. S5C). These types of cell characteristics are prone to apoptosis. By contrast, increasing substrate stiffness (E50, E200 and E500 film substrates) leads to an increase in nuclear area (Fig. 6Ad,f,h, Fig. 7Af,i,l, Fig. 6C) with absence of phosphatidylserine (Fig. 7Ad,g,j and Fig. 7B) and caspase-3 signal (supplementary material Fig. S5Bc,e,g, supplementary material Fig. S5C) and correlates with the acquisition of transcriptional competence (Fig. 5Ac,e,g,B for BrU; Fig. 6Ac,e,g,B for hnRNP A1).

One question that arises from these observations is how an increase in the substrate stiffness renders the nuclei competent for

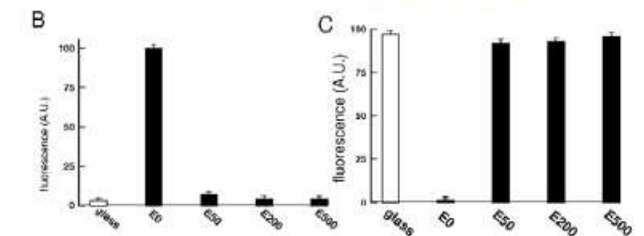
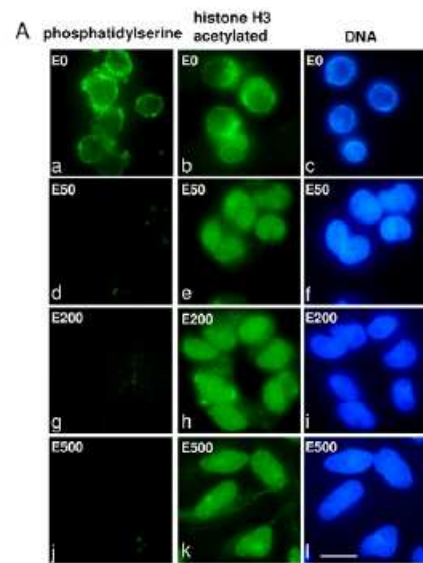


Fig. 7. Histone H3-K14 acetylation versus substrate elasticity. (A) After 4 hours of culture on E0, E50, E200 and E500 films, cells were tested with the apoptosis kit (a,d,g,j) and immunolabeled with anti-histone H3-K14 (b,e,h,k) and counterstained with Hoechst 33258 (c,f,i,l). Scale bar: 20 µm.

(B) Fluorescence intensity for phosphatidylserine signal (arbitrary units, A.U. in %) using ImageJ, based on Aa,d,g,j. (C) Fluorescence intensity for nuclear histone H3-K14 signal (arbitrary units, A.U. in %) using ImageJ, based on Ab,e,h,k; 300 cells were analyzed in B and C. Results are presented as s.e.m. for two independent experiments.

transcriptional activity. Histone H3 hyperacetylation in its promoter region and other regulatory *cis*-elements are well known to be transcription-permissive (Kurdistani et al., 2004). Thus, we checked whether substrate elasticity affected histone H3 hyperacetylation activity in relationship to nuclei transcriptional competence. Immunofluorescence analyses of cells cultured for 4 hours on the soft substrate E0 showed absence of nuclear acetylated histone H3 (Fig. 7Ab,C). By contrast, on E50, E200 and E500 substrates, acetylated forms of histones H3 were detected (Fig. 7Ae,h,k, and Fig. 7C) within less dense nuclei (Fig. 7Af,i,l). These data suggest that substrates of increased stiffness (above 50 kPa) induced histone H3 acetylation and are closely correlated both with nuclei decondensation and cell transcriptional competence.

Discussion

All the results reported above are summarized schematically in Fig. 8. Cell internal architecture, via its highly dynamic interaction with the ECM, is able to sense mechanical environmental cues and to induce specific biochemical signals. Recently, 2D and 3D culture matrices, with elastic moduli comparable to those of *in vivo* tissues,

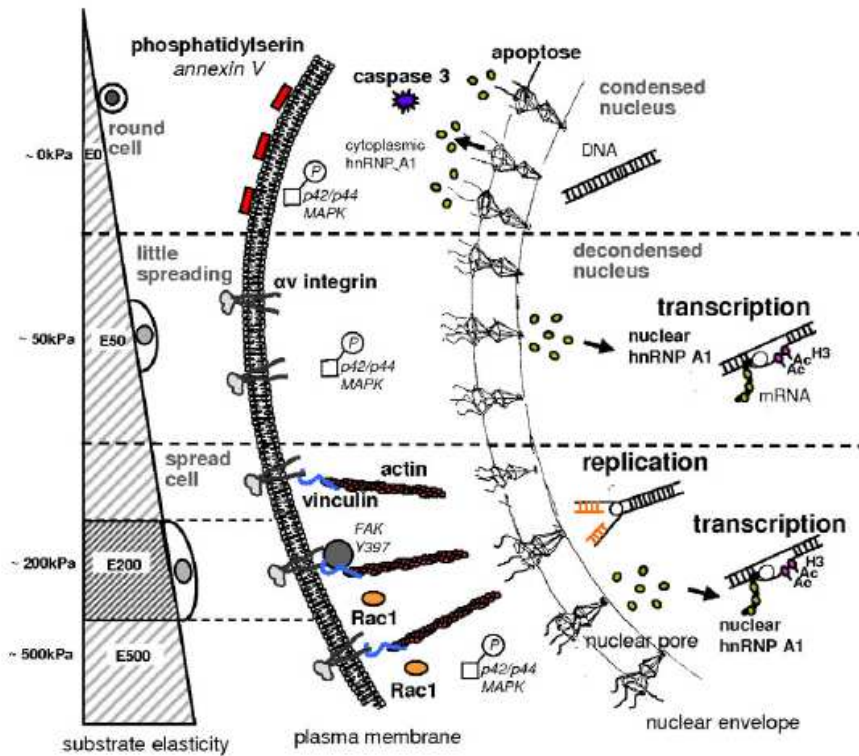


Fig. 8. Cartoon summarizing the uncoupled contribution of substrate elasticity in regulation of replication and transcription in PtK2 cells. Substrate stiffness of 500 kPa does not interfere with vinculin FA assembly or MAPK phosphorylation, but induces inhibition of FAK phosphorylation. This demonstrates that replication and transcription are dispensed from these signals (E500). In response to a substrate with a stiffness of 200 kPa: (i) FAK and MAPK are activated; (ii) transcription activity and hnRNPA1 nuclear concentration both correlate with histone H3 acetylation and DNA decondensation; and (iii) a sequential relationship between Rac1, vinculin adhesion assembly and replication becomes efficient (E200). Substrate stiffness corresponding to 50 kPa inhibits FAK phosphorylation, Rac1, vinculin assembly and stress fiber formation. The absence of actin fiber and vinculin contacts inhibits replication but does not affect transcription (E50). Soft substrate (0 kPa) is a non-permissive system for which all the nuclear functions are inhibited and cells are apoptotic (E0).

were proposed (Levental et al., 2007). Until now, it remains unclear whether substrate stiffness affects major nuclear functions such as replication and transcription through mechano-transduction pathways. In the present study, we investigated the potential role of substrate stiffness in these fundamental nuclear functions and tried to establish a possible correlation with FA signaling. We used (PLL/HA)₂₄ films capped by (PSS/PAH)_n layers to build synthetic matrices of defined stiffness (E_{ap} of 0-500 kPa) (Francius et al., 2007). We demonstrated that the amount of FBS deposited on the surface does not depend of the number of polyelectrolyte multilayers. Because only the rigidity changes between the different polyelectrolyte multilayers used in this study, the film stiffness is probably at the origin of the cell adhesion processes. This hypothesis agrees with a recent study, demonstrating that MDCK cells can sense the substratum rigidity to a sufficient extent to induce β 1-integrin activation and clustering, allowing actin organization and downstream activation events to occur (Wei et al., 2008). In our present study, low rigidity above 50 kPa is sufficient for α v-integrin engagement, allowing little cell spreading.

Vinculin assembly and formation of actin stress fibers were inhibited when cells were cultured on E0 and E50 films. This is consistent with the general changes in cell FA assembly observed as matrix stiffness increases (Ren et al., 2008). However, to illustrate this cellular effect, E_{ap} values measured for our substrate model are tenfold higher than values found for polyacrylamide gels. For example, FAs and organization of the cytoskeleton were induced for mesenchymal stem cells at stiffness values of 34 kPa (Engler et al., 2006). These differences could be due to the stratified geometry of our substrate not being as isotropic as polyacrylamide gels. In addition, we could not exclude flow and creep phenomena of the film, and also a lateral cell pulling over several microns. It

was previously reported that tyrosine phosphorylation increased at the adhesion sites of cells on stiff surfaces (Pelham and Wang, 1997; Giannone and Sheetz, 2006) and that the level of FAK-Y397 phosphorylation was progressively dependent on substratum rigidity (particularly at 390 Pa) on polyacrylamide gel for MDCK (Wei et al., 2008). In the present system, FAK-Y397 was only phosphorylated at around 200 kPa (E200) and again activated on the hard substratum (0/2, 0/5 and 0/12 and glass surfaces). These rigid materials (like culture plastic) are well known to favor the activation of many cell functions. Non-linear cell responses have already been described, whereby small changes in the matrix stiffness led to dramatic changes in the cell phenotype. For instance, mesenchymal stem cells expressed MyoD and CBF α -1 for rigidities of 11 kPa and 34 kPa, respectively (Engler et al., 2006). For the particular cell type and substrate model used here, FAK-Y397 was sensitive to small changes in the substrate stiffness, at least in the low-elasticity domain (0-500 kPa). This observation suggests that PtK2 epithelial cells possess an optimal window of elasticity for FAK-Y397 activation.

Using synchronized mitotic cells, we found that for the E50 substrate the inhibition of vinculin assembly is accompanied by inhibition of replication. To gain mechanistic insight into these two activities, the effect of an inhibitor (NSC23766) of the Rac1 candidate signaling pathway was investigated in cells synchronized by mitotic shake-off. Inhibition of Rac1 by this drug concomitantly obstructed vinculin assembly, actin stress and initiation of replication. Interestingly, like NSC23766, E50 substrate also inhibits Rac1 activity. Thus, we propose a sequential relationship between Rac1, vinculin assembly and replication becoming efficient at a critical elasticity (above 200 kPa). Our results differed from other investigations that used cytochalasin D to

disrupt post-mitotic actin fibers. Those authors found that actin disruption leads to inhibition of FA assembly and FAK-Y397 autophosphorylation without inhibiting entry into S phase. This could be attributable to the pre-existing cyclin D that was sufficient to drive cell-cycle progression past the M-G1 border (Margadant et al., 2007; Assoian, 1997).

During the cell cycle, natural regulation of replication and transcription occurs. In S phase both replication and transcription are active (low transcriptional activity). During gene expression, transcription sites play a role in chromatin opening, allowing the transcriptional machinery access to specific DNA sequences to initiate replication (Hassan et al., 1994; Kohzaki et al., 2005). It is important to emphasize that soft substrates induce, throughout the time period normally required to S-phase onset, an uncoupled replication-transcription response: transcription sites are visualized whereas replication is inhibited. In this range of elasticity, it is possible that the transcriptional machinery alone is not sufficient to initiate replication but requires at least the contribution of actin fiber and vinculin structures. Transcription was inhibited on the very soft substrates (E0) whereas it was active on stiffer substrates (E50). We demonstrated that above about 50 kPa, transcription was correlated with α v-integrin engagement, together with low cell spreading and with increases in nuclear area and histone H3 hyperacetylation (Rose et al., 2005). Our data are in accordance with a recent study demonstrating that three-dimensional ECM-induced cell rounding directly controls histone deacetylation and chromatin condensation in mammary epithelial cells (Le Beyec et al., 2007). In that work, disruption of the actin cytoskeleton with cytochalasin D induced cell rounding and histone deacetylation. This result strengthens the concept that actin forms a physical connection between sites of cell adhesion and the ECM, transducing mechanical signals to the interior of the nucleus (Le Beyec et al., 2007). In our present work, it is clear that substrate elasticity plays a role in the transcription competence, suggesting a connection between substrate and nucleus. However, in our system, this connection dispenses with the need for actin fibers and vinculin structures. Other physical pathways could be involved in coordinating this activity. In addition, below 50 kPa, the nucleus is strongly condensed and cells are apoptotic. Kim and co-workers demonstrate that apoptosis acts as a transcriptional repressor (Kim et al., 2004). Thus, relationship between substrate elasticity, apoptotic cellular processes and transcription can be suggested.

Conclusion

In this work, relationships between substrate elasticity with replication and transcription were investigated. Soft substrate (E0) is a non-permissive system because all the nuclear functions are inhibited and cells are apoptotic. Cell adhesion, in response to a substrate with a stiffness of 200 kPa, enables integrin activation. Sequential relationship between Rac1, vinculin adhesion assembly and replication becomes efficient and accompanied by activation of FAK and MAPK, activation of transcription, hnRNP A1 nuclear accumulation and histone H3 acetylation correlated with chromatin decondensation. Substrate stiffness corresponding to 500 kPa does not interfere with vinculin assembly or MAPK phosphorylation, but does inhibit FAK phosphorylation, suggesting that this signal is not necessary for replication and transcription. Substrate stiffness corresponding to 50 kPa inhibits FAK, Rac1 activity, vinculin assembly and actin fiber formation, leading to the inhibition of replication, but it does not affect transcription, hnRNP A1 nuclear concentration and histone H3 acetylation correlated with chromatin

decondensation and integrin activation. On the basis of our data, we propose an uncoupled contribution of substrate elasticity to the regulation of replication and transcription. However, the selective properties for particular substrate elasticity are probably cell-type-dependent. For example, neuronal cells express a specific phenotype marker at an elasticity value of several hundred pascals, whereas tendon and cartilage do so at a megapascal value (Levental et al., 2007). It is highly probable that substrate elasticity plays a selective role in these nuclear activities so important in tissue homeostasis. The physiological significance of these nuclear activities in the regulation of apoptosis, differentiation and the propensity for tumorigenesis still needs further investigations.

Materials and Methods

Polyelectrolytes

PLL (MW=5.7×10⁴ Da, Sigma, St Quentin Fallavier, France), fluorescein isothiocyanate labeled poly(L-lysine) (PLL^{FITC}, MW=5.0×10⁴ Da, Sigma) and HA (MW=4.0×10⁵ Da, Biolberica, Barcelona) were used for buildup of (PLL/HA)_n films. PSS (MW=7.0×10⁴ Da, Sigma), rhodamine-labeled PSS (PSS^{Rho}, MW=5.0×10⁴ Da, Sigma) and PAH (MW=7.0×10⁴ Da, Sigma) were used for buildup of (PSS/PAH)_n top films (where *n* corresponds to the number of layer pairs), which were deposited on (PLL/HA)_n stratum. PLL, PLL^{FITC}, HA, PSS, PSS^{Rho}, and PAH were dissolved at 1 mg/ml in buffer solution containing 150 mM NaCl and 20 mM of tris(hydroxymethyl)-aminomethane (TRIS, Merck) at pH 7.4. During film construction, all rinsing steps were performed with 150 mM NaCl and 20 mM TRIS aqueous solution at pH 7.4. (PLL/HA)_n strata were prepared using dipping machine (Dipping Robot DR3, Riegler & Kirstein, Berlin, Germany), on glass slides (VWR Scientific, Fontenay sous Bois, France). (PSS/PAH)_n top films were prepared manually.

Film characterization

CLSM observations were performed with Zeiss LSM 510 microscope using 40× 1.4 oil immersion lens. FITC-fluorescence was detected after excitation at 488 nm with cut-off dichroic mirror 488 nm and emission band-pass filter 505-530 nm. Rhodamine fluorescence was detected after excitation at 543 nm, dichroic mirror 543 nm, and emission long pass filter 585 nm.

Quartz crystal microbalance

QCM consists in measuring resonance frequency (*f*) of quartz crystal after polyelectrolyte adsorption, in comparison with resonance frequency of crystal. Crystal used here is coated with 50-nm thick SiO₂. Crystal is excited at its frequency and measurements at frequency of 15 MHz (third overtone, *v*=3). Changes in resonance frequency, Δf , during each adsorption step are measured. A shift in Δf can be associated with variation of mass adsorbed on crystal. This mass *m* was calculated by the Sauerbrey relation $m = -C(\Delta f/v)$, where *C* is a constant characteristic of crystal ($C = 17.7 \text{ ng cm}^{-2} \text{ Hz}^{-1}$) (Sauerbrey, 1959). We monitored deposition of 10% FBS on bare crystal and on polyelectrolyte multilayer.

Cell and synchronization

PIK2 cells (CCL-56, LGC Standards, UK) were grown in RPMI-1640 medium (Invitrogen) supplemented with 100 µg/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen), and 10% FBS (Invitrogen), and maintained at 37°C with 5% CO₂. Cells were synchronized by mechanical shake-off. Three days prior to synchronization, cells were replated at 1.2×10⁶ per cm². Mitotic cells were centrifuged (700 g, 5 minutes), resuspended in culture medium, and replated at 1.2×10⁶ per cm² from surfaces. For Rac1 inhibitor treatment, cells were cultured with 100 µM NSC 23766 for 0-7 hours after synchronization.

Cell adhesion

MTT test

Cells were plated on multilayered or bare glass samples placed in 24-well plates (Nunc) at 1×10⁵ per cm². After 4 hours of culture, non-attached cells were removed by two washes with 37°C phosphate-buffered saline (PBS). Plates were incubated with 500 µl per well of MTT solution (0.1% w/v 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide in PBS) and incubated for 180 minutes at 37°C. Medium was displaced by 500 µl DMSO. OD was measured at 570 nm.

Acid phosphatase assay

Cells were seeded on multilayered or bare glass samples placed in 24-well plates (Nunc) at 1×10⁵ per cm². After 4 hours of culture, unattached cells were removed after two washes with PBS at 37°C and incubated with *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma, Steinheim) at 1 mg ml⁻¹ in 0.1 M sodium acetate (pH 5.5) and 0.1% Triton X-100 for 3 hours at 37°C in 5% CO₂. Reaction was stopped by 1 N sodium hydroxide. Absorbance was measured at 405 nm. A value of 100% was ascribed to the acid phosphatase activity of cells on glass.

Immunolabeling

Cells were seeded on surfaces (multilayered films or bare glass samples placed in 24-well plates (Nunc) at 1×10^5 (asynchronous) or 1.2×10^4 per cm^2 (synchronized). Cells were fixed in 3.7% (w/v) paraformaldehyde (PFA) in PBS for 15 minutes, and fixed/permeabilized in 3.7% (w/v) PFA in PBS plus 0.1% Triton X-100 for 10 minutes. Cells were blocked with 10% decomplexed FBS (Invitrogen). For measurement of α -integrin, vinculin and hnRNP A1, cells were incubated with α -integrin (1:100; Santa Cruz Biotechnology), anti-vinculin (1:100; clone hVin-1, Sigma) and anti-hnRNP A1 (1:100; clone 9H10, Abcam). After washings with PBS, cells were incubated with FITC-conjugated secondary antibody (1:500; AnaSpec, Fremont, CA). For acetyl-histone H3, cells were incubated with anti-acetyl-histone-H3-Lys14 (1:100; Millipore) and then incubated with FITC- or TRITC-conjugated secondary antibody (1:500; AnaSpec). For Rac1, cells were incubated with anti-Rac1 (1:100, Millipore), for caspase-3, with anti-caspase-3 (1:50, Cell Signaling), for actin staining with TRITC-phalloidin ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$; Sigma), and for DNA with Hoechst 33258 ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$, Sigma).

Replication

Cells were seeded on surfaces at 1×10^5 (asynchronous) or 1.2×10^4 per cm^2 (synchronized). Cells were incubated with BrdU for 15 minutes (37°C) (1:500; RPN 201, GE Healthcare Europe). Cells were fixed/permeabilized in 3.7% PFA in PBS plus 0.5% Triton X-100 for 15 minutes. After washing with PBS, cells were incubated with anti-BrdU and DNase for 1 hour at 37°C (1:100; RNP 202, GE Healthcare Europe). After washings with PBS, cells were incubated with FITC-conjugated secondary antibody (1:500; AnaSpec).

Transcription

Cells were seeded on surfaces: 1×10^5 (asynchronous) or 1.2×10^4 per cm^2 (synchronized), and washed in PB buffer (100 mM $\text{CH}_3\text{-COOK}$, 30 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 1 mM ATP, pH 7.4) on ice and incubated with 0.05% Triton X-100 in phosphate buffer (PB) for 2 minutes on ice. Cells were washed with PB, then cells were incubated with transcription mix (0.1 mM CTP, 0.1 mM UTP and 0.1 mM GTP in PB) containing 0.1 mM BrU (Sigma) for 20 minutes at 33°C . Then, cells were washed with PB and permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PB for 3 minutes. Cells were fixed with 3.7% PFA in PB for 15 minutes followed by washing in PB. Cells were washed in PBS and the incorporated Br-UTP was detected using anti-BrdU (1:100; monoclonal anti-BrdU, clone BY-33, Sigma). Cells were incubated with FITC-conjugated secondary antibody (1:500; AnaSpec).

Apoptosis

Cells were seeded at 1×10^5 or 1.2×10^4 per cm^2 . Annexin V binding was carried out using the Vybrant Apoptosis Assay Kit (Molecular Probes) according to the manufacturer's instructions. Cells were analyzed by fluorescence microscopy.

Microscopy

Samples were mounted in VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Fluorescence was visualized with Nikon Elipse TE200 (objective lenses $63 \times 1.4 \text{ NA}$). Images were acquired with Nikon Digital Camera (DXM 1200 or DS-Q11MC with ATC-1 or NIS-Elements softwares). Pictures were processed with ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Western blot

Cells were seeded on surfaces (Nunc) at 2×10^5 per cm^2 and incubated for 4 hours in culture medium at 37°C and at end of incubation treated with 1% of 0.2 M sodium orthovanadate (Sigma). Cells were lysed in 20 mM Tris-base, pH 8, 0.15 M NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 10% glycerol, 1 mM sodium orthovanadate containing 1% of protease inhibitor cocktail; Sigma). Extraction mixtures were rocked at 4°C for 1 hour and centrifuged (5 minutes, 7000 g at 4°C). Protein concentration was determined using DC protein assay (BioRad). Equal amounts of total protein extracts were subjected to SDS PAGE (NuPAGE, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and transferred onto nitrocellulose membranes (Iblot Transfer Stack, Invitrogen) blocked in T-TBS (0.1% Tween 20, 50 mM Tris-base, pH 7.6, 0.15 M NaCl) containing 1% BSA (Euromedex, France) and probed overnight at 4°C with primary antibody: FAK-Y397-P (1:1000; BD Transduction laboratories, Lexington, KY), FAK (1:1000; Santa Cruz Biotechnology), phosphorylated p44/p42 MAPK (1:2000; Cell Signaling), p44/p42 MAPK (1:1000; Cell Signaling, USA). Blots were incubated for 2 hours with HRP-conjugated anti-rabbit, anti-mouse antibodies (1:5000; GE Healthcare). Bands were detected using an enhanced chemiluminescence (ECL) kit (GE Healthcare). Autoradiographs were quantified with Kodak Digital Science 10 Software. Representative mean values were of at least three independent experiments with standard errors (four time-points per band). A value of 1 was attributed to cells on glass.

We are indebted Jean-Noël Freund (INSERM U682, Strasbourg, France) and Ludovic Richert (CNRS 7213, Faculté de Pharmacie, Strasbourg, France) for stimulating discussions, and Christian Ringwald (INSERM U977) for QCM experiments. The study was supported by Grants from Agence Nationale de la Recherche (Tescan, 'Subvacel

Project') and 'Cancéropôle du Grand Est'. P.L. is indebted to Hôpitaux Universitaires de Strasbourg for financial support. We are grateful to Jérôme Mutterer of Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, CNRS/Université de Strasbourg, France for his contribution with CLSM. The CLSM platform used in this study was co-financed by Région Alsace, Université de Strasbourg, and Association pour la Recherche sur le Cancer. L.K. is indebted to Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg, for financial support.

Supplementary material available online at

<http://jcs.biologists.org/cgi/content/full/123/1/29/DC1>

References

- Assoian, R. K. (1997). Anchorage-dependent cell cycle progression. *J. Cell Biol.* **136**, 1-4.
- Balby, M. J., Gadegaard, N., Herzyk, P., Sutherland, D., Agheli, H., Wilkinson, C. D. and Curtis, A. S. (2007). Nanomechanotransduction and interphase nuclear organization influence on genomic control. *J. Cell Biochem.* **102**, 1324-1344.
- Biggs, M. J., Richards, R. G., Gadegaard, N., Wilkinson, C. D. and Dalby, M. J. (2007). Regulation of implant surface cell adhesion: characterization and quantification of S-phase primary osteoblast adhesions on biomimetic nanoscale substrates. *J. Orthop. Res.* **25**, 273-282.
- Boura, C., Muller, S., Vautier, D., Dumas, D., Schaaf, P., Voegel, J. C., Stoltz, J. F. and Menu, P. (2005). Endothelial cell-interactions with polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials* **22**, 4568-4575.
- Burridge, A. D. and Wennerberg, K. (2004). Rho and Rac take center stage. *Cell* **116**, 167-179.
- Decher, G. (1997). Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science* **277**, 1232-1237.
- Discher, D. E., Jaume, P. and Wang, Y. L. (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* **310**, 1139-1143.
- Dreyfuss, G., Matunis, M. J., Piñol-Roma, S. and Burd, C. G. (1993). hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 289-321.
- Dubreuil, F., Elsner, N. and Fery, A. (2003). Elastic properties of polyelectrolyte capsules studied by atomic-force microscopy and RICM. *Eur. Phys. J. E* **12**, 215-221.
- Engler, A. J., Griffin, M. A., Sen, S., Bonnemann, C. G., Sweeney, H. L. and Discher, D. E. (2004). Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J. Cell Biol.* **166**, 877-887.
- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. and Discher, D. E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **126**, 677-689.
- Engler, A. J., Carag-Krieger, C., Johnson, C. P., Raab, M., Tang, H. Y., Speicher, D. W., Sanger, J. W., Sanger, J. M. and Discher, D. E. (2008). Embryonic cardiomyocytes beat best on a matrix with heart-like elasticity: scar-like rigidity inhibits beating. *J. Cell Sci.* **121**, 3794-3802.
- Ferreira, J. A., Carmo-Fonseca, M. and Lamond, A. I. (1994). Differential interaction of splicing snRNPs with coiled bodies and interchromatin granules during mitosis and assembly of daughter cell nuclei. *J. Cell Biol.* **126**, 11-23.
- Ferreira, J., Paoletta, G., Ramos, C. and Lamond, A. I. (1997). Spatial organization of large-scale chromatin domains in the nucleus: a magnified view of single chromosome territories. *J. Cell Biol.* **139**, 1597-1610.
- Francius, G., Hemmerlé, J., Ohayon, J., Schaaf, P., Voegel, J. C., Picart, C. and Senger, B. (2006). Effect of crosslinking on the elasticity of polyelectrolyte multilayer films measured by colloidal probe AFM. *Microsc. Res. Tech.* **69**, 84-92.
- Francius, G., Hemmerlé, J., Ball, V., Lavalle, P., Picart, C., Voegel, J. C., Schaaf, P. and Senger, B. (2007). Stiffening of soft polyelectrolyte architectures by multilayer capping evidenced by viscoelastic analysis of AFM indentation measurements. *J. Phys. Chem. C* **111**, 8299-8306.
- Garza, J. M., Schaaf, P., Muller, S., Ball, V., Stoltz, J. F., Voegel, J. C. and Lavalle, P. (2004). Multicompartiment films made of alternate polyelectrolyte multilayers of exponential and linear growth. *Langmuir* **20**, 7298-7302.
- Georges, P. C., Miller, W. J., Meaney, D. F., Sawyer, E. S. and Janney, P. A. (2006). Matrices with compliance comparable to that of brain tissue select neuronal over glial growth in mixed cortical cultures. *Biophys. J.* **90**, 3012-3018.
- Giannone, C. and Sheetz, M. P. (2006). Substrate rigidity and force define form through tyrosine phosphatase and kinase pathways. *Trends Cell Biol.* **16**, 213-223.
- Gieni, S. and Hendzel, M. J. (2008). Mechanotransduction from the ECM to the Genome: are the pieces now in place? *J. Cell Biochem.* **104**, 1964-1987.
- Gross, I., Duluc, I., Benameur, T., Calou, A., Martin, E., Brabletz, T., Kedinger, M., Domon-Dell, C. and Freund, J. N. (2008). The intestine-specific homeobox gene Cdx2 decreases mobility and antagonizes dissemination of colon cancer cells. *Oncogene* **27**, 107-115.
- Hassan, A., Errington, R. J., White, N. S., Jackson, D. A. and Cook, P. R. 1994. Replication and transcription sites are colocalized in human cells. *J. Cell Sci.* **107**, 425-434.
- Huang, C., Jacobson, K. and Schaller, M. D. (2004). MAP kinases and cell migration. *J. Cell Sci.* **117**, 4619-4628.
- Kim, W., Kook, S., Kim, D. J., Teodorof, C. and Song, W. K. (2004). The 31-kDa caspase-generated cleavage product of p130cas functions as a transcriptional repressor of E2A in apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 8333-8342.
- Kohzaki, H. and Murakami, Y. (2005). Transcription factors and DNA replication origin selection. *BioEssays* **27**, 1107-1116.

- Kornberg, L. J., Earp, H. S., Turner, C. E., Prochop, C. and Juliano, R. L. (1991). Signal transduction by integrins: increased protein tyrosine phosphorylation caused by clustering of beta 1 integrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8392-8396.
- Kurdistani, S. K., Tavazoie, S. and Grunstein, M. (2004). Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. *Cell* **117**, 721-733.
- Le Beyec, J., Wu, R., Lee, S. Y., Nelson, C. M., Rizki, A., Alcaraz, J. and Bissell, M. J. (2007). Cell shape regulates global histone acetylation in human mammary epithelial cells. *Exp. Cell Res.* **313**, 3066-3075.
- Levental, I., Georges, P. C. and Janmey, P. A. (2007). Soft biological materials and their impact on cell function. *Soft Matter* **3**, 299-306.
- Lo, C. M., Wang, H. B., Dembo, M. and Wang, Y. L. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys. J.* **79**, 144-152.
- Margadant, C., van Opstal, A. and Boonstra, J. (2007). Focal adhesion signalling and actin stress fibers are dispensable for progression through the ongoing cell cycle. *J. Cell Sci.* **120**, 66-76.
- Maxwell, C. A. and Hendzel, M. J. (2001). The integration of tissue structure and nuclear function. *Biochem. Cell Biol.* **79**, 267-274.
- Mendelsohn, J. D., Yang, S. Y., Hiller, Y., Hochbaum, A. I. and Rubner, M. F. (2003). Rational design of cytophilic and cytophobic polyelectrolyte multilayer thin films. *Biomacromolecules* **4**, 96-106.
- Meredith, D. O., Owen, G. R., ap Gwynn, I. and Richards, R. G. (2004). Variation in cell-substratum adhesion in relation to cell cycle phases. *Exp. Cell Res.* **293**, 58-67.
- Mitchison, J. M. (1971). The biology of the cell cycle. Cambridge University Press: Cambridge.
- Nobes, C. D. and Hall, A. (1995). Rho, Rac and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, Lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62.
- Pardee, A. B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* **246**, 603-608.
- Paszek, M. J., Zahir, N., Johnson, K. R., Lakins, J. N., Rozenberg, G. I., Gfenu, A., Reinhart-King, C. A., Margulies, S. S., Dembo, M., Boettiger, D. et al. (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* **8**, 241-254.
- Pelham, R. J., Jr and Wang, Y. L. (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13661-13665.
- Picart, C., Senger, B., Sengupa, K., Dubreuil, F. and Fery, A. (2007). Measuring mechanical properties of polyelectrolyte multilayer thin films: novel methods based on AFM and optical techniques. *Colloids and Surfaces A* **303**, 30-36.
- Piñol-Roma, S. and Dreyfuss, G. (1991). Transcription-dependent and transcription-independent nuclear transport of hnRNP proteins. *Science* **253**, 312-314.
- Ren, K. F., Crouzier, T., Roy, C. and Picart, C. (2008). Polyelectrolyte multilayer films of controlled stiffness modulate myoblast cell differentiation. *Adv. Funct. Mater.* **18**, 1378-1389.
- Richert, L., Engler, A. J., Discher, D. E. and Picart, C. (2004). Elasticity of native and cross-linked polyelectrolyte multilayer films. *Biomacromolecules* **5**, 1908-1916.
- Rizzi, S. C., Ehrbar, M., Halstenberg, S., Raeber, G. P., Schmoekel, H. G., Hagemuller, H., Muller, R., Weber, F. E. and Hubbell, J. A. (2006). Recombinant protein-co-PEG networks as cell-adhesive proteolytically degradable hydrogel matrixes. Part II: Biofunctional characteristics. *Biomacromolecules* **7**, 3019-3029.
- Roovers, K. and Assoian, R. K. (2003). Effects of rho kinase and actin stress fibers on sustained extracellular signal-regulated kinase activity and activation of G(1) phase cyclin-dependent kinases. *Mol. Cell Biol.* **23**, 4283-4294.
- Rose, J. L., Huang, H., Wray, S. F. and Hoyt, D. G. (2005). Integrin engagement increases histone H3 acetylation and reduces histone H1 association with DNA in murine Lung endothelial cells. *Mol. Pharmacol.* **68**, 439-446.
- Sauerbrey, G. Z. (1959). Verwendung von Schwingquartzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Phys.* **155**, 206-222.
- Schaller, M. D., Hildebrand, J. D. and Parsons, J. T. (1999). Complex formation with focal adhesion kinase: a mechanism to regulate activity and subcellular localization of Src kinases. *Mol. Biol. Cell* **10**, 3489-3505.
- Snedeker, J. G., Barbezat, M., Niederer, P., Schmidlin, F. R. and Farshad, M. (2005). Strain energy density as a rupture criterion for the kidney: impact tests on porcine organs, finite element simulation, and a baseline comparison between human and porcine tissues. *J. Biomech.* **38**, 993-1001.
- Shimi, T., Pflieger, K., Kojima, S., Pack, C. G., Solovei, I., Goldman, A. E., Adam, S. A., Shumaker, D. K., Kinjo, M., Cremer, T. et al. (2008). The A- and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription. *Genes Dev.* **22**, 3409-3421.
- Vautier, D., Chesné, P., Cunha, C., Calado, A., Renard, J. P. and Carmo-Fonseca, M. (2001). Transcription-dependent nucleocytoplasmic distribution of hnRNP A1 protein in early mouse embryos. *J. Cell Sci.* **114**, 1521-1531.
- Wang, F., Weaver, V. M., Petersen, O. W., Larabell, C. A., Dedhar, S., Briand, P., Lupu, R. and Bissell, M. J. (1998). Reciprocal interaction between α 1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14821-14826.
- Wang, N., Tytell, J. D. and Ingber, D. E. (2009). Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 75-82.
- Wei, W. C., Lin, H. H., Shen, M. R. and Tang, M. J. (2008). Mechanosensing machinery for cells under low substratum rigidity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **295**, 1579-1589.
- Wong, J. Y., Velasco, A., Rajagopalan, P. and Pham, Q. (2003). Directed movement of vascular smooth muscle cells on gradient-compliant hydrogels. *Langmuir* **19**, 1908-1913.
- Wozniak, M. A., Desai, R., Solzki, P. A., Der, C. J. and Keely, P. J. (2003). ROCK-generated contractility regulates breast epithelial cell differentiation in response to the physical properties of a three-dimensional collagen matrix. *J. Cell Biol.* **163**, 583-595.
- Yeung, T., Georges, P. C., Flanagan, L. A., Marg, B., Ortiz, M., Funaki, M., Zahir, N., Ming, W., Weaver, V. and Janmey, P. A. (2005). Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal, and adhesion. *Cell Motil. Cytoskeleton* **60**, 24-34.

3.3 Résultats supplémentaires

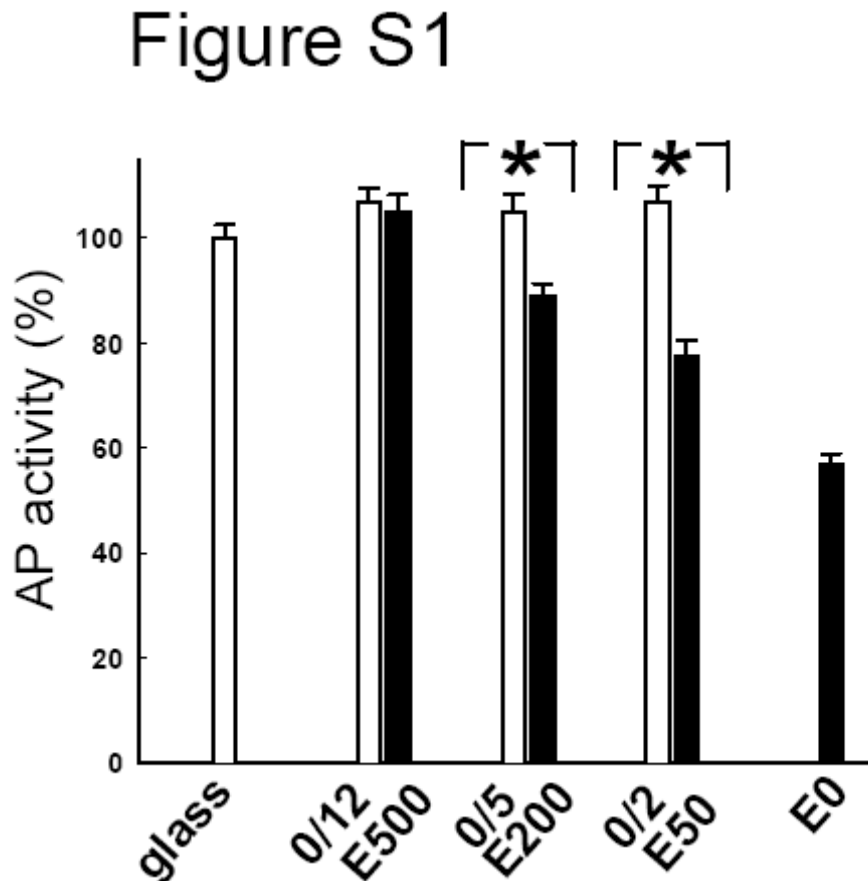


Fig. S1. Adhesion of cells either deposited on glass surface (glass) or on E0, E50, E200, E500, 0/2, 0/5 and 0/12. Cell adhesion was monitored after 4h of cell culture by acid phosphatase activity (AP) measured using the *p*NPP assay. Value of 100% corresponds to AP activity of cells cultured on glass. Error bars represent the s.e.m. derived from two independent experiments (triplicate well determinations, 4 measurements per well): *statistically significant difference ($P < 0.001$, ANOVA, Tukey Test).

Figure S2

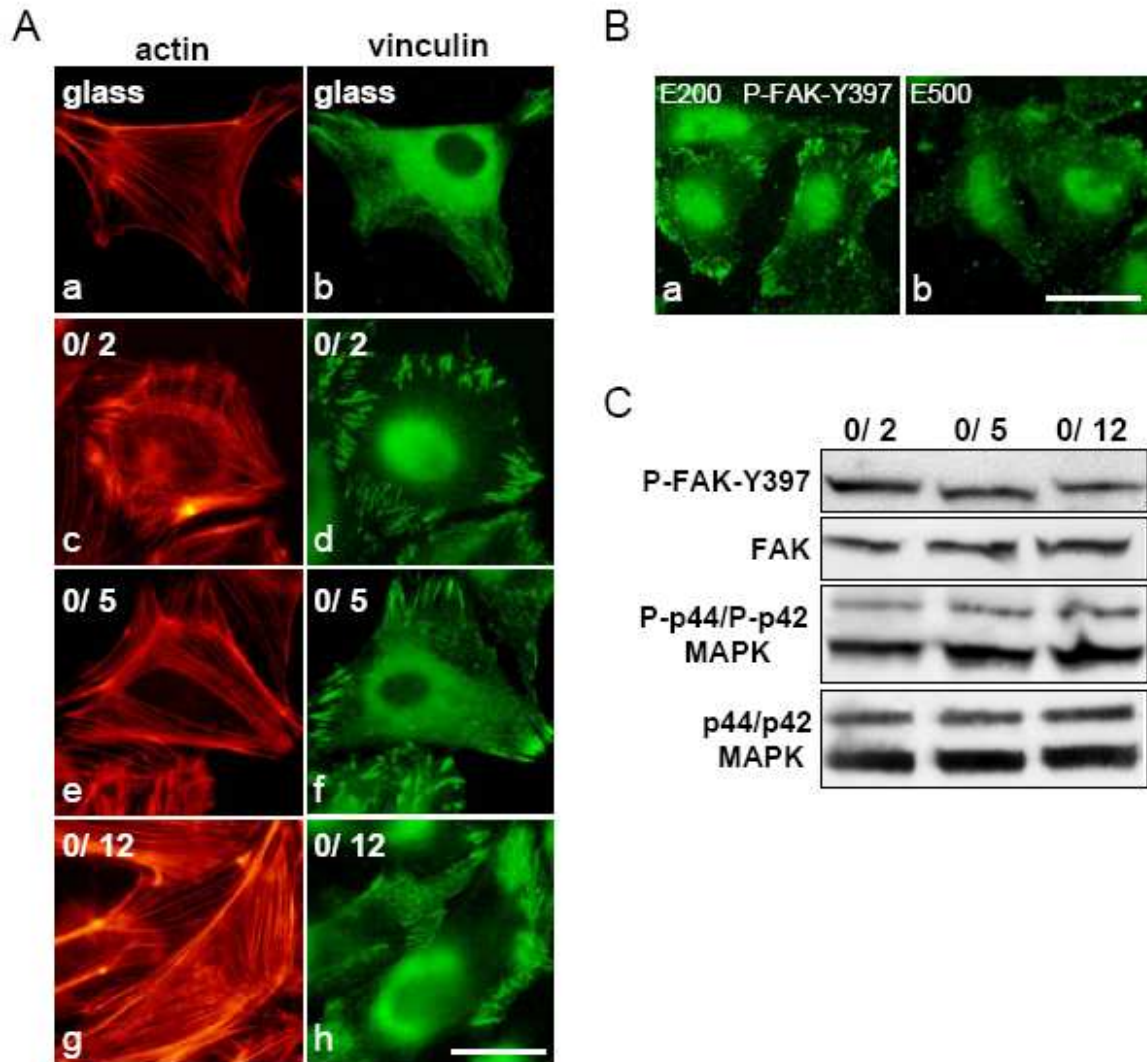


Fig. S2. Vinculin and actin on stiff substrates. (A) 4h of culture on glass surface (a, b), (0/2) (c, d), (0/5) (e, f) and (0/12) (g, h). Cells were labelled with phalloidin (a, c, e, g) and immunolabelled with anti-vinculin (b, d, f, h). Scale bar: 20 μ m. (B) Cells 4h cultured on (E200) (a) and (E500) (b) were immunolabelled with anti-phospho-FAK-Y397 (P-FAK-Y397) (a, b). Representative data from two independent experiments. Scale bar: 20 μ m. (C) Western blots of p44/p42 MAPK, phospho-p44/p42 MAPK (P-p44/p42 MAPK), FAK (FAK) and phospho-FAK-Y397 (P-FAK-Y397) protein contents in cells seeded 4h on (0/2), (0/5) and (0/12) films. Representative results from at least three independent experiments.

Figure S3

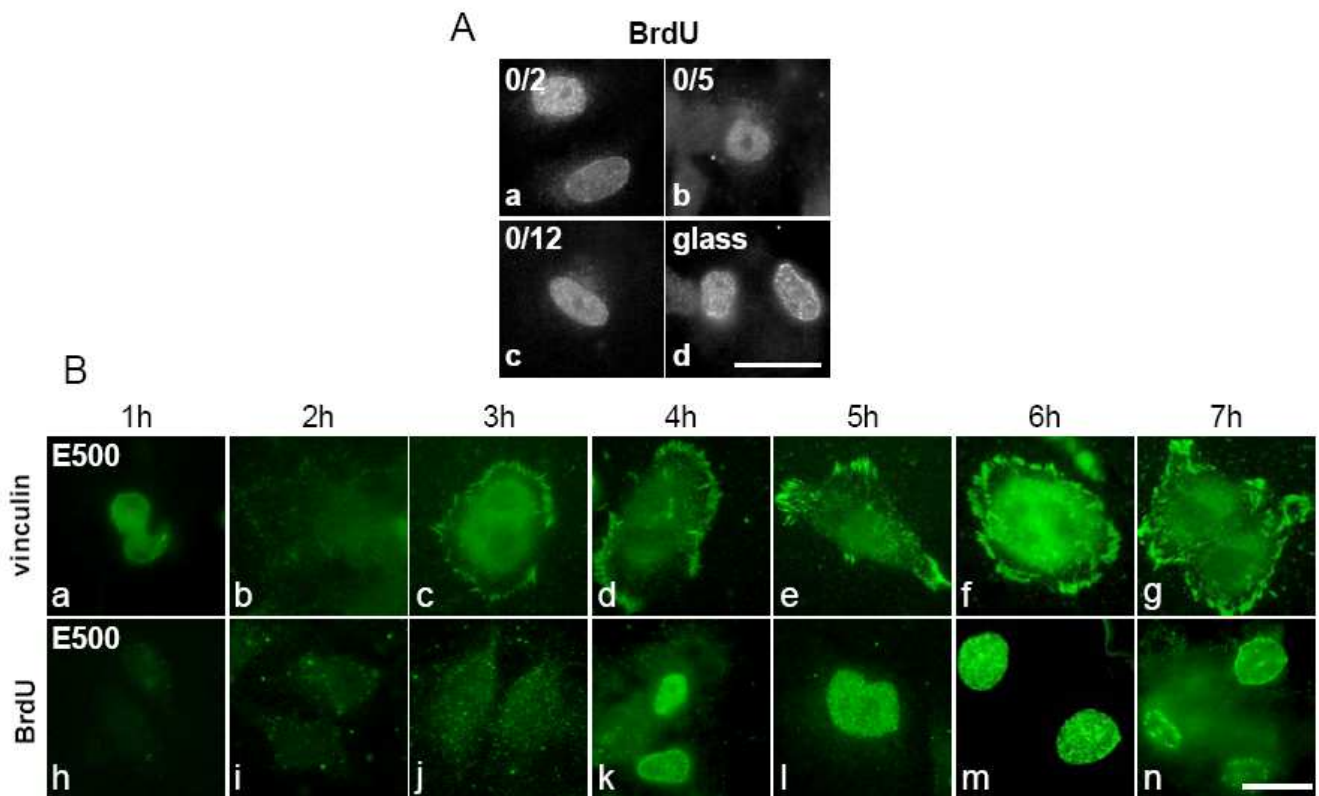


Fig. S3. Replication on substrate of 500 kPa (A) BrdU incorporation was visualized by indirect immunofluorescence in cells seeded 4h on (0/2) (a), (0/5) (b), (0/12) (c) and glass (d). Scale bar: 20 μ m. Representative data from three independent experiments. (B) cells seeded on (E500) films were fixed 1h (a, h), 2h (b, i), 3h (c, j), 4h (d, k), 5h (e, l), 6h (f, m) and 7h (g, n) after synchronization. Cells with anti-vinculin (a-g) with anti-BrdU (h-n). Scale bar: 20 μ m.

Figure S4

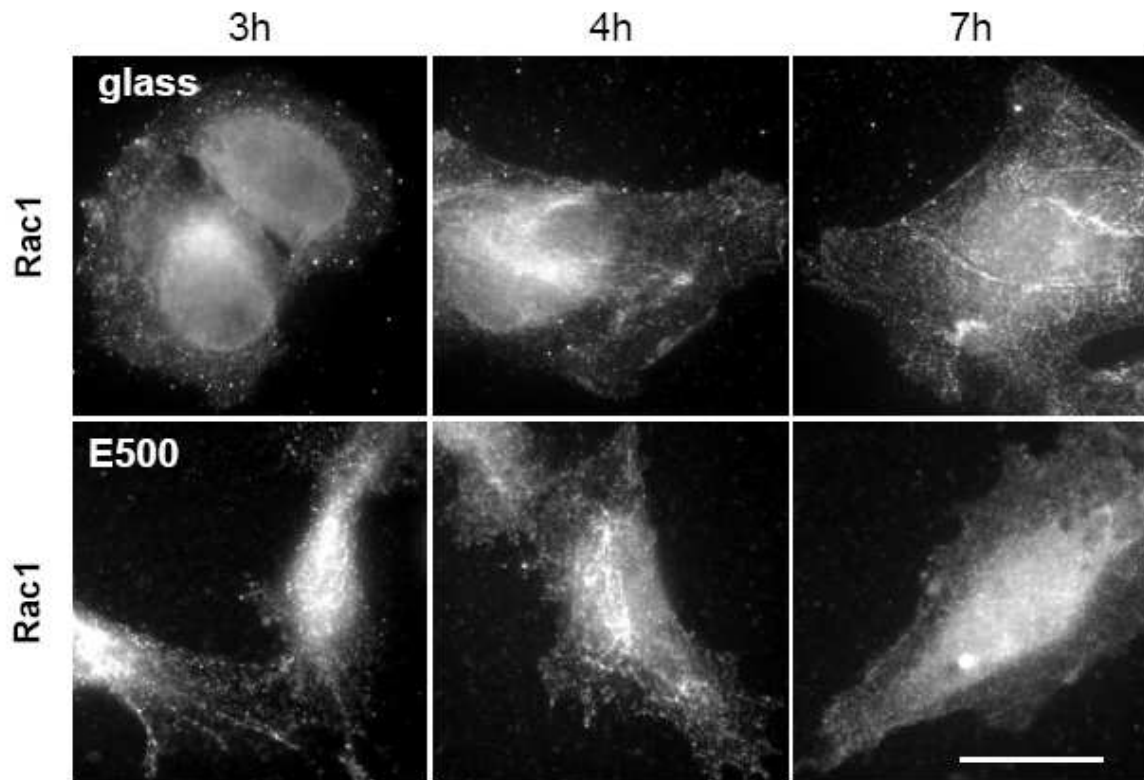


Fig. S4. Rac 1 with respect to elastic modulus. (A) cells were seeded on glass (a, b, c) and on (E500) (d, e, f). Cells were immunolabelled with anti-Rac1 (a-f). Cells were fixed 3h (a, d), 4h (b, e), and 7h (c, f) after synchronization. Scale bar: 20 μ m.

Figure S5

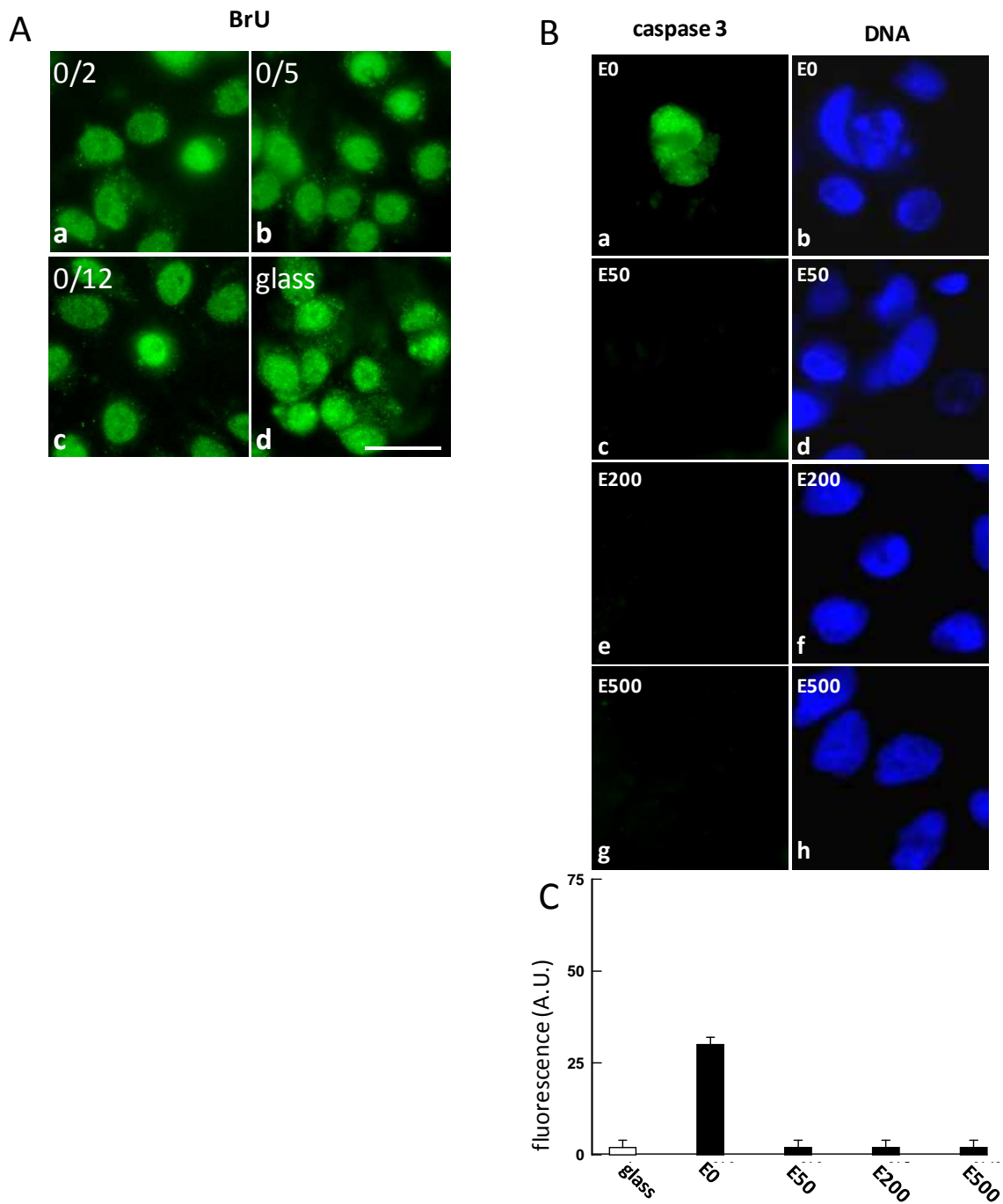


Fig. S5. (A) Transcription on stiff substrates 4h of culture on (0/2) (a), (0/5) (b), (0/12) (c) and glass (d). Cells were immunolabelled with anti-BrdU. Representative results from three independent experiments are shown. Scale bar: 20 μ m. (B) Cells were immunolabelled with anti-caspase-3, 4h of culture on (E0) (a, b), (E50) (c, d), (E200) (e, f) and E500 (g, h). Representative results from two independent experiments. Scale bar: 20 μ m. (C) Fluorescence intensity for caspase-3 signal (arbitrary units, A.U. in %) using imageJ, based on Ca, c, e, g: 300 cells were analysed per condition. Results are presented as s.e.m. for two independent experiments.

Table S1

Table S1. Surface concentration of FBS adsorbed onto the different polyelectrolyte multilayer films

Polyelectrolyte multilayer films	Changes in the resonance frequency, Δf , during FBS 10% deposition	Mass increment (ng cm ⁻²)
Bare crystal (SiO ₂)	38.0	672
(PAH/PSS) ₂ /PAH	45.9	812
(PAH/PSS) ₄ /PAH	57.3	1014
(PAH/PSS) ₆ /PAH	40.2	712
(PLL/HA) ₄ /PLL	47.8	846
Mean value	45.8	811 ± 166

Changes in the resonance frequency, Δf , during each adsorption step are measured.

The estimated error on the mean value of the mass increment corresponds to 95% confidence interval.

3.4 Résumé article 1

L'adhésion des cellules PtK2 sur un substrat d'élasticité supérieure à 200 kPa permet la formation de fibre de stress d'actine et l'organisation de contacts focaux, structures absentes pour des élasticités inférieures (0 à 50 kPa). La réplication est inhibée sur ce substrat de 50 kPa. A partir de 200 kPa, un lien physique entre le cytoplasme (contacts focaux et fibre de stress d'actine) et le noyau s'avère être indispensable pour permettre l'activation de la réplication. Plus précisément, Rac1 (petite GTPase de la famille des protéines ras) est à l'origine de la formation des contacts focaux, de l'assemblage des fibres d'actine et finalement de l'initiation de la réplication. Par contre l'élasticité 50 kPa, autorisant un début d'augmentation de l'aire nucléaire en corrélation avec une hyperacétylation des histones H3, permet l'activation de la transcription et transport nucléocytoplasmique de la protéine hnRNP A1 (protéine impliquée dans les processus de maturation de l'ARNm). Le substrat très mou, d'élasticité inférieure à 50 kPa est à l'origine de changements morphologiques caractéristiques d'un état d'apoptose (pas d'étalement cellulaire, noyaux fortement condensés, pas de structure d'adhésion focale et fort expression d'annexine V).

Chapitre 4

Rôle de l'élasticité du substrat sur des cellules épithéliales PtK2 en mitose

4.1 Introduction à l'article 2

4.1.1 La mitose

4.1.2 Le rôle de l'élasticité du substrat sur des cellules épithéliales PtK2 en mitose

4.2 Article 2 Substrate elasticity induces abnormal morphology in chromosome segregation in epithelial cells

4.3 Résumé des résultats de l'article 2

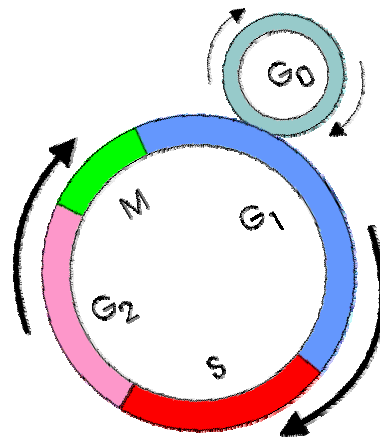
4.1 Introduction à l'article 2

Dans la première partie de ma thèse, la contribution physique de l'élasticité du substrat sur des activités nucléaires (réplication et transcription) a été étudiée à partir de cellules épithéliales PtK2 synchronisées mécaniquement en mitose. En utilisant ce même procédé, il est possible d'étudier le rôle de l'élasticité du substrat sur les cellules au cours de leur division. Dans ce contexte, cet aspect de mécanotransduction, encore très peu étudié, est l'objet de ma 2nd partie de thèse et constitue un axe de recherche dans l'élaboration d'un recouvrement de surface mécaniquement favorable à cette phase du cycle. Dans ce chapitre, avant d'aborder le rôle de l'élasticité du substrat sur des cellules épithéliales PtK2 en mitose, je donnerai quelques généralités sur la mitose.

4.1.1 La mitose

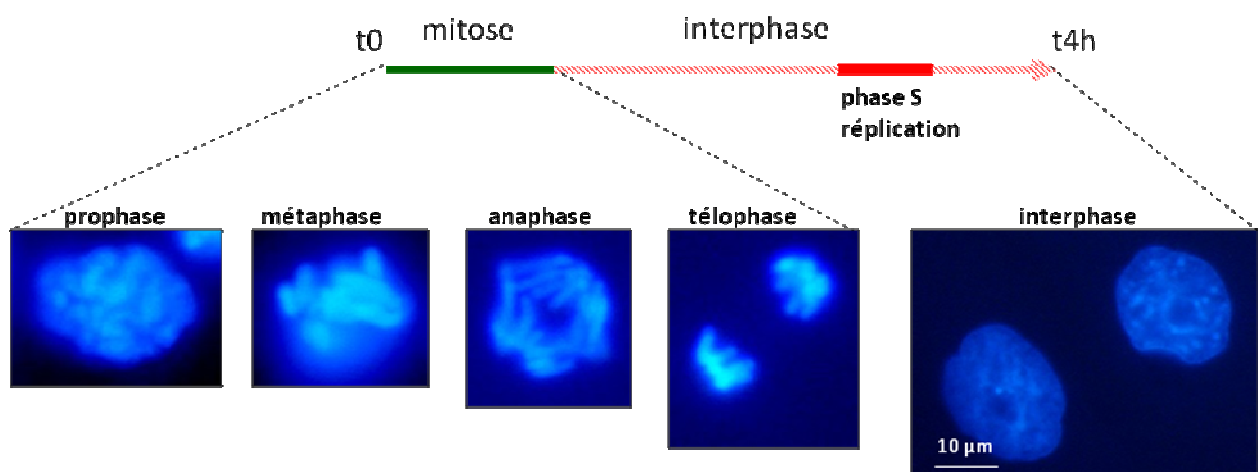
Le cytosquelette des cellules des eucaryotes supérieurs maintient la forme cellulaire et joue un rôle pivot dans la motilité cellulaire et beaucoup d'autres mécanismes comme la phagocytose ou les processus de transport intracellulaire. Durant l'interphase (cellule étalée), intervient la croissance de la cellule et la réplication de l'ADN dans un stade appelé phase-S. Comme nous l'avons déjà exposé précédemment (voir chapitre 1) le cytosquelette est composé de filaments d'actine et d'un grand nombre de protéines se liant à l'actine. Les fibres de stress d'actine traversent la cellule pour venir se lier à la matrice extracellulaire par les intégrines ou complexes d'adhésion focaux. Lors de son entrée en mitose, la cellule dissocie l'ensemble de ses contacts avec la matrice extracellulaire (MEC). Ses protéines associées aux contacts d'adhésions focaux se redistribuent dans le cytosol des cellules mitotiques (Fielding et Dedhar, 2009). La division en deux du matériel génétique comprend deux processus qui sont la mitose et la cytokinèse. La mitose est un phénomène continu qui dure de 30 à 180 minutes selon les cellules. Le centrosome joue un rôle prépondérant dans ces processus

hautement complexes. Le centrosome est le principal centre d'organisation des microtubules dans les cellules animales. Il est composé d'une paire de centrioles entouré de constituants amorphe péri-centriolaire. Ces éléments sont constitués d'une multitude de protéines incluant des protéines de signalisation qui régule l'organisation des microtubules, les moteurs de microtubules et protéines associées aux microtubules et des complexes d'anneaux de tubuline γ qui forment les sites majeures de nucléation des microtubules. En phase G1 du cycle cellulaire, il y a un centrosome unique ayant une localisation périnucléolaire. Durant la phase S, le centrosome se réplique par un mécanisme encore non déterminé. Au cours de la phase G2 les centrosomes dupliqués restent fortement associés.



Ensuite durant la prophase (15 à 60 minutes), le premier stage de la mitose, ils se séparent et migrent aux sites opposés du noyau. L'ADN nucléaire commence à se condenser en chromosomes. La phosphorylation des laminines dans l'enveloppe nucléaire provoque sa rupture et la libération des chromosomes condensés (chromosomes clivés longitudinalement en deux chromatides, réunis au niveau du centromère) et protéines nucléaires dans le cytoplasme. Le centrosome est alors fortement nucléé avec l'apparition d'un fuseau de fibres de microtubules (aster) 100 fois plus dynamique que lorsqu'ils sont organisés en interphase.

Ils se polymérisent et dépolymérisent rapidement jusqu'à se qu'ils établissent un contact avec les chromosomes avec lesquels ils deviennent attachés. Ce ci est le concept d'alignement des chromosomes, principe de « recherche et capture » proposé initialement par Kirschner and Mitchison en 1986. Cependant, il a été mis à l'évidence que les chromosomes eux même joue un rôle majeur dans la nucléation et la stabilisation des microtubules : la cellule est en métaphase (quelques minutes seulement). Les centromères sont regroupés dans le plan équatorial du fuseau de division. L'ensemble des chromosomes clivés, ainsi rangés, forme une figure appelée plaque équatoriale. Au cours de l'anaphase (2 à 3 minutes), chaque centromère se divise en deux ; les centromères fils, solidaires chacun d'une chromatide, s'écartent l'un de l'autre en direction des pôles du fuseau par raccourcissement des fibres du fuseau mitotique. On assiste ainsi à une migration en sens opposé de deux lots de chromosomes strictement identiques. La mitose s'achève par la télophase (durée comparable à celle de la prophase). Les chromosomes se désindividualisent pour redonner une masse diffuse de chromatine. Le fuseau de division disparaît pour laisser place à un anneau d'actine contractile qui se forme au niveau du fuseau de clivage : c'est la cytokinèse. L'enveloppe nucléaire se reconstitue, les deux cellules filles entrent alors en interphase.



4.1.2 Le rôle de l'élasticité du substrat sur des cellules épithéliales PtK2 en mitose

Dans cette 2nd partie de thèse, le même système de film multicouche de polyélectrolytes a été utilisé pour faire varier l'élasticité du substrat. La question initiale que nous nous sommes posés est de déterminer si l'élasticité du substrat modifie-t-elle la progression de la cellule dans son cycle. Si tel est le cas, de comprendre les évènements mitotiques (engagement des intégrines, organisation de l'actine et du fuseau mitotique) susceptibles d'être perturbés et l'origine mécanique de ces modifications éventuelles.

Cette seconde partie de thèse fait l'objet d'un manuscrit en préparation présenté ici dans une version préliminaire.

4.2 Article 2

Substrate elasticity induces abnormal morphology in chromosome segregation in epithelial cells

Introduction

The contribution of matrix elasticity in the regulation of cell functions was indubitably evidenced only a decade ago. During interphase, integrins cluster at matrix contacts called focal adhesions (FAs), play a major role in these mechanisms (Wang , 2009). Actin filaments terminated at FAs can then propagate these signals over long distances (Vogel and Sheetz, 2006) activating various effectors molecules (Wang et al., 1998, Wozniak et al., 2003). Finally, the cells integrate these multiple biochemical signals, by an adapted cellular response which allows the control of a large number of cellular functions such as adhesion, migration, growth, apoptosis, differentiation and nuclear activity. As mitosis begins, cell loosen contacts with the extracellular matrix (ECM); dissociate FAs, and disassemble actin filaments, acquiring a round morphology. Cell division consists of mitosis and cytokinesis. Mitotic spindle reassemble to direct accurate by the segregation of chromosomes to daughter cells. During cytokinesis, actin filaments form the contractile ring allows daughter cells separation. Increasing interest has focused on the need of matrix adhesion for the mitosis and particularly on integrins as regulators of mitotic events. Specially, integrin influences the assembly and the position of the mitotic spindle, as well as the cytokinesis. Yet, the fundamental question that remains unanswered is whether segregation of chromosomes of epithelial cells is influenced by the substrate elasticity. To answer this major question, polyelectrolyte multilayer films were used as substrate models with apparent elastic moduli ranging from 0 to 500 kPa.

Results and discussion

Influence of substrate elasticity on the cell cycle progression

Cell activity is largely dependent on the matrix elasticity. The major receptors of ECM are integrins. For instance, MDCK cells can sense the substratum rigidity to a sufficient extent to induce β 1-integrin activation, allowing downstream activation events to occur (Wei et al. 2008). Likewise, PEM films with controlled stiffness allowed activation of β 1-integrin PtK2 cells in interphase (Fig. 1Ba and Bb). However, very little is known whether elasticity of the substrate plays a role in mitosis events such as integrin engagement, mitotic spindle orientation and cytokinesis process. We investigated thus the influence of the PEM films elasticity onto the progression from mitosis to interphase entry using the mitotic shake-off method (experimental design is outlined schematically in Fig. 1Ca). Based on morphological parameters, cells were classified either in M-phase (M-phase population including prometaphase, metaphase, anaphase and telophase: designated M, Fig. 1Cb) or in interphase (cells with nucleus-containing nucleolus: designated G1, Fig. 1Cc). Figure 1Da shows that after 1h post-synchronisation the percentage of cells in interphase was equivalent on the glass surface and on E200 films, respectively Fig. 1Da and c) or larger on the E500 films (Fig. 1Db) to the percentage of mitotic cells, suggesting that E500 and E200 elasticity allow PtK2 cells entry into interphase within 1h post-synchronisation; in a similar manner as or even more strongly than glass surface. However, compared to the three other systems, on E50 the percentage of interphase cells remain inferior to those observed from 1 to 4h post-synchronisation (Fig. 1Dd). More importantly, DNA fluorescence microscopy analyses of PtK2 cell-cycle classification (mitosis versus interphase cells) revealed that substrate elasticity induces abnormal morphology in the chromosome segregation (Fig. 2Ac-f). Aberrant morphologies were observed in anaphase and in telophase materialized by chromatin

bridges and lagging chromosomes (E500, E200, E50 and E0, respectively Fig. 2Ac, d, e and f). Interestingly an increase in the percentage of chromosome instabilities was observed when cells were seeded onto substrates for which stiffness was lower (Fig. 2B). Influence of substrate elasticity on chromosome segregation was also assessed on the human epithelial colon cancer cell lines SW480 for glass, E200 and E50 substrates. SW480 cells displayed percentage of chromosome instabilities that increased also progressively on E200 and E50 films, identically to those observed for PtK2 on the same substrates (Fig. 2B). These data suggested that mitotic instabilities in response to substrate elasticity were not specific for a particular epithelial cell model.

Cells respond to substrate elasticity-induced damages

Mitotic spindle assembly checkpoint, replication checkpoints and apoptosis function constitute the control mechanisms that act during cell cycle to maintain genome integrity. Spindle assembly and replication checkpoints induce delays in cell cycle progression, which allows time for completion of repair or DNA synthesis (Varmark et al., 2009). By contrast, apoptosis eliminates cells carrying irreparable damage (Varmark et al., 2009). Fluorescent phosphatidylserine assays were realized to analyze if mitotic cells that exhibited chromosome missegregation became apoptotic. These assays were carried out for E0, E50 and E200 films and for PtK2 and SW480 cells. After 1h post-synchronization, only cells with chromosome instability were annexin V labeled, both for PtK2 (E200 and E50, respectively Fig. 2Ce and f; and E) and for SW480 cells (E200 and E50, respectively Fig. 2De and f). Therefore, chromosome instability observed for 200 and 50 kPa (E200 in a lower percentage compared to E50) promote cell apoptosis suggesting that these mechanical damage are most probably irreparable (Varmark et al. 2009; Yoshizaki et al. 2003).

α v integrin engagement and cortical ring of actin

Does the higher percentage of mitotic PtK2 cells observed after 1h to 4h post-synchronisation on 50 kPa substrate constitute a signature for a delayed interphase entry? To address this question, we determined the influence of substrate elasticity on certain molecules playing decisive roles in mitotic event progression. Recent studies identified integrins as regulators of assembly, positioning and orientation of the mitotic spindle and cytokinesis (Reverte et al., 2006, Streuli et al., 2009). Mitotic PtK2 cultured on glass, 50 and 200 kPa were thus immunolabelled using antibodies specific for α v-integrins (highly expressed in epithelial cells, Danen et al., 2005). On the glass substrate, in prometaphase and metaphase α v integrin colocalized with actin at the cell cortex ((t0 and t30 min post-synchronization, respectively Fig. 3Aa (α v), f(actin) and b(α v), g(actin), and D). In early and late telophase, a cell subpopulation accumulated also α v in the cell mid-zone colocalized with a concentrated region of actin (1 and 2h post-synchronization, respectively Fig. 3Ac(α v), h(actin) and d(α v), i(actin)). During interphase (4h post-synchronization), α v was uniformly distributed in the perinuclear region (Fig. 3Ae) and actin was organized in cytoplasmic microfilament (Fig. 3Aj). On the E50 film, compared to the glass substrate, in metaphase and anaphase a low ratio of α v was localized at the cell cortex (t0, t30min and t1h post-synchronization respectively Fig. 3Ba, b and c). Actin in the cell cortex was still visible at t0, t30min and t1h post-synchronization respectively Fig. 3Bf, g and h. In telophase, α v was not detected through the plasma membrane invagination (t2h and t4h post-synchronization respectively Fig. 3Bd and e). A counterstaining with phalloidin revealed the absence of actin in this cell mid-zone (Fig. 3Bi and j). In interphase, α v was localised in a reduced perinuclear region (supplementary material Fig. S1. Aa) and no actin stress fiber was observed (supplementary material Fig. S1. Ab). On E200, in metaphase, α v was distributed in the cell cortex (Fig. 3Ca). In early and late telophase, α v was again visualized in the plasma membrane invagination (Fig. 3Cb and c

respectively) colocalized with actin (Fig. 3Cg and h respectively). In interphase, distribution of cytoplasmic α v dots (Fig. 3Ce) and cytoplasmic microfilaments of actin were restored (Fig. 3Cj). These results clearly indicate that the localisation of α v in the plasma membrane invagination and the concentration of actin in this cell mid-zone require a substrate with E values exceeding 50 kPa.

Mitotic spindle and Rac1 activity

The mitotic spindle is essential for both proper chromosome segregation and cytokinesis (Heald and Walczak, 1999). Rac1 is a member of the ras-related superfamily of small GTPases that regulate both polymerization of actin to produce lamellipodia and vinculin FA assembly at the plasma membrane (Nobes and Hall, 1995). In interphase, the activity of Rac1 was regulated by a mechanical stress like tension (Katsumi et al.) and substrate elasticity (Kocgozlu et al. 2010). In mitosis, Rac1 activity was suppressed at the spindle midzone and increased at the plasma membrane of polar sides after telophase (Yoshizaki et al. 2003). To examine the colocalization of α -tubulin and Rac1 in different stages of the mitosis, PtK2 cells were double immunolabelled with anti-Rac1 and anti- α -tubulin antibody. On the glass substrate, in prometaphase, metaphase and anaphase, Rac1 spread throughout the cytoplasm and concentrated in some peripheral speckles but was excluded from the mitotic spindles and the chromosomes (t0, t30 min and 1h post-synchronization respectively Fig. 4Af, g and h). In telophase, Rac1 accumulated in the cytoplasm but was excluded from the spindle mid-zone of the bridge that connects the two daughter cells (Fig. 4Ai). In interphase, diffuse dots of Rac1 are localized mainly at the perinuclear region, where tubulin is concentrated on microtubule-organizing centers. An organized cytoskeleton of microtubule was also visualized (Fig. 4Ai, colocalization of Rac1 and α -tubulin results in yellow color). On E50, in prometaphase, Rac1 was more concentrated in some peripheral fibers and was excluded from the mitotic spindle

that appears disorganized (Fig. 4Bf). In anaphase and telophase, fibers of Rac1 invade the mid-zone of the two daughter cells, where the mitotic spindle of microtubule progressively disappears (30min, 1h, 2h and 4h post-synchronization, respectively Fig. 4Bg, h, i and j). In interphase, fibrous structures of Rac1 remain confined in a reduced cytoplasm (supplementary material Fig. S1. Bb). On E200, in metaphase and anaphase, diffuse dots and fibers of Rac1 spread throughout the cytoplasm and the cell cortex excluded from a restored mitotic spindle (t0 and t30min post-synchronization respectively Fig. 4Cf and g). In early and late telophase, comparable distribution of Rac1 and mitotic spindle organization to those of glass substrate were observed (t1h and 2h post-synchronization, respectively Fig. 4Ch and i). In interphase, Rac1 was uniformly distributed in the cytoplasm, where α -tubulin formed a spread cytoskeleton (t4h post-synchronization, Fig. 4Cj). It was also noticeable that a small percentage of cells in interphase had intense cytoplasmic fibers of Rac1 in particular when the network of microtubule cytoskeleton was weakly developed (supplementary material Fig. S1. Cb). These data suggest that when the microtubule network is well organized, Rac1 very probably use this network for its translocation as it is the case for the transport of other proteins. For a stiffness of 50 kPa, interphase entry may be strongly impaired. To verify this hypothesis, we synchronized a collection of cells to follow the onset of DNA replication. On the control surface (glass substrate) BrdU incorporation sites were detected 4 hours after synchronisation (fig Fig. 4E and Fa). 4 hours after release of cells onto E50 film, DNA replication was inhibited (Fig. 4E and Fb). In contrast, 4 hours after release of another collection of cells onto E200 film, replication activity was restored (Fig. 4E and Fe). These results are consistent with the previous data obtained by Kocgozlu et al., 2010. A higher percentage of mitotic PtK2 cells observed 1h to 4h post-synchronisation on 50 kPa, compared to the three other systems (E200, E500 and glass substrates), does not correspond to delay into interphase entry but strongly suggest that E50 film inhibits cytokinesis by preventing the

formation of a normal bipolar spindle. However, interphase cells (interphase or late telophase progressing in interphase) observed on E50 could be probably isolated from the mitotic shake-off method.

To try to establish how microtubule spindle, cytokinesis, chromosome segregation and replication are affected by the substrate elasticity and if a mechanistic link existed between them, we tested the influence of the anti-Rac1 inhibitor NSC23766 on these mitotic and post-mitotic events. As control, in the presence of the inhibitor NSC23766, Rac1 was not detected 4 hours post-synchronisation (data not shown). Interestingly, at 2h post-synchronisation, the inhibition of Rac1 by the drug altered, neither the α v integrin engagement at the cell mid-zone (Fig. 5Ae) nor the actin concentration in this region (Fig. 5h), suggesting that Rac1 does not play a role in cytokinesis as it was the case for the RhoGTPase (Pellinen et al., 2008). However, the anti-Rac1 inhibitor perturbed the spindle orientation of PtK2 cells (Fig. 5m and n, respectively 30 min and 2h post-synchronization) and the DNA replication was completely obstructed (Fig. Bb and C). These results do not prove that the destabilization of the mitotic spindle, induced by the inhibitor NSC23766, lead to the direct inhibition of the replication. However, previous work showed that inhibition of Rac1 by this drug, in mitotic PtK2 cells, concomitantly obstructed vinculin, actin filament and replication (ref leyla 1). The most noticeable observation from these experiments was that the inhibitor induced abnormal morphology in chromosome segregation (Fig. Ca and c) lies in the same percentage than that induced by the elasticity 50 kPa. Similar phenotype has been observed in *Drosophila* S2 cells when the Gie (a subfamily of the small GTP ases) was depleted using RNAi methods (depletion of the effector domain). These treated cells frequently failed to separate all their chromatids and remained connected by a thin thread of chromatin (Okai et al., 2004). The authors speculated that Gie might serve as a molecular switch to regulate chromosome segregation through the association with microtubules.

In conclusion soft substrate elasticity (below 50 kPa) induce in epithelial cells multiple “mitotic catastrophes” such as i) abnormal morphology in chromosome segregation, ii) progressive disappearance of the mitotic spindle of microtubule. These mitotic event damages lead respectively to apoptosis and cytokinesis failure rather than delay in mitosis, confirmed by the total inhibition of replication. Nevertheless, we couldn't clearly establish the mechanical origin and the mechanistic link between these damages.

Materials and methods

Polyelectrolytes

Poly(L-lysine) (PLL, MW = 5.7×10^4 Da, Sigma, St. Quentin Fallavier), fluorescein isothiocyanate labelled poly(L-lysine) (PLL^{FITC}, MW = 5.0×10^4 Da, Sigma, St. Quentin Fallavier) and hyaluronic acid (HA, MW = 4.0×10^5 Da, BioIberica, Barcelona) were used for build-up of (PLL/HA)₂₄ films. Poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS, MW = 7.0×10^4 Da, Sigma, St. Quentin Fallavier), rhodamine labelled poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS^{rho}, MW = 5.0×10^4 Da, Sigma, St. Quentin Fallavier, France) and poly(allylamine hydrochloride) (PAH, MW = 7.0×10^4 Da, Sigma, St. Quentin Fallavier) were used for buildup of (PSS/PAH)_n top films (where *n* corresponds to the number of layer pairs), which were deposited on (PLL/HA)₂₄ stratum. PLL (PLL^{FITC}), HA, PSS (PSS^{rho}), and PAH were dissolved at 1mg/mL in buffer solution containing 150mM NaCl and 20mM of tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS, 121g/mol, Merck) at pH 7.4. During film construction, all rinsing steps were performed with 150mM NaCl/20mM TRIS aqueous solution at pH 7.4. (PLL/HA)₂₄ strata were prepared using a dipping machine (Dipping Robot DR3, Kierstein, GmbH), on glass slides (VWR Scientific, Fonteney sous Bois, France). (PSS/PAH)_n top films were prepared manually.

PEM films were used to investigate how the mechanical properties of the substrate may play a role in mitosis. The films were composed of a (PLL/HA)₂₄ stratum capped by a second (PSS/PAH)_n stratum (*n* = 0, 2, 5 and 12). A typical example of confocal z section observation of a film composed of PLL/HA stratum and PSS/PAH capping is displayed in Fig. 1Aa. The rigidity of the (PLL/HA)₂₄-(PSS/PAH)_n increases with the number of deposited pairs, as we previously proved by Atomic Force Microscopy (AFM) indentation experiments (Francius et al., 2007). Although the PLL/HA stratum is capped, the whole film behaves like a viscoelastic

medium. Each of the films were modeled as a spring (elastic modulus E_1) in series with a Kelvin unit, which is itself a spring (elastic modulus E_2), in parallel with a dashpot. We will refer to this model as SK model (referred to as “SK” model, where S stands for “spring” and K for “Kelvin”). Figure 1 Ab shows the effect of depositing PSS and PAH on top of the PLL/HA stratum, and represents the evolution of the apparent elastic modulus in the SK model ($1/E_{ap} = 1/E_1 + 1/E_2$) at a given expansion velocity (about $1\mu\text{m/s}$) for the AFM piezodrive. It follows from the Fig. 1Ab that the apparent moduli are roughly 50, 200 and 500kPa for the architectures $(\text{PLL/HA})_{24}\text{-(PSS/PAH)}_n$ with $n = 2, 5, 12$ respectively: whereas it is known from earlier investigations (Francius et al., 2006) that the elastic modulus of the native $(\text{PLL/HA})_{24}$ architecture is under 1kPa and was considered here as our zero. Henceforth, we shall use the short hand notations (E0), (E50), (E200) and (E500) for the $(\text{PLL/HA})_{24}$, $(\text{PLL/HA})_{24}\text{-(PSS/PAH)}_n$ films with $n = 2, 5, 12$ respectively and (0/2) for $(\text{PSS/PAH})_2$ (Table 1).

Film characterization

CLSM observations were performed with Zeiss LSM 510 microscope using 40X1.4 oil immersion lens. FITC-fluorescence was detected after excitation at 488nm with cut-off dichroic mirror 488nm and emission band-pass filter 505-530nm. Rho-fluorescence was detected after excitation at 543nm, dichroic mirror 543nm, and emission long pass filter 585nm.

Cell and synchronization

PtK2 cells (CCL-56, LGC Standards, United Kingdom) were grown in RPMI-1640 medium (Invitrogen) supplemented with penicillin $100\mu\text{g/ml}$, streptomycin $100\mu\text{g/ml}$ (Invitrogen), and 10% FBS (Invitrogen) maintained at 37°C with 5% CO_2 . Colorectal adenocarcinom

epithelial SW480 cells were grown in RPMI-1640 medium (Invitrogen) supplemented with glutamax, 10% FBS (Invitrogen), 5% penicillin / streptomycin, 0.025U/mL insulin, 50mg/mL hydrocortisone and 1.25 mg/mL G418 maintained at 37°C with 5% CO₂. Cells were synchronized by mechanical shakeoff. Three days prior to synchronization, cells were re-plated at 1.2×10^4 per cm². Mitotic cells were centrifuged (700 g, 7min), resuspended in culture medium, and re-plated at 1.2×10^4 per cm² from surfaces. For Rac1 inhibitor treatment, cells were cultured with 100μM NSC 23766 from 0-4h after synchronization.

Immunolabeling

Cells were seeded on surfaces (multilayered films or bare glass samples placed in 24-well plates (Nunc, USA)) at 1.2×10^4 per cm² (synchronized). Cells were fixed in 3.7% (w/v) Paraformaldehyde (PFA) in PBS for 15min, and fixed/permeabilized in 3.7% (w/v) PFA in PBS plus 0.1% Triton X-100 for 10min. Cells were blocked with 10% decompemented FBS (Invitrogen). Cells were incubated with αv-integrin (1:100; Santa Cruz, USA). After washings with PBS, cells were incubated with FITC-conjugated secondary antibody (1:500; AnaSpec, Fremont, CA). For Rac1, cells were incubated with anti-Rac1 (1:100, Millipore), for actin staining with TRITC-phalloidin (1μg ml⁻¹; Sigma), DNA with Hoechst 33258 (20μg ml⁻¹, Sigma). For α-tubulin, cells were incubated with anti- α-tubulin (1:100, Santa Cruz). After washings with PBS, cells were incubated with TRITC-conjugated secondary antibody (1:200; Santa Cruz).

Replication

Cells were seeded on 1.2×10^4 per cm² (synchronized). Cells were incubated with BrdU for 15min (37°C) (1:500; RPN 201, GE Healthcare Europe GmbH). Cells were fixed/permeabilized in 3.7% PFA in PBS plus 0.5% Triton X-100 for 15min. After washing

with PBS, cells were incubated with anti-BrdU/DNase for 1h (37°C) (1:100; RNP 202, GE Healthcare Europe GmbH). After washings with PBS, cells were incubated with FITC-conjugated secondary antibody (1:500; AnaSpec, USA).

Microscopy

Samples were mounted in VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Fluorescence was visualized with Nikon Elipse TE200 (objective lenses 63×1.4 NA). Images were acquired with Nikon Digital Camera (DXM 1200 or DS-Q11MC with ATC-1 or NIS-Elements softwares respectively). Pictures were processed with ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Apoptosis

Synchronized Cells were seeded at 1×10^5 or 1.2×10^4 per cm^2 . Annexin V binding was carried out using the Vybrant Apoptosis Assay Kit (Molecular Probes) according to the manufacture's instruction. Cells were analyzed 1 hour after synchronisation by fluorescence microscopy.

Western blot

PtK2 cells were seeded on surfaces (nunc, USA) at 2×10^5 per cm^2 and incubated for 4h in culture medium at 37 °C. Cells were lysed 20mM Tris-base, pH 8, 0.15M NaCl, 2mM EDTA, 1 % NP-40, 10% glycerol, 1mM sodium orthovanadate containing 1% of protease inhibitor cocktail; Sigma). Extraction mixtures are rocked at 4 °C for 1h and centrifuged (5min, 13000 rpm at 4°C). Protein concentration was determined using DC protein assay (Bio Rad, USA). Equal amounts of total protein extracts were subjected to SDS PAGE (NuPAGE, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and transferred onto nitrocellulose membranes (Ibлот Transfer Stack, Invitrogen, USA) blocked in T- TBS (0.1% Tween 20, 50mM Tris-base, pH 7.6, 0.15M NaCl)

containing 1% BSA (Euromedex, France) and probed overnight at 4°C with primary antibody: β -integrin LIBS, activated β -integrin (clone B44) (1:1000, Chemicon), p44/p42 MAPK (1:1000, 9102, Cell Signaling, USA). Blots were incubated for 2h with HRP-conjugated anti-rabbit, anti-mouse antibodies (1:5000, GE Healthcare, USA). Bands were detected using ECL kit (GE Healthcare, USA). Autoradiographs were quantified with Kodak Digital Science 10 Software. Representative mean values of at least three independent experiments with standard errors (4 time point per band).

References

Danen, EH., J.V. Rheenen, W. Franken, S. Huveneers, P. Sonneveld, K. Jalink, A. Sonnenberg. 2005. Integrins control motile strategy through a Rho-cofilin pathway. *J Cell Biol.*1;170(3):497. doi: 10.1083/jcb.200412081

Francius,G., J. Hemmerle, V. Ball, P. Lavalley, C. Picart, JC. Voegel, P. Schaaf, B. Senger B. 2007. Stiffening of soft polyelectrolyte architectures by multilayer capping evidenced by viscoelastic analysis of AFM indentation measurements. *J. of phys. chem. C.* 111; 23, 8299-8306. doi: 10.1021/jp070435.

Heald, R., and CE. Walczak .1999. Microtubule-based motor function in mitosis. *Curr Opin Struct Biol.* 9(2):268-274.

Katsumi, A., J. Milanini, WB. Kiosses, MA. del Pozo, R. Kaunas, S. Chien, KM. Hahn, MA. Schwartz. 2002. Effects of cell tension on the small GTPase Rac. *J Cell Biol.*8;158(1):153-164. doi: 10.1083/jcb.200201105.

Kocgozlu, L., P. Lavalley, G. Koenig, B. Senger, Y. Haikel, P. Schaaf, JC. Voegel, H.Tenenbaum, D.Vautier D. 2010. Selective and uncoupled role of substrate elasticity in the regulation of replication and transcription in epithelial cells. *J Cell Sci.* 1;123(Pt 1):29-39. doi: 10.1242/jcs.053520

Okai, T., Y. Araki, M. Tada, T. Tateno, K. Kontani, T. Katada. 2004. Novel small GTPase subfamily capable of associating with tubulin is required for chromosome segregation. 2004.*J Cell Sci.* 200415;117(Pt 20):4705-15. doi: 10.1242/jcs.01347

Paszek, MJ., VM. Weaver. 2004.The tension mounts: mechanics meets morphogenesis and malignancy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* ; 9(4):325-42. doi: 10.1007/s10911-004-1404-x

Pellinen, T.,S.Tuomi, A. Arjonen, M. Wolf, H. Edgren, H. Meyer, R. Grosse, T. Kitzing, JK Rantala, O Kallioniemi, R Fässler, M Kallio, J Ivaska. 2008. Integrin trafficking regulated by Rab21 is necessary for cytokinesis. *Dev Cell.* 15(3):371-85.doi:10.1016/j.devcel.2008.08.001.

Reverte, CG., A. Benware , CW. Jones , SE. LaFlamme . 2006. Perturbing integrin function inhibits microtubule growth from centrosomes, spindle assembly, and cytokinesis. *J Cell Biol.* 14;174(4):491-7.doi: 10.1083/jcb.200603069.

Streuli, CH. Integrins and cell-fate determination. 2009. *J Cell Sci.*15;122(Pt 2):171-7. doi: 10.1242/jcs.018945

Varmark, H., C. A. Sparks, J. J. Nordberg, B. S. Koppetsch, W. E. Theurkauf.2009. DNA damage-induced cell death is enhanced by progression through mitosis. *Cell cycle.* 8:18, 2952-2964.

Vogel, V. and M. Sheetz. 2006. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7, 265-275. doi:10.1038/nrm1890

Wang,N., J.D. Tytell , D. E. Ingber.2009. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 75-82. doi:10.1038/nrm2594

Wang, P. and K. N. Bitar. Rho A regulates sustained smooth muscle contraction through cytoskeletal reorganization of HSP27 1998. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 275: 1454-1462, 0193-1857/98

Wei, W.C., H.H. Lin,² M.R. Shen,M.J Tang. 2008. Mechanosensing machinery for cells under low substratum rigidity. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: C1579-C1589. doi:10.1152/ajpcell.00223.

Wozniak, MA., R. Desai , PA. Solski , CJ. Der , P.J. Keely.2003. ROCK-generated contractility regulates breast epithelial cell differentiation in response to the physical properties of a three-dimensional collagen matrix. *J Cell Biol.* 10;163(3):583-95. doi: 10.1083/jcb.200305010

Yoshizaki , H., Y. Ohba, K. Kurokawa, RE. Itoh, T.Nakamura, N. Mochizuki, K. Nagashima, M Matsuda.2003. *J Cell Biol.*21;162(2):223-32. doi: 10.1083/jcb.200212049.

Figures legends

Figure 1

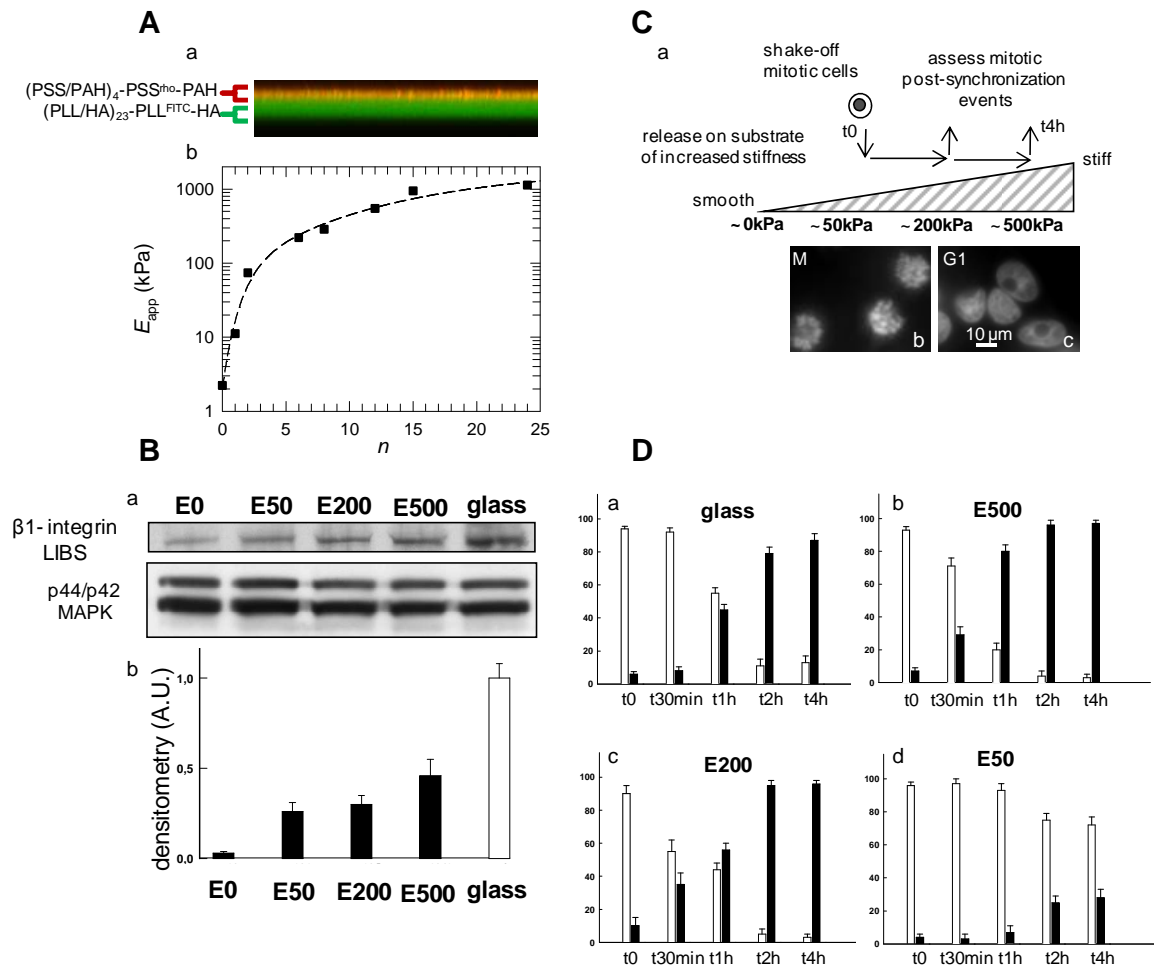


Figure 1. Cell cycle progression with respect to elastic modulus (A) (a) Vertical section image of a (PLL/HA)₂₃-PLL^{FITC}-HA-(PSS/PAH)₄-PSS^{Rho}-PAH multilayered film observed by CLSM. (b) E_{app} of (PLL/HA)₂₄-(PSS/PAH)_n-PSS films investigated in (Francius et al.,2007) as a function of the number of (PSS/PAH) layers. (B) a) Western blots of β -integrin LIBS and p44/p42 MAPK protein contents in PtK2 cells seeded 4h on (E0), (E50), (E200), (E500) films and glass and corresponding scans for β -integrin LIBS. Representative results from at least 2 independent experiments. (C) a) Cartoon of the experimental design. Mitotic cells were collected from randomly proliferating cell cultures by shake-off and release on substrates of increased stiffness. Cells were harvested at several time points after synchronization to assess mitotic events progression. b) A synchronous population obtained by mitotic shake-off (M) and c) a population 4 hours after synchronization (G1) labelled with Hoechst 33258. (D) percentage of cells in mitosis (including prometaphase, metaphase, anaphase and telophase) versus interphase after release on a) glass, b) E500, c) E200 and d) E50. 300 cells were used for each condition for 5 time periods. Results are presented as s.e.m for 3 independent experiments (white bar: mitosis, black bar: interphase).

Figure 2

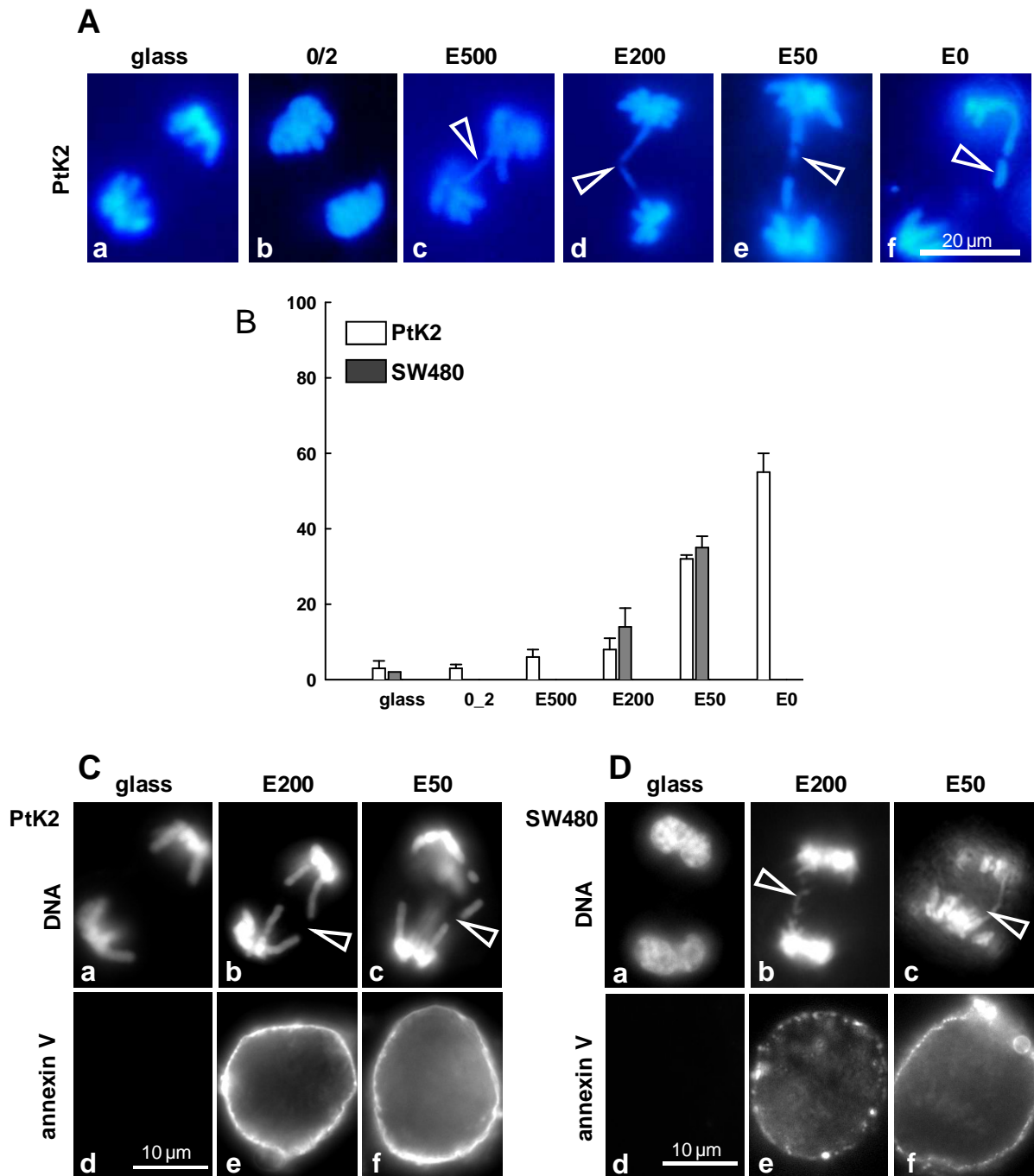


Figure 2. Abnormal morphology in the chromosome segregation A) representative image of aberrant morphologies (Hoechst 33258 labelling), materialized by chromatin bridges or lagging chromosomes (arrowed). Synchronous population obtained by mitotic shake-off seeded on a) glass, b) 0/2, c) E500, d) E200, e) E50 and f) E0. (B) percentage of cell presenting abnormal morphology in the chromosome segregation. 200 fixed cells were used for each condition. The quantification of the percentage was pooled over the 5 time periods. Results are presented as s.e.m for 3 independent experiments (white bar: PtK2 cell, grey bar: SW480 cells). 1 hour post-synchronization, cells were tested with the apoptosis kit: PtK2 cells (C) and SW480 cells (D) d,e and f : fluorescence image for phosphatidylserin signal (a, b, and c counterstained with Hoechst 33258). (a,c) glass; (b,e) E200 and (c, f) E50.

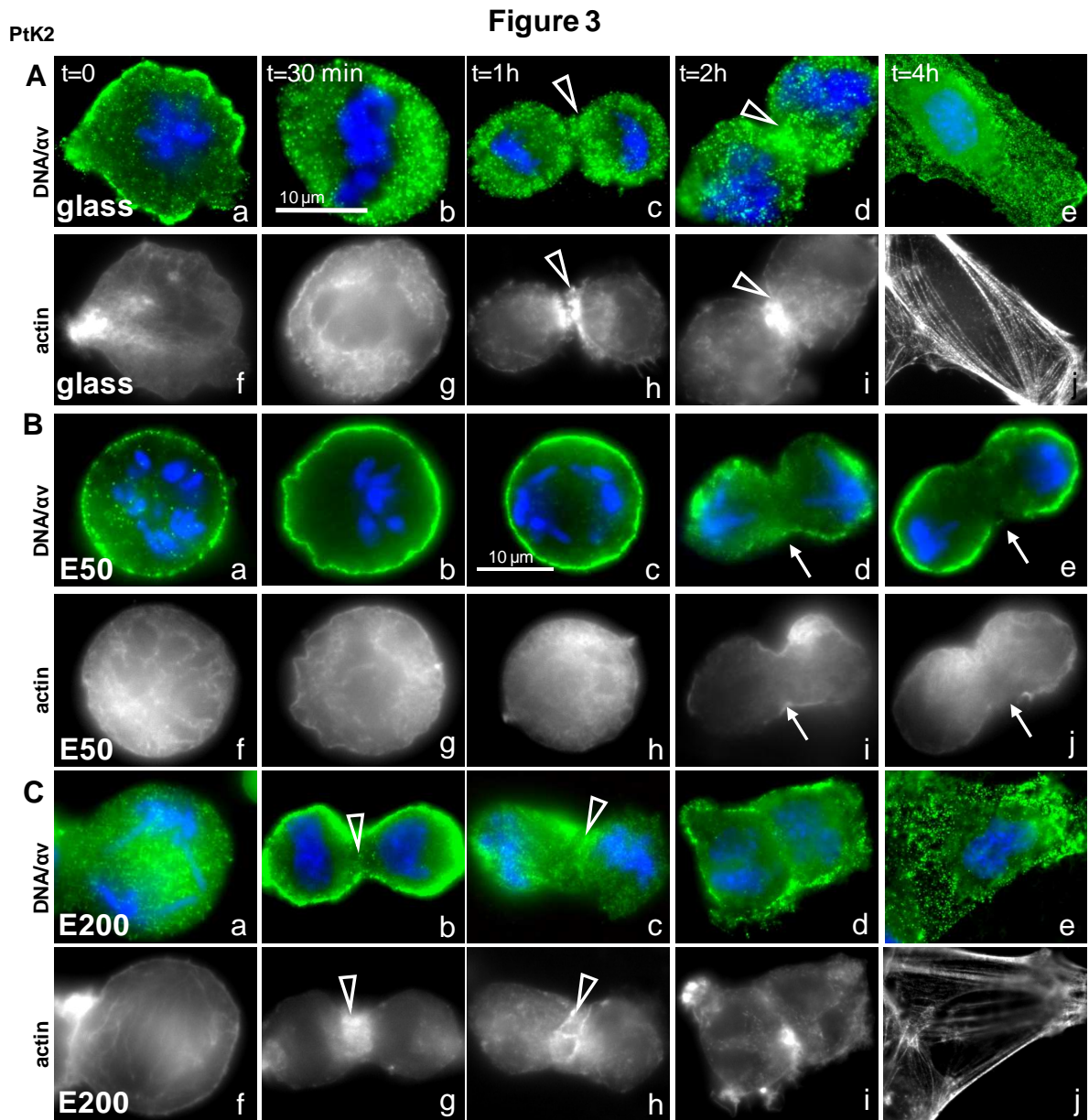


Figure 3. αv integrin engagement and actin organization substrates with respect to mitotic synchronization. Representative PtK2 cells seeded on (A) glass surface (B) (E50) and (C) (E200) fixed 0 min (a, f), 30min (b, g), 1h (c, h), 2h (d, i), 4h (e, j) after synchronization. Superposition of cells with anti- αv integrin (green) and Hoechst 33258 (bleu) (a-e), counterstained with actin (f-j). (arrow: absence of αv integrin and contractil ring of actin in the cell mid-zone; arrowed: presence of αv integrin and contractil ring of actin in the cell mid-zone .

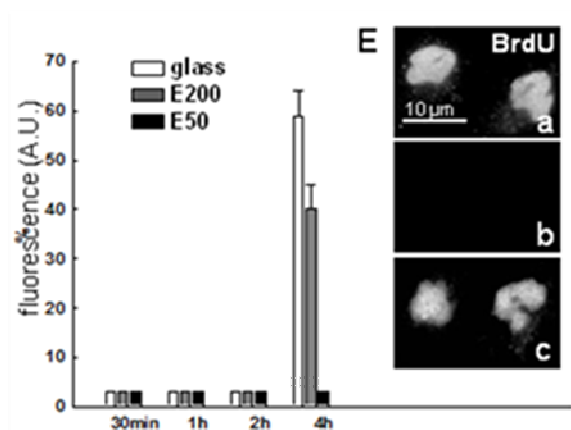
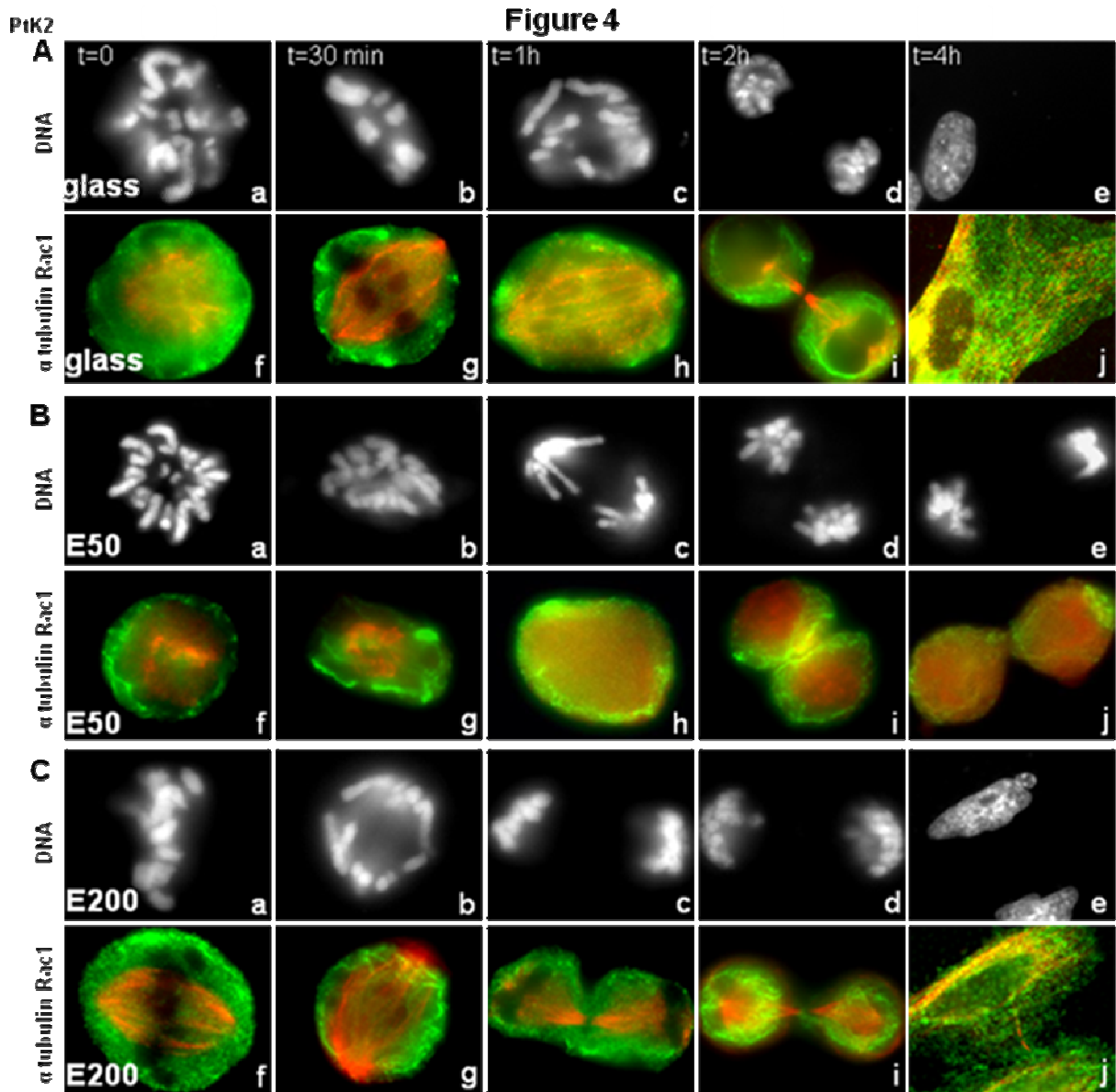


Figure 4. α tubulin organization and Rac1 distribution with respect to mitotic synchronization. Representative PtK2 cells seeded on (A) glass surface (B) (E50) and (C) (E200) fixed 0 min (a, f), 30min (b, g), 1h (c, h), 2h (d, i), 4h (e, j) after synchronization. Superposition of cells with α tubulin (red) and Rac1 (green) (f-j), counterstained with Hoechst 33258 (a-e). (E) Fluorescence intensity for nuclear BrdU signal (arbitrary units, A.U. in %) using imageJ, determined on 50 cells (for 4 time periods). (F) BrdU visualized by indirect immunofluorescence 4 hours post-synchronization on (a) glass surface (b) (E50) and (c) (E200).

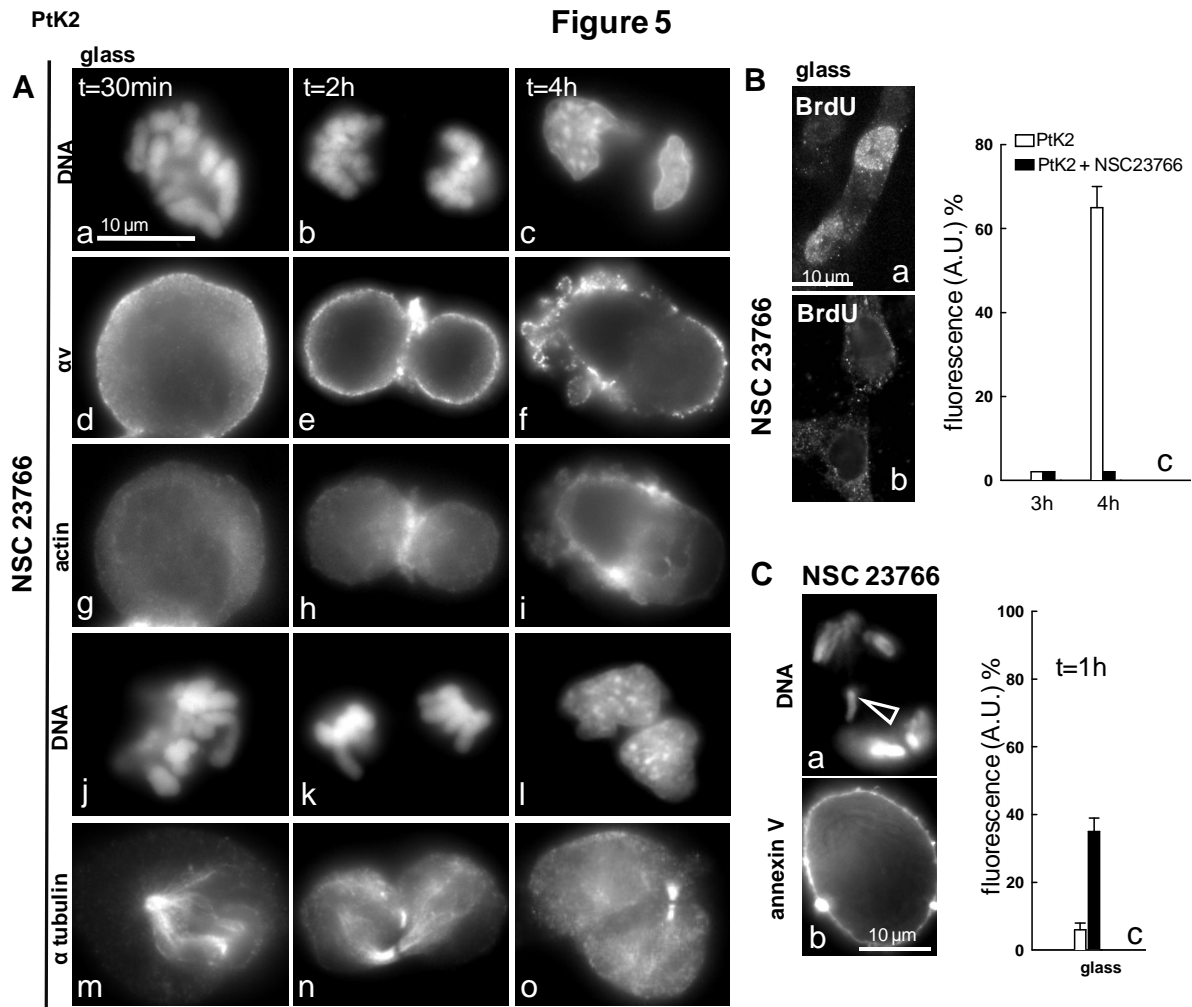


Figure 5. αv integrin engagement, actin and α tubulin organization with respect to Rac1 inhibitor treatment for mitotic synchronized PtK2 cells. For Rac1 inhibitor treatment, cells were cultured on glass surface with 100 μ M NSC 23766 (A-C) until their fixation. (A) Cells with anti- αv integrin (d, e and f) counterstained with Hoechst (a, b and c) and with phalloidin (g, h and i). Cells with anti- α tubulin (m, n and o) counterstained with Hoechst (j,k and l). Cells were fixed 30min (a, d, g, j, m), 2h (b, e, h, k, n), and 4h (c, f, i, l, o) after synchronization. (B) BrdU visualized by indirect immunofluorescence on glass surface 4 hours post-synchronization a) control b) with 100 μ M NSC 23766, c) Fluorescence intensity for nuclear BrdU signal (arbitrary units, A.U. in %) using imageJ determined on 50 cells (for 2 time periods). (C) Abnormal morphology in the chromosome segregation (arrowed) for cells treated with 100 μ M NSC 23766, 1 hour post-synchronization: fluorescence image for phosphatidylserin signal b) counterstained with Hoechst 33258 a) percentage of cell presenting abnormal morphology in the chromosome segregation c).

Supplementary file

Tableau I

Architecture	Eap (kPa ^a)	Notation
(PLL/HA) ₂₄	~ 0	E0
(PLL/HA) ₂₄ -(PSS/PAH) ₂	~ 50	E50
(PLL/HA) ₂₄ -(PSS/PAH) ₅	~ 200	E200
(PLL/HA) ₂₄ -(PSS/PAH) ₁₂	~ 500	E500
(PSS/PAH) ₂	NA	0/2

Table I Ea of (PLL/HA)₂₄-(PSS/PAH)_n with n = 2, 5, 12
Eap was determined by AFM nano-indentation. ^aValues from
(Francius et al., 2007). NA = Non-available.

Figure S1

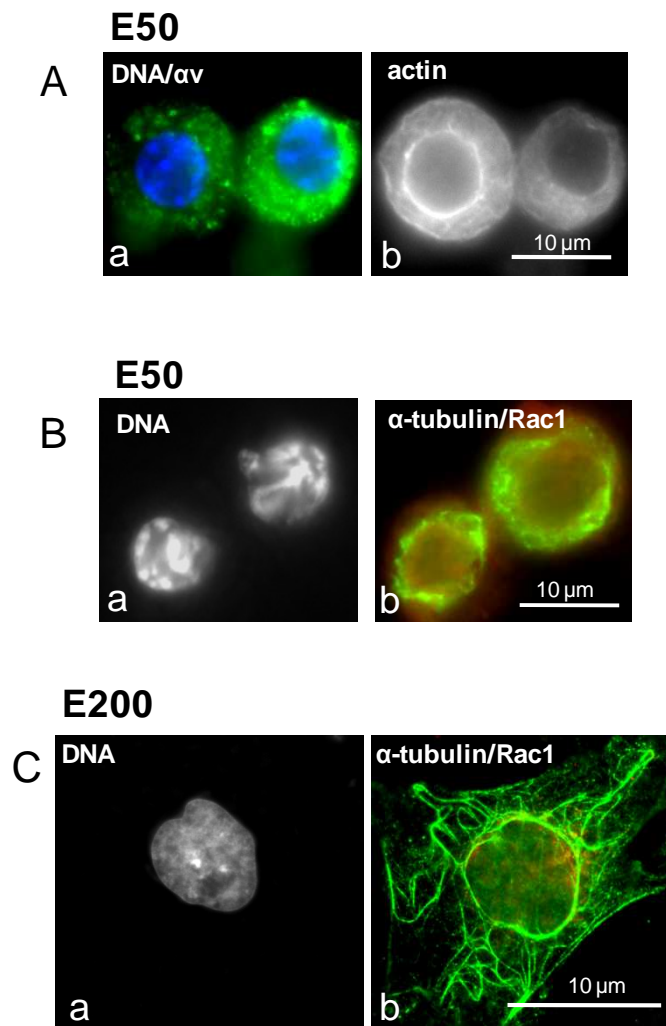


Figure S1 Adhesion of PtK2 cells either deposited on E50 (A and B) and (E200) 4 hours post-synchronization. (A) Superposition of cells with anti- αv integrin (green) and Hoechst 33258 (bleu) (a), counterstained with actin (b). (B and C) Superposition of cells with α tubulin (red) and Rac1 (green) (b), counterstained with Hoechst 33258 (a).

4.3 Résumé des résultats de l'article 2

Un premier fait marquant apparaît pour la faible élasticité 50 kPa. L'entrée en interphase est fortement réduite (75% des cellules sont encore en mitose 3h post-synchronisation pour l'élasticité 50 kPa contre 15% pour 200 et 500 kPa et sur le verre) et s'accompagne d'un taux significatif d'anomalie de ségrégation des chromosomes, matérialisé par un ou plusieurs chromosomes « restant à la traîne » clairement visible en anaphase et en télophase (37% d'anomalie à 50 kPa contre 5% pour 200, 500 kPa et le sur verre). Il est donc crucial de déterminer qu'elle est le rôle exercé par l'élasticité du substrat sur le contrôle de la division cellulaire. L'absence d'instabilité chromosomique permet une division et survie cellulaire normale tandis qu'une instabilité génétique peut entraîner soit un processus tumorale pour des instabilités génétiques modérées ou un processus de suppression de tumeur pour des instabilités génétiques massives (Paszek & Weaver, 2004). A l'élasticité 50 kPa (condition E50), les mitoses porteuses d'une anomalie de ségrégation des chromosomes sont fortement marquées à l'annexine V (phosphatidylserine exposée à la surface externe des cellules), signe d'une apoptose précoce. De plus, l'élasticité du substrat est à l'origine de plusieurs modifications d'évènements mitotiques qui sont 1) le faible engagement des intégrines α_v en mitose et en interphase, 2) la déstructuration du fuseau mitotique de microtubule ainsi que du cytosquelette de microtubule, inhibant en même temps la translocation cytoplasmique de Rac1. En perspective, des tests d'activités de l'engagement de α_v , de Rac1 (forme GTP ou GDP) et dynamique du fuseau mitotique de microtubules seront à réaliser pour 1) comprendre le rôle mécanique de l'élasticité du substrat dans ces organisations et 2) mieux cerner l'origine des instabilités chromosomiques observées aux faibles élasticités.

Conclusion générale

Ce travail de thèse s'est principalement intéressé à l'influence de l'élasticité du substrat sur les réponses cellulaires au cours de certaines phases du cycle. L'originalité de ce travail est de suivre l'effet d'un signal mécanique jusqu'au noyau, notamment son influence sur l'activité de réplication et de transcription. Bien que la distance qui sépare la membrane plasmique et les structures d'adhésion cellulaire du noyau soit importante, la vitesse de propagation d'une contrainte physique est extrêmement rapide. En effet, le cytosquelette peut être considéré comme un réseau de câbles rigides. Ainsi, en réponse à une déformation mécanique, la cellule peut transmettre un remodelage dynamique et coordonné du cytosquelette jusqu'aux structures nucléaires (Wang et al., 2009). Ces câbles interconnectés sont suffisamment stables pour supporter des charges de traction et de compression dans les cellules vivantes et donc maintenir à la cellule une stabilité de forme même s'ils subissent, au niveau moléculaire, des remodelages continus et dynamiques (figure I).

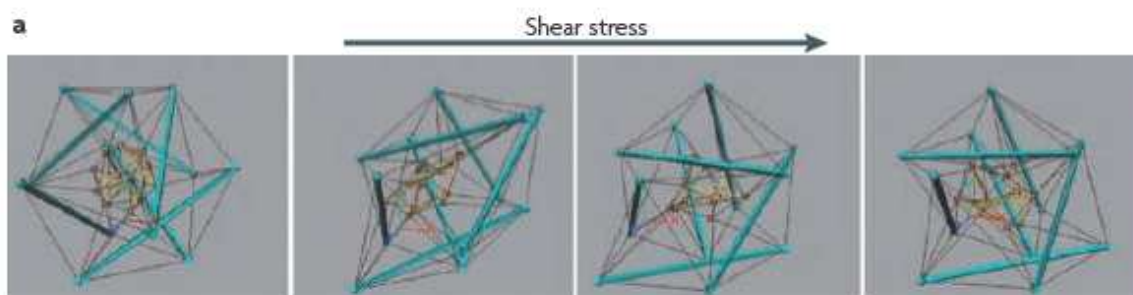


Figure I. Connectivité structurelle et distance de propagations des forces. D'après Wang et al., 2009.

Connaissant le rôle structurel du cytosquelette sur la cellule, une question importante était de déterminer si l'élasticité du substrat peut modifier cette organisation indispensable ou non au maintien des activités nucléaires de réplication et de transcription.

La réplication nécessite une connexion physique entre le substrat, le cytoplasme (matérialisée par l'engagement des intégrines, les contacts focaux et les fibres d'actine) et le

noyau, assurée par un environnement rigide (au-dessus de 50 kPa). La transcription reste sensible à l'élasticité du substrat (inactive à 0 kPa et active à partir de 50 kPa), cependant les contacts focaux et les fibres d'actine ne sont pas indispensables à cette activité. Pourtant, d'autres liens physiques pourraient être impliqués. L'élasticité du substrat contribue à une régulation de la réplication et de la transcription de manière sélective et découplée. Il est important de remarquer que dans les conditions de faibles élasticités (50 kPa), la transcription ne suffit plus à initialiser la réplication. La réplication a besoin à la fois d'une activité de transcription (facteurs de transcription qui ouvrent la chromatine) et d'une stabilité mécanique (structures d'adhésion et cytosquelette d'actine). L'approfondissement de ce lien mécanique entre le cytoplasme et le noyau a mis en évidence le rôle essentiel de la petite GTPase Rac1 pour la réplication. L'activité de cette GTPase conduit séquentiellement à l'association des contacts focaux, la formation des filaments d'actine et l'activation de la réplication.

Pour comprendre la mise en place chronologique des activités morpho-fonctionnels au cours du cycle cellulaire, les cellules sont synchronisées mécaniquement en mitose. Cette approche, nous permet maintenant d'aborder l'influence de l'élasticité du substrat sur des événements mitotiques majeurs. Les faibles élasticités du substrat (inférieures à 50kPa) induisent des dommages mitotiques qui sont : 1) des instabilités de ségrégation des chromosomes ; 2) une déstructuration progressive du fuseau mitotique. Ces accidents sont irréversibles puisque toutes les cellules qui ont une anomalie de ségrégation chromosomique vont vers une voie d'apoptose. Pour les autres cellules, l'absence du fuseau mitotique empêche toute cytokinèse. Cependant, il est difficile de déterminer l'origine mécanique de ces dommages. Soit, le faible engagement des intégrines observés à 50 kPa, fragilise en cascade d'autres événements mitotiques ou soit l'élasticité du substrat désorganise simultanément ces événements mitotiques.

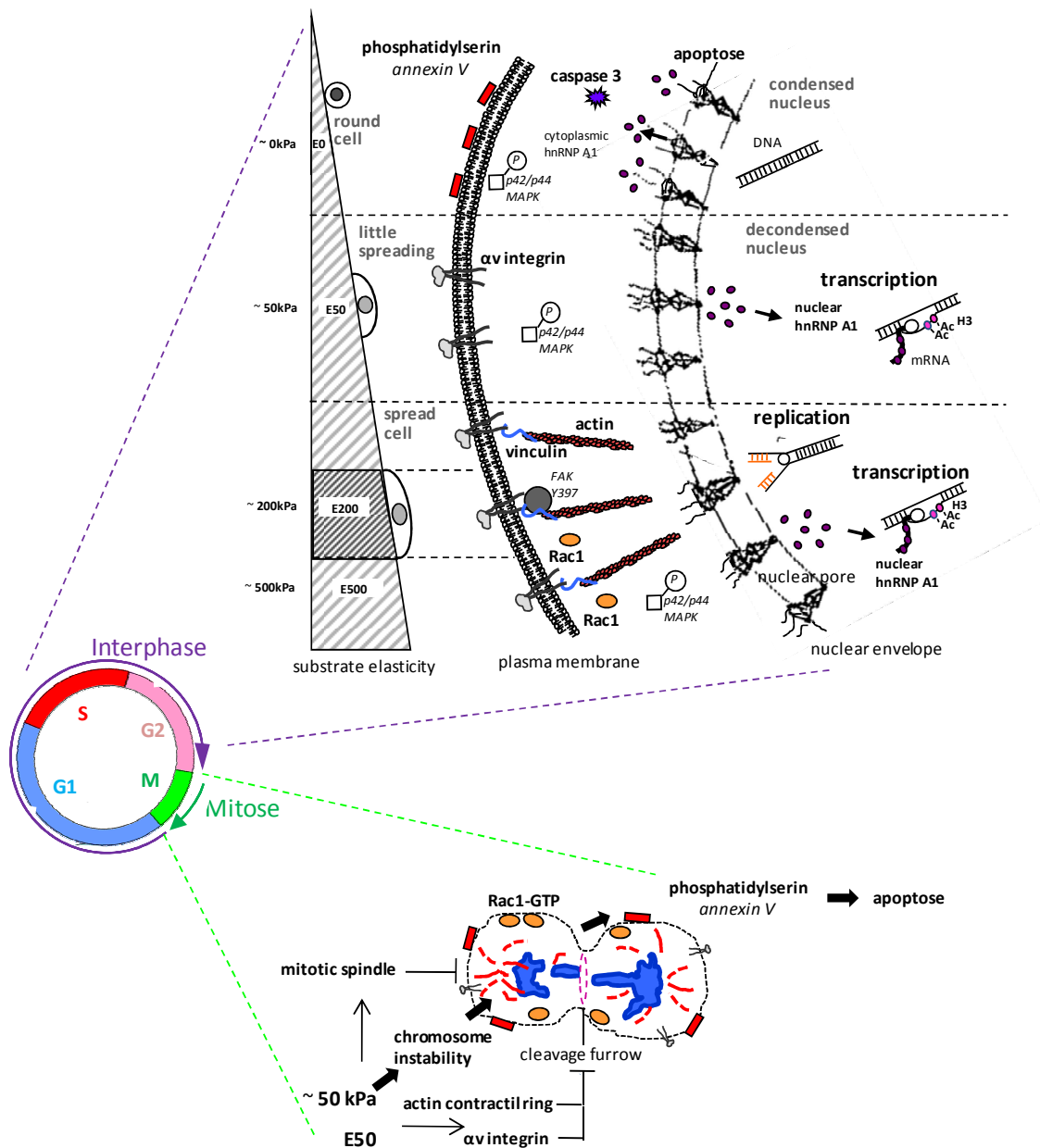


Figure II. Evénements cellulaires observés lors de l'interphase et la mitose chez des cellules épithéliales (Ptk2) sur des substrats à élasticité variable.

Du point de vue mécanique, une cellule épithéliale pour survivre, doit se maintenir sur une élasticité qui lui est physiologique. Deux situations sont envisageable, 1) la cellule migre et rencontre un environnement mécanique hostile (cas des cellules tumorales) et dans ce cas précis, l'élasticité du substrat pourra jouer son rôle sélectif ; 2) l'élasticité du substrat subit

des modifications mécanique (accidentels ou pathologiques), la cellule se trouvera dans des conditions qui lui seront devenues alors défavorable.

In vivo, on observe des phénotypes cellulaires, des morphologies dont on ignore encore l'origine. La connaissance des propriétés mécaniques du microenvironnement de ces cellules permettra de faire des rapprochements avec ces observations et donner des explications à ces phénomènes. Il sera possible alors d'apporter des connexions entre différents comportements cellulaires et d'avoir une meilleure compréhension de la mécanotransduction ce qui constituera certainement des avancées spectaculaires dans les futures stratégies thérapeutiques.

Références bibliographiques

Ai H, Jones SA, de Villiers MM, Lvov YM. Nano-encapsulation of furosemide microcrystals for controlled drug release. *J Control Release* 2003, 86, 59-68.

Bakolitsa, C., D.M. Cohen, L.A. Bankston, A.A. Bobkov, G.W. Cadwell, L. Jennings, D.R. Critchley, S.W. Craig and R.C. Liddington. (2004). Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion. *Nature*; 29;430(6999):583-6.

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

Boudou, T., T. Crouzier, K. Ren, G. Blinand C. Picart. (2010). Multiple functionalities of polyelectrolyte multilayer films: new biomedical applications. *Adv Mater.* 26;22(4):441-67.

Boulter, E., D. Grall, S. Cagnol and E. Van Obberghen-Schilling.(2006). Regulation of cell-matrix adhesion dynamics and Rac-1 by integrin linked kinase. *FASEB J* 20(9):1489-91.

Brown, M.C. and C.E. Turner. (2004). Paxillin: adapting to change. *Physiol Rev.*; 84(4):1315-39.

Caruso, F., E. Donath and H. Möhwald (1998). Influence of polyelectrolyte multilayer coatings on Förster Resonance Energy Transfer between 6-carboxyfluorescein and rhodamine B-Labeled particles in aqueous solution. *J. of Phys. Chem. B.*; 102(11): 2011-2016.

Caruso, F., K. Niikura, D. N. Furlong and Y. Okahata. (1997). Assembly of alternating polyelectrolyte and protein multilayer films for immunosensing. *Langmuir*; 13: 3427-3433.

Collin, D., P. Lavalley, J. M. Garza, J.-C. Voegel, P. Schaaf and P. Martinoty (2004). Mechanical properties of cross-linked hyaluronic acid/poly-(L-lysine) multilayer films. *Macromolecules*; 37(26): 10195-10198.

Croft, D.R., E. Sahai, G. Mavria, S. Li, J. Tsai, W.M. Lee, C.J. Marshall and M.F. Olson. (2004). Conditional ROCK activation in vivo induces tumor cell dissemination and angiogenesis. *Cancer Res.*; 15;64(24):8994-9001.

Cukierman, E., R. Pankov, DR. Stevens and KM. Yamada. (2001). Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*; 294(5547):1708-12.

Davies, PF. (1995). Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev.* 75(3):519- 60.

Decher, G. (1997). Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science* ; 277(5330): 1232-1237.

Decher, G., J. D. Hong and J. Schmitt (1992). Buildup of ultrathin multilayer films by a selfassembly process. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charges surface. *Thin Solid Films* ; 210: 831-835.

Dreyfuss, G., L. Philipson and I.W. Mattaj. (1988). Ribonucleoprotein particles in cellular processes. *J Cell Biol.* ;106(5):1419-25.

Dreyfuss, G., M.S. Swanson and S. Piñol-Roma. (1988). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation. *Trends Biochem Sci.*;13(3):86-91.

Dubas, S., T. and J. B. Schlenoff (1999). Factors controlling the growth of polyelectrolyte multilayers. *Macromolecules* 32: 8153-8160.

Dubreuil, F., N. Elsner and A. Fery.(2003) Elastic properties of polyelectrolyte capsules studied by atomic-force microscopy and RICM. *Eur Phys J E Soft Matter* ; 12(2):215-21.

Engler, AJ., S. Sen, HL. Sweeney and DE. Discher. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*; 25;126(4):677-89.

Even-Ram, S., V. Artym and KM. Yamada. (2006). Matrix control of stem cell fate. *Cell*; 25;126(4):645-7.

Ferreira, J., G. Paoletta, C. Ramos and A.I. Lamond. (1997). Spatial organization of large-scale chromatin domains in the nucleus: a magnified view of single chromosome territories. *J Cell Biol.* 29;139(7):1597-610.

Fielding, A.B. and S. Dedhar. (2009). The mitotic functions of integrin-linked kinase. *Cancer Metastasis Rev.* ; 28(1-2):99-111.

Francius, G., J. Hemmerlé, J. Ohayon, P. Schaaf, J.C. Voegel, C. Picart and B. Senger. (2006). Effect of crosslinking on the elasticity of polyelectrolyte multilayer films measured by colloidal probe AFM. *Microsc Res Tech.* Feb.; 69(2):84-92.

Fritz, G., I. Just and B. Kaina. (1999). Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer* ; 31;81(5):682-7.

Gao, C., E. Donath, S. Moya, V. Dudnik and H. Mohwald (2001). Elasticity of hollow polyelectrolyte capsules prepared by the layer-by-layer technique. *Eur. Phys. J. E.*; 5(1): 21-27.

Gao, C. Y., S. Leporatti, S. Moya, E. Donath and H. Mohwald (2001). Stability and mechanical properties of polyelectrolyte capsules obtained by stepwise assembly of poly(styrenesulfonate sodium salt) and poly(diallyldimethyl ammonium) chloride onto melamine resin particles. *Langmuir* 17(11): 3491-3495.

Garza, J. M., P. Schaaf, S. Muller, V. Ball, J.-F. Stoltz, J.-C. Voegel and P. Lavallo (2004). Multicompartment films made of alternate polyelectrolyte multilayers of exponential and linear growth. *Langmuir* 20(17): 7298-7302.

Georges, P.C. and P.A. Janmey. (2005). Cell type-specific response to growth on soft materials. *J Appl Physiol.*; 98(4):1547-53.

Green, A. E. S. and S. M. Sadrameli (2004). Analytical representations of experimental polyethylene pyrolysis yields. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 72(2):329-335.

Harris, A.K., D. Stopak and P. Wild. (1981). Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature*; 19;290(5803):249-51.

Hassan, A.B., R.J. Errington, N.S. White, D.A. Jackson and P.R. Cook. (1994). Replication and transcription sites are colocalized in human cells. *J Cell Sci.* ;107 (Pt 2):425-34.

Helmke, BP. and PF. Davies. (2002). The cytoskeleton under external fluid mechanical forces: hemodynamic forces acting on the endothelium. *Ann Biomed Eng.*; 30(3):284-96.

Hinz, B., G. Celetta, JJ. Tomasek, G. Gabbiani and C. Chaponnier. (2001). Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell.*;12(9):2730-41.

Hoogeveen, N. G., M. A. Cohen Stuart, G. J. Fleer and M. R. Bohmer (1996). Formation and Stability of Multilayers of Polyelectrolytes. *Langmuir* 12(15): 3675 -3681.

Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.*; 20;110(6):673-87.

Iler, R. (1966). *J. Colloid. Interface Sci.*; 21: 569.

Izaurrealde, E., A. Jarmolowski, C. Beisel, I.W. Mattaj, G. Dreyfuss and U. Fischer. (1997). A role for the M9 transport signal of hnRNP A1 in mRNA nuclear export. *J Cell Biol.*; 7;137(1):27-35.

Jaber, J. A. and J. B. Schlenoff. (2006). Mechanical properties of reversibly cross-linked ultrathin polyelectrolyte complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 128(9): 2940-2947.

Jessel, N., F. Atalar, P. Lavalley, J. Mutterer, G. Decher, P. Schaaf, J-C. Voegel, and J. Ogier. (2003) Bioactive coatings based on a polyelectrolyte multilayer architecture functionalized by embedded proteins *Adv Mat.*; 15: 692-695.

Johnson, R.P. and S.W. Craig. (1994). An intramolecular association between the head and tail domains of vinculin modulates talin binding. *J Biol Chem.*; 29;269(17):12611-9

Katsumi, A., J. Milanini, WB. Kiosses, MA. del Pozo, R. Kaunas, S. Chien, KM. Hahn, MA. and Schwartz. (2002). Effects of cell tension on the small GTPase Rac. *J Cell Biol.*; 8;158(1):153-64.

Kirschner, M.W. and T. Mitchison. (1986). Microtubule dynamics. *Nature* ; 18-31;324(6098):621.

Kulcsar, A., J. C. Voegel, P. Schaaf and P. Kekicheff (2005). Glassy state of polystyrene sulfonate/polyallylamine polyelectrolyte multilayers revealed by the surface force apparatus. *Langmuir* 21(4): 1166-1170.

Ladam, G., P. Schaad, J.-C. Voegel, P. Schaaf, G. Decher and F. Cuisinier. (2000). In situ determination of the structural properties of initially deposited polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* 16(3): 1249-1255.

Lane Smith, R., MC. Trindade, T. Ikenoue, M. Mohtai, P. Das, Carter DR, SB. Goodman and DJ. Schurman. (2000). Effects of shear stress on articular chondrocyte metabolism. *Biorheology* ; 37(1-2):95-107.

Lavalle, P., C. Gergely, F. J. G. Cuisinier, G. Decher, P. Schaaf, J.-C. Voegel and C. Picart(2002). Comparison of the structure of polyelectrolytes multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime: An in situ atomic force microscopy study. *Macromolecules* 35: 4458-4465.

Lo, CM., HB. Wang, M. Dembo and YL. Wang.(2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J.*; 79(1):144-52.

Lösche, M. (1997). Protein monolayers at interfaces. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 2(5): 546-556.

Lvov, Y., K. Ariga, M. Onda, I. Ichinose and T. Kunitake (1997). Alternate assembly of ordered multilayers of SiO₂ and other nanoparticles and polyions. *Langmuir* 13(23): 6195-6203.

Lvov, Y.M. and G.B. Sukhorukov. (1997). Protein architecture: assembly of ordered films of alternated adsorption of oppositely charged macromolecules. *Membr Cell Biol.*; 11: 277-303.

Meshel, A.S., Q. Wei, R.S Adelstein.and M.P Sheetz. (2005). Basic mechanism of three-dimensional collagen fibre transport by fibroblasts. *Nat Cell Biol.*; 7(2):157-64.

Mettouchi, A., S.Klein, W. Guo, M. Lopez-Lago, E. Lemichez, J.K. Westwick and F.G. Giancotti. (2001). Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle. *Mol Cell.*; 8(1):115-27.

Michael, W.M., M.Choi and G. Dreyfuss. (1995). A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell* ; 3;83(3):415-22

Muller, M., J. Vöros, G. Csucs, E. Walter, G. Danuser, H. P. Merkle, N. D. Spencer and M. Textor (2003). Surface modification of PLGA microspheres. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*; 66A(1): 55-61.

Munevar, S., Wang Y and M. Dembo. (2001). Traction force microscopy of migrating normal and H-ras transformed 3T3 fibroblasts. *Biophys J* ; 80(4):1744-57.

Pankov, R. and KM. Yamada. (2002). Fibronectin at a glance. *Cell Sci.*;115(Pt 20):3861-3.

Paszek, M.J., N. Zahir, K.R. Johnson, J.N. Lakins, G.I. Rozenberg, A. Gefen, C.A. Reinhart-King, S.S. Margulies, M. Dembo, D. Boettiger, D.A. Hammer and V.M. Weaver. (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*. 2005 Sep;8(3):241-54.

Paszek, M.J and V.M. Weaver. (2004). The tension mounts: mechanics meets morphogenesis and malignancy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* ; 9(4):325-42.

Pei, R., X., Cui, X., Yang and E. Wang. (2001) Assembly of alternating polycation and DNA multilayer films by electrostatic layer-by-layer adsorption. *Biomacromolecules.*; 2: 463-468.

Picart, C., P. Lavalley, P. Hubert, F. J. G. Cuisinier, G. Decher, P. Schaaf and J.-C. Voegel (2001). Buildup mechanism for poly(L-lysine)/hyaluronic acid films onto a solid surface. *Langmuir* 17: 7414-7424.

Picart, C., J. Mutterer, Y. Arntz, J.-C. Voegel, P. Schaaf and B. Senger (2005). Application of fluorescence recovery after photobleaching to diffusion of a polyelectrolyte in a multilayer film. *Microsc. Res. and Tech.*; 66(1): 43-57.

Picart, C., J. Mutterer, L. Richert, Y. Luo, G. D. Prestwich, P. Schaaf, J.-C. Voegel and P.Lavalle (2002). Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 99(20): 12531-12535.

Piñol-Roma, S. and G. Dreyfuss. (1993). Cell cycle-regulated phosphorylation of the pre-mRNA-binding (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) C proteins. *Mol Cell Biol.* ;13(9):5762-70.

Piñol-Roma, S. and G. Dreyfuss.(1993). hnRNP proteins: localization and transport between the nucleus and the cytoplasm. *Trends Cell Biol.* ; 3(5):151-5.

Piñol-Roma ,S.and G. Dreyfuss. (1992). Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature* ; 20;355(6362):730-2.

Piñol-Roma, S. and G. Dreyfuss. (1991). Transcription-dependent and transcription-independent nuclear transport of hnRNP proteins. *Science.* ; 19;253(5017):312-4.

Qiu, X., S. Leporatti, E. Donath and H.Mohwald. (2001). Studies on the drug release properties of polysaccharide multilayers encapsulated ibuprofen microparticles. *Langmuir*; 17: 5375-5380.

Rehfeldt, F., A.J. Engler, A. Eckhardt, F. Ahmed and D.E. Discher. (2007). Cell responses to the mechanochemical microenvironment--implications for regenerative medicine and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.*; 10;59(13):1329-39.

Richert, L., A. J. Engler, D. E. Discher and C. Picart (2004). Elasticity of native and crosslinked polyelectrolyte multilayer films. *Biomacromolecules* 5(5): 1908-1916.

Richert, L., P. Lavalle, D. Vautier, B. Senger, JF. Stoltz, P. Schaaf, JC. Voegel and C. Picart. (2002). Cell interactions with polyelectrolyte multilayer films. *Biomacromolecules*; 3(6):1170-8.

Sadoshima, J. and S. Izumo. (1997). The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol.*; 59:551-71.

Saif, MT., CR. Sager and S. Coyer. (2003). Functionalized biomicroelectromechanical systems sensors for force response study at local adhesion sites of single living cells on substrates. *Ann Biomed Eng.*; (8):950-61.

Schlenoff, J. B. and S. T. Dubas (2001). Mechanism of Polyelectrolyte Multilayer Growth: Charge Overcompensation and Distribution. *Macromolecules* 34(3): 592-598.

Schneider, A., G. Francius, R. Obeid, P. Schwinte, J. Hemmerle, B. Frisch, P. Schaaf, J. C. Voegel, B. Senger and C. Picart (2006). Polyelectrolyte multilayers with a tunable Young's modulus: Influence of film stiffness on cell adhesion. *Langmuir* 22(3): 1193-1200.

Schneider, G. and G. Decher (2004). From functional core/shell nanoparticles prepared via layer-by-layer deposition to empty nanospheres. *Nano Letters* 4(10): 1833-1839.

Schultz, P., Vautier D, Richert L, Jessel N, Haikel Y, Schaaf P, Voegel JC, Ogier J, Debry C. Polyelectrolyte multilayers functionalized by a synthetic analogue of an anti-inflammatory peptide, alpha-MSH, for coating a tracheal prosthesis. *Biomaterials*. 2005 May;26(15):2621-30.

Shiratori, S. S. and M. F. Rubner (2000). pH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes. *Macromolecules* 33(11): 4213-4219.

Sukhorukov, G. B., A. Fery, M. Brumen and H. Mohwald (2004). Physical chemistry of encapsulation and release. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6(16): 4078-4089.

Tamada, M., M.P. Sheetz and Y. Sawada. (2004). Activation of a signaling cascade by cytoskeleton stretch. *Dev Cell* ; 7(5):709-18.

Trau, D. and R. Renneberg. (2003). Encapsulation of glucose oxidase microparticles within a nanoscale layer-by-layer film: immobilization and biosensor applications. *Biosens. Bioelectron.*; 18, 1491-1499.

Vallotton, P., SL. Gupton, CM. Waterman-Storer and G. Danuser. (2004). Simultaneous mapping of filamentous actin flow and turnover in migrating cells by quantitative fluorescent speckle microscopy. *Proc Natl Acad Sci.*;29;101(26):9660-5.

Vautier, D., J. Hemmerlé, C. Vodouhe, G. Koenig, L. Richert, C. Picart, J.C. Voegel, C. Debry, J. Chluba and J. Ogier. (2003). 3-D surface charges modulate protrusive and contractile contacts of chondrosarcoma cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 56(3):147-58

Vicente-Manzanares, M., C.K. Choi and A.R. Horwitz. (2009). Integrins in cell migration--the actin connection. *J Cell Sci.*; 15;122(Pt 2):199-206

Vogel, V. (2006). Mechanotransduction involving multimodular proteins: converting force into biochemical signals. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*;35:459-88.

Von Wichert, G., G. Jiang, A. Kostic, K. De Vos, J. Sap and M.P. Sheetz. (2003). RPTP-alpha acts as a transducer of mechanical force on alpha5/beta3-integrin-cytoskeleton linkages. *Cell Biol.*; 14;161(1):143-53.

Wang, F., V.M. Weaver, O.W. Petersen, C.A. Larabell, S., P. Dedhar, P. Briand, R. Lupu and M.J. Bissell. (1998). Reciprocal interaction between β 1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 95, 14821-14826.

Wang, N., J.D. Tytell and D.E. Ingber. (2009). Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 75-82.

Wang, N., E. Ostuni, G.M. Whitesides and D.E. Ingber. (2002). Micropatterning tractional forces in living cells. *Cell Motil Cytoskeleton* ;52(2):97-106.

Wei, W.C., H.H. Lin, M.R. Shen and M.J. Tang. (2008). Mechanosensing machinery for cells under low substratum rigidity. *Am J Physiol Cell Physiol.* ; 295(6):C1579-89.

Wells, J.T., J.R. Runo and M.R. Lucey. (2008). Portal pulmonary hypertension. *Hepatology* ;48(1):13-5.

Werner, S., O. Huck, B. Frisch, D. Vautier, R. Elkaim, J.C. Voegel, G. Brunel and H. Tenenbaum. (2009). The effect of microstructured surfaces and laminin-derived peptide coatings on soft tissue interactions with titanium dental implants. *Biomaterials* ; 30(12):2291-301.

Wozniak, M.A., R. Desai, P.A. Solski, C.J. Der and P.J. Keely. (2003). ROCK-generated contractility regulates breast epithelial cell differentiation in response to the physical properties of a three-dimensional collagen matrix. *J Cell Biol.* 10;163(3):583-95.

Liste des publications et des communications

PUBLICATIONS

1. **Kocgozlu L**, Lavalle P, Koenig G, Senger B, Haikel Y, Schaaf P, Voegel JC, Tenenbaum H, Vautier D :Selective and uncoupled role of substrate elasticity in the regulation of replication and transcription in epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 2010, 1; 123(Pt 1):29-39.
2. **Kocgozlu L**, Elkaim R, Tenenbaum H, Werner S: Variable cell responses to *P. gingivalis* lipopolysaccharide. *Journal of Dental Research*, 2009, 88(8):741-5.
3. Elkaim R, Werner S, **Kocgozlu L**, Tenenbaum H: *P. gingivalis* regulates the expression of Cathepsin B and Cystatin C. *Journal of Dental Research*, 2008, 87(10):932-6.
4. Elkaim R, Dahan M, **Kocgozlu L**, Werner S, Kanter D, Kretz JG, Tenenbaum H: Prevalence of periodontal pathogens in subgingival lesions, atherosclerotic plaques and healthy blood vessels: a preliminary study. *Journal of Periodontal Research*, 2008, 43(2):224-31.

Peer reviewed paper

5. **Kocgozlu L** et al.: Substrate elasticity induces abnormal morphology in chromosome segregation in epithelial cells (in preparation).

CONFERENCES:

1. Elkaïm R., Dahan M., **Kocgozlu L.**, Werner S., Kanter D., Kretz J.G., Tenenbaum H. Prevalence of pathogens in periodontal lesions and blood vessels. Communication at the meeting of Israelien Division from IADR. Jérusalem, May 2006.
2. **Kocgozlu L.**, Werner S., Elkaïm R., Tenenbaum H. Endothelial and gingival epithelial cells challenged with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides. Communication at the meeting of Israelien Division from IADR. Jerusalem, May 2006.
3. Elkaïm R., Dahan M., **Kocgozlu L.**, Werner S., Kanter D., Kretz J.G., Tenenbaum H. Detection of periopathogens in subgingival and vessel samples from atherosclerotic affected patients. Euro Perio 5. Madrid, July 2006.
4. **Kocgozlu L.**, Werner S., Elkaïm R., Tenenbaum H. Effects of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on gingival epithelial cells and human endothelial cells. 8ème Forum of Young Researchers in Odontology Lyon, September 2006.
5. **Kocgozlu L.**, Werner S., Elkaïm R., Tenenbaum H. Effects of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on gingival epithelial cells and human endothelial cells. Invited Conference of the ADF (Association Dentaire Française) Paris. November 2006.
6. **Kocgozlu L.**, Werner S., Elkaïm R., Tenenbaum H. Interaction between periodontal and cardiovascular disease. Invited Conference of the ADF (Association Dentaire Française) Paris. November 2007.
7. **Kocgozlu L.**, Werner S., Elkaïm R., Tenenbaum H. Effects of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on gingival epithelial cells and human endothelial cells. PEF IADR Conference, London, September 2008.
8. **Kocgozlu L.**, Lavallo P., Schaaf P., Voegel J-C., Vautier D. Selective and uncoupled role of substrate elasticity in the regulation of replication and transcription in epithelial cells. Journal of Cell Science, 2010, 1; 123(Pt 1):29-39. MRS Spring Meeting, San Francisco April 2010.